https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-2-222-233

CC BY 4.0

АЛГОРИТМЫ РАЗРЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ ПРЕДТРАНСФУЗИОННОГО ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Пашкова И. А.[1,2]

[1] ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, 350086, Краснодар, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 350063, Краснодар, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Скрининг и идентификация антиэритроцитарных аллоиммунных антител у реципиентов необходимы при переливании компонентов крови и являются важным элементом тестирования перед проведением гемотрансфузии.
Цель работы — составить алгоритмы предтрансфузионного иммуногематологического тестирования.
Основные сведения. Данные исследования позволяют предупредить развитие посттрансфузионных реакций и осложнений. Присутствие в исследуемой крови аллоантител разных специфичностей, а также аутоантител может затруднить предтрансфузионное тестирование и потребовать применения дополнительных методов (адсорбция, элюция и др.) исследования. Автором предложена эффективная система алгоритмов проведения иммуногематологических исследований, которая будет способствовать выявлению больных группы риска развития иммунных посттрансфузионных реакций и осложнений и обеспечит выполнение индивидуального подбора совместимых донорских гемотрансфузионных сред.

Ключевые слова: предтрансфузионное тестирование реципиентов, аллоантитела, аутоантитела, скрининг и идентификация антител, прямой антиглобулиновый тест, непрямой антиглобулиновый тест
Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.
Для цитирования: Пашкова И.А. Алгоритмы разрешения проблем предтрансфузионного иммуногематологического тестирования. Гематология и трансфузиология. 2019; 64(2):222–233. https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-2-222-233

ALGORITHMS FOR SOLVING PROBLEMS OF PRE-TRANSFUSION IMMUNOHEMATOLOGICAL TESTING

Pashkova I. A.[1,2]

[1] Research Institute – Regional Clinical Hospital 1 n.a. Prof. S.V. Ochapovsky, Ministry of Healthcare of Krasnodar Krai, 350086, Krasnodar, Russian Federation
[2] Kuban State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 350063, Krasnodar, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Screening and identification of anti-erythrocyte alloimmune antibodies in recipients is an important and necessary step in their testing before blood transfusion.
Aim. To formulate algorithms that could facilitate the process of pre-transfusion immunohematological testing.
General findings. Such a testing allows the development of post-transfusion reactions and complications to be avoided. The presence of alloantibodies of various specificities and autoantibodies in the test blood may complicate pre-transfusion testing and require the use of additional methods (adsorption, elution, etc.). The author has proposed an effective system of algorithms for conducting immunohematological studies, which can be used to identify patients at risk of developing immune post-transfusion complications and ensure an individual selection of compatible donor blood-transfusion products.

Keywords: pre-transfusion testing, alloantibodies, autoantibodies, screening and identification of antibodies, direct antiglobulin test, indirect antiglobulin test
Conflict of interest: the author declares no conflict of interest.
Financial disclosure: the study had no sponsorship.
For citation: Pashkova I.A. Algorithms for solving problems of pre-transfusion immunohematological testing. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2019; 64(2):222–233 (in Russian). https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-2-222-233

Введение

При проведении трансфузий эритроцитсодержащих компонентов могут возникать проблемы, обусловленные присутствием в крови реципиентов и доноров аллоиммунных антиэритроцитарных антител (антител, синтезируемых при попадании в кровь данного лица внешнего чужеродного эритроцитарного антигена, т.е. антигена, которого нет на эритроцитах этого человека) и/или аутоиммунных антиэритроцитарных антител (антител, синтезируемых при ряде заболеваний против собственных антигенов эритроцитов данного человека) [1–3]. Аллоантитела нередко являются клинически значимыми, так как могут вызывать гемолиз донорских эритроцитов. При этом аллоантитела разных специфичностей имеют разные свойства, что требует дифференцированного подхода к их детекции. Аутоантитела, вызывая панагглютинацию, могут затруднять определение группы крови и резус-фенотипа, маскировать присутствие аллоантител. Предтрансфузионные скрининг и идентификация антиэритроцитарных аллоантител, их дифференцировка от аутоантител и на этой основе подбор совместимой донорской крови необходимы для профилактики посттрансфузионных реакций и осложнений [4–6]. Автором совместно с сотрудниками были проведены исследования антител у более чем 200 тысяч больных и более чем 100 тысяч доноров. Результаты исследований опубликованы ранее [7, 8].

Цель работы — составить алгоритмы предтрансфузионного иммуногематологического тестирования. Разработанные алгоритмы будут способствовать повышению качества иммуносерологического обследования и снижению риска развития иммунных посттрансфузионных реакций и осложнений после гемотрансфузий.

Скрининг и идентификация аллоиммунных антиэритроцитарных антител

Клинически значимыми антиэритроцитарными аллоантителами являются такие антитела, которые приводят к уменьшению срока жизни донорских эритроцитов или могут быть причиной гемолитического трансфузионного осложнения (ГТО). Некоторые аллоантитела вызывают разрушение несовместимых эритроцитов в течение нескольких часов или минут (острый гемолиз), другие снижают продолжительность жизни эритроцитов на несколько дней (отсроченный гемолиз), третьи не влияют на срок жизни перелитых эритроцитов. То же касается и антител при гемолитической болезни плода и новорожденного (ГБН): одни могут стать причиной ГБН, другие дают положительный прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ) у плода при отсутствии клинической картины, а третьи вообще не вызывают этого патологического состояния. Важнейшими трансфузионно опасными антигенами эритроцитов являются антигены систем ABO, Rh (прежде всего D и c), а также антиген K системы Kell. К антигенам некоторых других антигенных систем эритроцитов (Kidd, Duffy и др.) также могут вырабатываться клинически значимые антитела [9, 10].

При поиске эритроцитарных антител необходимо учитывать их принадлежность к классу и субклассу иммуноглобулинов. Антиэритроцитарные антитела могут быть иммуноглобулинами классов IgM, IgG, IgA и субклассами IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 [2, 11, 12]. Важно учитывать также различия физических и химических свойств разных антител [9, 13–15]. К таким показателям относится температурный оптимум реагирования. Некоторые антитела можно обнаружить при помощи антиглобулиновых сывороток в непрямом антиглобулиновом тесте (НАГТ) разной модификации, другие выявляются лишь на холоде в реакции солевой агглютинации. Существуют антитела, которые становятся биологически активными только в кислой среде или же после добавления к ним свежей сыворотки, содержащей комплемент. Некоторые антитела можно обнаружить после обработки эритроцитов ферментами (папаином, бромелином и др.) или в присутствии раствора низкой ионной силы (РНИС-LISS (low ionic strength solution).

При определении аллоантител должен быть выполнен ряд требований:

1. Требования к образцу крови при скрининге антител

А. Образец крови должен быть взят не более чем за 2 дня до исследования и храниться при температуре +4…+8 °С.

Б. Тест может быть выполнен как с сывороткой, так и с плазмой, но при использовании плазмы существует опасность не выявления слабоактивных антител из-за разведения стабилизирующим раствором.

В. Гемолизированная и хилезная кровь не используются.

2. Требования к проведению скрининга антител

Методы, применяемые для скрининга антител, должны выявлять все клинически значимые антитела и включать:

А. для выявления неполных антител:

- непрямой антиглобулиновый тест в гелевом методе (инкубация при 37 °С) или его модификацию аналогичной чувствительности (РНИС-LISS);
- желатиновый метод (применяется 10 % желатин; инкубация при 48 °С) с микроскопированием результата;
- полиглюкиновый экспресс-метод с 33 % полиглюкином в пробирках без подогрева.

Б. для выявления полных антител:

- метод агглютинации в солевой среде.

Для скрининга должна применяться панель стандартных эритроцитов, включающая не менее 3 видов стандартных эритроцитов, содержащих все трансфузионно опасные антигены в гомозиготном состоянии.

3. Требования к проведению идентификации аллоиммунных антител

Для установления специфичности антител, выявленных при первичном скрининге, необходимо использовать панель стандартных эритроцитов, включающую не менее 11 образцов. Применяются те же методы, что и для скрининга антител.

Если в анамнезе у больного уже обнаруживались аллоиммунные антитела какой-либо специфичности, каждый раз перед предполагаемой трансфузией необходимо перепроверять специфичность, чтобы исключать присутствие антител, которые могли выработаться дополнительно.

Для идентификации антиэритроцитарных антител необходим выбор адекватных методов исследования с учетом различия свойств разных антител. Например, антитела системы Duffy, Kidd не выявляются методом агглютинации в солевой среде, в полиглюкиновом и желатиновом тестах, но хорошо определяются в непрямом антиглобулиновом тесте в геле [11, 13]. Современные данные об эффективности различных методов в исследовании антител различных специфичностей представлены в таблице 1.

Основным тестом, позволяющим обнаружить все клинически значимые аллоантитела в исследуемой сыворотке, является непрямой антиглобулиновый тест, в том числе в гелевом методе.

Для скрининга аллоантител в непрямом антиглобулиновом тесте могут быть использованы гелевые карты ID Card Liss/Coombs, ID Card IgG фирмы GRIFOLS (Испания). Для первичного скрининга антител могут применяться стандартные эритроциты Seraskan Diana GRIFOLS I+II+III+IV (фенотипы: CCDee; ccDEE; ccdee; CwCDee). Идентификацию антител можно про-

Таблица 1. Методы выявления антител
Table 1. *Antibody detection methods*

Специфичность антител *Antibody specificity*	Ассоциированы с... *Associated with...*		Солевая среда *Salt media*	Конглютинация с желатином *Conglutination with gelatin*	АГС*** Гелевый тест *AGS**** *Gel test*
	ГТР*	ГБН**			
Анти-D,C,c,E,e *Anti-D,C,c,E,e*	Да Yes	Да Yes	Маловероятно Highly unlikely	Да Yes	Да Yes
Анти-M *Anti-M*	Мало Small	Мало Small	Да Yes	Да Yes	Да Yes
Анти-N *Anti-N*	Нет No	Редко Seldom	Да Yes	Да Yes	Да Yes
Анти-S,s,U *Anti-S,s,U*	Да Yes	Да Yes	Маловероятно Highly unlikely	Нет/иногда No/sometimes	Да Yes
Анти-Lea *Anti-Lea*	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Да Yes
Анти- Leb *Anti-Leb*	Нет No	Редко Seldom			
Анти-Lua *Anti-Lua*	Нет No	Нет No	Да Yes	Нет/иногда No/sometimes	Нет/иногда No/sometimes
Анти-Lub *Anti-Lub*	Да Yes	Редко Seldom	Нет No	Нет/иногда No/sometimes	Да Yes
Анти-K, k Kpa, Kpb,Jsa,Jsb *Anti-K, k Kpa, Kpb,Jsa,Jsb*	Да Yes	Да Yes	Маловероятно Highly unlikely	Да Yes	Да Yes
Анти- Fya, Fab, *Anti-Fya, Fab,*	Да Yes	Да Yes	Нет No	Нет No	Да Yes
Анти- Jka,Jkb *Anti-Jka,Jkb*	Да Yes	Да Yes	Нет No	Нет No	Да Yes
Анти-Dia,Dib, *Anti-Dia,Dib,*	Да Yes	Да Yes	Нет No	Нет/иногда No/sometimes	Да Yes
Анти-Yta *Anti-Yta*	Нет No	Нет No	Нет No	Нет данных No data	Да Yes
Анти-Doa *Anti-Doa*	Да Yes	Нет No	Нет No	Нет данных No data	Да Yes
Анти-Coa *Anti-Coa*	Да Yes	Да Yes	Нет No	Нет данных No/sometimes	Да Yes
Анти-Xga, Ytb, *Anti-Xga, Ytb, Dob,Cob, Sc1,Sc2* *Dob,Cob, Sc1,Sc2*	Нет данных No data	Нет данных No data	Нет No	Нет данных No data	Да Yes

Примечание. * ГТР — гемолитические трансфузионные реакции. ** ГБН — гемолитическая болезнь новорожденных. *** АГС — антиглобулиновая сыворотка.
*Note. * HTR — hemolytic transfusion reactions. ** HDN — hemolytic disease of the newborn. *** AGS — antiglobulin serum.*

водить в том числе в гелевых картах Liss/Coombs, ID Card IgG с использованием 15 образцов стандартных эритроцитов (фирма GRIFOLS), фенотипированных по 36 антигенам.

Аутоконтроль

Аутоконтроль — тест на взаимодействие сыворотки и эритроцитов исследуемой крови. При скрининге и идентификации аллоантител аутоконтроль необходимо проводить во всех случаях. В норме сыворотка крови не может вызывать агглютинацию собственных эритроцитов. Отрицательный аутоконтроль при определении аллоантител подтверждает специфичность реакций исследуемой сыворотки с тестовыми эритроцитами. Положительный аутоконтроль доказывает присутствие в тестируемой крови аутоантител. В этом случае следует проверить, есть ли в крови кроме аутоантител также и аллоантитела, т.е. провести дифференцировку (иногда аутоконтроль позволяет сделать предварительные предположения по этому вопросу путем сравнения реакции агглютинации с аутологичными и стандартными эритроцитами).

Прямой антиглобулиновый тест

Прямой антиглобулиновый тест, в том числе в геле, проводят для определения фиксированных на поверхности эритроцитов антител и/или компонентов комплемента. Положительный результат ПАГТ бывает при недавно проведенных трансфузиях эритроцитсодержащих компонентов, трансплантации гемопоэтических

стволовых клеток или солидных органов, при гемолитической болезни плода и новорожденного (вследствие присутствия у матери аллоантител IgG класса, проходящих через плаценту), наличии антител, направленных к лекарственным препаратам, при некоторых аутоиммунных заболеваниях и др. Наиболее часто как самостоятельное исследование ПАГТ применяется для выявления неполных аутоантител на эритроцитах при аутоиммунных гемолитических анемиях.

Наиболее частые ошибки при скрининге аллоантител

1. Применение низкочувствительного метода исследования.
2. Стандартные эритроциты, выбранные для исследования, не содержат необходимый антиген.
3. Неправильное соотношение сыворотки и тестовых эритроцитов (при слишком высокой или слишком низкой концентрации стандартных эритроцитов происходят слабые реакции).
4. Исследуемая сыворотка не добавлена в пробу.
5. Неправильное хранение стандартных эритроцитов и исследуемой сыворотки.
6. Низкое качество антиглобулиновой сыворотки (в частности, реактивы теряют активность вследствие бактериальной контаминации или контаминации сывороткой человека).
7. Некоторые образцы антител можно детектировать только в присутствии активного комплемента.

Алгоритм действий врача по профилактике ошибок

1. Уточнить диагноз, трансфузионный и акушерский анамнез.
2. Устранить возможные технические ошибки:
а) проверить качество реагентов: срок годности, наличие гемолиза стандартных эритроцитов, карты Кумбса (не высох ли гель);
б) центрифугирование выполнять строго по инструкции;
в) соблюдать регламентированное соотношение сыворотки и тест-эритроцитов.
3. В сомнительных случаях изменить условия проведения реакции агглютинации (в том числе с целью воздействия на возможные неспецифические факторы):
а) при исследовании антител низкой активности (если реакция была на 1+, 2+) использовать избыток антител по отношению к эритроцитам;
б) увеличить время инкубации;
в) повторить скрининг антител в непрямом антиглобулиновом тесте, если ранее применялся другой метод;
г) повысить уровень экспрессии антигенов стандартных эритроцитов, проведя энзимирование тестовых эритроцитов растворами протеолитических ферментов (бромелин, папаин), РНИС (необходимо учитывать, что некоторые эритроцитарные антигены при обработке ферментом могут быть разрушены, например Fy^a, Fy^b, S, вследствие чего возможен ложноотрицательный результат);
д) учитывать возможность появления комплементсвязывающих антител (например к системам Rh, Duffy, U, Kidd); если ранее скрининг и идентификацию проводили в гелевых картах с Anti-IgG, провести повторное исследование в картах Anti-IgG + комплемент (DG Gel LISS/Coombs).

Алгоритм действий врача при идентификации аллоантител в сложных случаях

I. Алгоритм при наличии в исследуемой крови только антиэритроцитарных аллоантител (ПАГТ и аутоконтроль — отрицательные).

Сложные проблемы при идентификации аллоантител могут возникать, если в сыворотке крови содержатся антитела разных специфичностей (две или более разновидности антител) или если имеет место эффект «дозы» антигена (как отмечалось ранее, некоторые виды антител, например антитела к антигенам систем Kidd, Duffy, MNS, вызывают слабую реакцию при гетерозиготности тест-эритроцитов по данным антигенам).

В связи с этим врач должен помнить ряд правил:

1. У людей не вырабатываются аллоантитела против имеющихся у них антигенов.
2. В сложных случаях следует руководствоваться «правилом трех» для подтверждения специфичности антител: сыворотка больного должна давать положительную реакцию с 3 образцами стандартных эритроцитов, содержащих один и тот же антиген, и отрицательную с 3 образцами тестовых эритроцитов, не имеющих этого антигена. Если в панели недостаточно образцов стандартных эритроцитов для выполнения правила, могут быть использованы дополнительные образцы тестовых эритроцитов из другой панели.
3. Сила реакции может быть обусловлена эффектом «дозы»: если тестовые эритроциты какого-либо образца панели имеют данный антиген в гомозиготном состоянии, может наблюдаться сильная реакция агглютинации; если тестовые эритроциты этого образца панели гетерозиготны по данному антигену, реакция может быть слабой или даже отрицательной (системы Rh, Duffy, MNS, Kidd). Следует проверить по инструкции, имеющейся в панели тестовых эритроцитов, гомозиготность или гетерозиготность нужных для соответствующего исследования антигенов.
4. Фенотипирование, помогающее подтвердить специфичность аллоантител (см. правило 1), может быть проведено, если больному не переливались донорские эритроциты в течение срока жизни эритроцитов перед исследованием, т. к. донорские эритроциты могут дать ложно положительный или ложно отрицательный результат фенотипирования [16].

Для идентификации антител разных специфичностей можно выполнить несколько процедур.

1. Выбрать дополнительные образцы стандартных эритроцитов из других идентификационных панелей. Каждый образец должен быть положительным для одного из вариантов антител и отрицательным для остальных вариантов антител.
2. Энзимирование стандартных эритроцитов протеолитическими ферментами (фицин, бромелин, папаин) для усиления или уничтожения определенных групповых антигенов крови. Ферменты удаляют сиаловую кислоту из мембраны эритроцитов, «разрушая» некоторые антигены и «усиливая» другие (разрушают антигены систем MNSs, Duffy, усиливают антигены систем Rh, Kidd, Lewis, I и P).
3. Химическая обработка тестовых эритроцитов сульфгидрильными реагентами, ZZAP (комбинированный реагент, содержащий дитиотреитол, папаин, активированный цистеином). Сульфгидрильные реагенты (дитиотреитол (DTT), 2-меркаптоэтанол (2-ME), унитиол) чаще используются для дифференцировки антител классов IgM и IgG. Используя их, необходимо помнить, что DTT денатурирует антигены системы Kell. ZZAP хорошо подходит для адсорбционных методов исследования аутоантител.

При невозможности идентификации аллоантител необходимо провести прямой антиглобулиновый тест и аутоконтроль. Положительный ПАГТ свидетельствует о наличии фиксированных на эритроцитах аутоантител, положительный аутоконтроль свидетельствует о наличии аутоантител в сыворотке. Аутоантитела могут быть как специфическими, так и неспецифическими.

II. Алгоритм действий при положительном прямом антиглобулиновом тесте (НАГТ и аутоконтроль — положительные или отрицательные)

Положительный прямой антиглобулиновый тест (реакция эритроцитов исследуемой крови с антиглобулиновыми сыворотками) может предоставить ценную информацию о реципиенте. ПАГТ может стать положительным по целому ряду причин:

А. Если реципиенту были перелиты несовместимые донорские эритроциты. При развитии аллоиммунизации и гемолитической трансфузионной реакции (посттрансфузионного осложнения) у реципиента в первые часы (дни) после гемотрансфузии НАГТ может оставаться отрицательным, так как антител еще мало и они все фиксируются на донорских эритроцитах, не оставаясь в плазме, вследствие чего ПАГТ становится положительным раньше, чем НАГТ.

Б. При трансплантации костного мозга или солидных органов лимфоциты, передающиеся с трансплантатом, могут вырабатывать антитела, направленные против антигенов системы АВО и других антигенных систем эритроцитов реципиента (чаще всего это бывает при несовместимых по АВО трансплантациях). Фиксация антител на эритроцитах реципиента может сопровождаться появлением положительного ПАГТ, а иногда даже приводит к гемолитическому кризу.

В. При аутоиммунной гемолитической анемии. Если у реципиента в анамнезе нет трансфузий эритроцитсодержащих компонентов, у него могут быть аутоантитела, фиксированные на собственных эритроцитах. Это будет влиять на интерпретацию результатов серологического тестирования реципиента и проб на совместимость. Аутоантитела могут «маскировать» клинически значимые аллоантитела, поэтому важно различать ауто- и аллоантитела [1, 2, 17]. В этом, в частности, могут помочь лабораторные данные о признаках гемолиза и анамнестические сведения о заболеваниях, при которых возможно развитие аутоиммунных процессов: системная красная волчанка, антикардиолипиновый синдром, лимфопролиферативные заболевания (хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфома и др.), злокачественные новообразования.

Г. В сыворотке исследуемой крови могут содержаться иммунные комплексы различных специфичностей, не имеющие отношения к эритроцитарным антигенам, которые могут активировать компоненты комплемента, неспецифически адсорбируемые на эритроциты. Но могут быть и комплементсвязывающие антитела, специфичные по отношению к какому-либо эритроцитарному антигену.

Д. У реципиентов, принимающих лекарственные препараты, возможно появление ассоциированного с приемом лекарств положительного ПАГТ, в основе чего лежат 4 механизма: адсорбция лекарственных препаратов (пенициллины), образование иммунного комплекса (хинидин, тетрациклин, хлорпромазин, р-аминосалициловая ксилота и др.), образование лекарственных аутоантител (метилдопа, леводопа, прокаинамид, диклофенак, интерферон и др.) и неспецифическая адсорбция (цефалотин и др.).

С учетом этих факторов, целесообразным представляется следующий алгоритм действий при положительном ПАГТ:

1. Сбор анамнестических данных, которые помогут определить, какие дальнейшие тесты необходимы

А. Переливались ли больному компоненты крови в последнее время и когда именно?

Б. Выполнялась ли больному трансплантация костного мозга или солидных органов?

В. Есть ли у больного признаки гемолиза (ретикулоцитоз, гемоглобинемия, гемоглобинурия, повышенные концентрации непрямого билирубина, лактатдегидрогеназы)?

Г. Принимает ли больной лекарственные препараты: хинидин, прокаинамид, α-метилдопа, антибиотики (пенициллин, цефалоспорины), антилимфоцитарный или антимоноцитарный иммуноглобулины и др.?

2. Серологическое тестирование с целью определения класса иммуноглобулинов или компонентов комплемента (карты DC-Screening I: IgG, IgM, IgA, C3c, C3d, ctl)

Таблица 2. Результаты использования антиглобулиновых реагентов
Table 2. *Results of applying antiglobulin reagents*

Прямой антиглобулиновый тест при: *Direct antiglobulin test for:*	Полиспецифический *Multispecific*		Моноспецифический *Monospecific*								
	анти-IgG+C3 *Anti-IgG+C3*	анти-C3+C4 *Anti-C3+C4*	анти-IgG *Anti-IgG*	анти-IgM *Anti-IgM*	анти-IgA *Anti-IgA*	анти-C3 *Anti-C3b*	анти-C3b *Anti-C3b*	анти-C3d *Anti-C3d*	анти-C4 *Anti-C4*	анти-C4b *Anti-C4b*	анти-C4d *Anti-C4d*
ГБН: при АТ к АВО	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
при анти-Ika	+++	+++	0/+	0	0	+++	0	+++	0	0	0
при анти-Rh и др.	++++	0	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
HDN: ABO antibodies	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
anti-Ika	+++	+++	0/+	0	0	+++	0	+++	0	0	0
anti-Rh and others	++++	0	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
ПТР: связывающие комплемент;	+++	+++	0/+	+++	+	+++	0	+++	0	0	0
все другие (Rh)	+++	0	+++	+		0	0	0	0	0	0
PTR: bound complement;	+++	+++	0/+	+++	+	+++	0	+++	0	0	0
others (Rh)	+++	0	+++	+		0	0	0	0	0	0
Тепловая аутоиммунная гемолитическая анемия: *Warm antibody hemolytic anemia:*											
20 % больных	++++	++++	0	0/+	0/+	++++	0	++++	++	0	++
50 % больных	++++	++++	+++	0/+	0/+	++++	0	++++	++	0	++
30 % больных	++++	0	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
20 % of patients	++++	++++	0	0/+	0/+	++++	0	++++	++	0	++
50 % of patients	++++	++++	+++	0/+	0/+	++++	0	++++	++	0	++
30 % of patients	++++	0	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
Синдром холодовых агглютининов	+++	+++	0	++	0	+++	0	+++	++	0	++
Cold agglutinin disease	+++	+++	0	++	0	+++	0	+++	++	0	++
Пароксизмальная холодовая гемоглобинурия	+++	+++	+	0	0	+++	0	+++	++	0	++
Paroxysmal cold hemoglobinuria	+++	+++	+	0	0	+++		+++	++	0	++
Аутоиммунная гемолитическая анемия смешанного типа	+++	+++	++	++	0	+++	0	+++	++	0	++
Mixed autoimmune hemolytic anemia	+++	+++	++	++	0	+++	0	+++	++	0	++
Индуцированные лекарственными препаратами: *Drug induced:*											
альдометиловые	+++	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
пенициллиновые	+++	0	+++	+	0	0	0	0	0	0	0
группа иммунных комплексов	+++	+++	0/+	0/+	0	+++	0	+++	++	0	++
aldomethyl	+++	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
penicillin	+++	0	+++	+	0	0	0	0	0	0	0
group of immune complexes	+++	+++	0/+	0/+	0	+++	0	+++	++	0	++

Примечание. ГБН — гемолитическая болезнь новорожденных, ПТР — посттрансфузионные реакции.
Note. HDN — hemolytic disease of the newborn, PTR — post-transfusion reactions.

В зависимости от конкретной причины (патологического состояния) ПАГТ может быть положительным с одними антиглобулиновыми реагентами и отрицательным с другими, что можно использовать для дифференциальной диагностики. В таблице 2 представлены результаты, которые можно получить при использовании моно- и полиспецифических антиглобулиновых реактивов [2, 9].

3. Применение метода элюции для скрининга антител при положительном ПАГТ

Фиксированные на эритроцитах антитела при элюции высвобождаются с поверхности сенсибилизированных эритроцитов в функционально активной форме и поэтому могут быть идентифицированы. Принцип элюции — разрыв нековалентных связей, удерживающих комплексы «антиген—антитело» на поверхности эритроцитов. Это может быть достигнуто нагреванием, замораживанием-оттаиванием, использованием кислот. Скрининг и идентификацию антител проводят с элюатом. Можно увеличить реактивность элюата, тестируя его с энзимированными эритроцитами скрининговой или идентификационной панели (но следует помнить, что некоторые антигены эритроцитов разрушаются ферментами).

Если причиной положительного ПАГТ является ГТР или ГБН, то в элюате обычно удается детектировать специфические антитела, их же обнаруживают в сыворотке реципиента или в сыворотке крови матери (иногда реакция в НАГТ может быть слабой).

Если элюат реагирует со всеми тестовыми эритроцитами, вероятной причиной этого являются аутоантитела.

В случае положительного ПАГТ, если в сыворотке не обнаружено аллоантител (НАГТ отрицательный) и больному не проводились трансфузии эритроцитсодержащих компонентов в течение последних 2 месяцев, можно сделать вывод о присутствии только аутоантител. Дальнейшие исследования этих аутоантител проводить не нужно.

III. Алгоритм действий при положительном аутоконтроле (НАГТ и ПАГТ — положительные или отрицательные)

Положительный аутоконтроль позволяет отличить аутоантитела от специфических аллоантител. Если проба проводится при комнатной или более низкой температурах, положительный результат позволяет предположить присутствие в исследуемой крови холодовых аутоантител, которые, вызывая при рутинных исследованиях панагглютинацию, могут приводить к ошибочным заключениям о группе системы АВО и резус-фенотипах, а также иногда маскировать клинически значимые антитела (IgG). Тепловые аутоантитела активны при более высокой температуре. Присутствие в сыворотке тепловых аутоантител может затруднить детекцию аллоантител и интерпретацию проб на совместимость.

При положительном аутоконтроле для дальнейшего исследования на возможное наличие аллоантител необходимо удалить или снизить активность неспецифических аутоантител в исследуемой сыворотке. С этой целью применяются различные методы адсорбции.

Необходимо прежде всего выяснить трансфузионный анамнез реципиента:

1. При отсутствии трансфузий эритроцитсодержащих компонентов в анамнезе и наличии холодовых **аутоантител** для выявления аллоантител можно использовать следующие методики.

а) процедура предварительного нагревания, когда тестируемые сыворотки и эритроциты инкубируются при температуре 30–37 °С перед их смешиванием;

б) использование моноспецифической АГС с анти-IgG антителами вместо полиспецифической антиглобулиновой сыворотки;

в) холодовая аутоадсорбция для удаления холодовых аутоантител;

г) нейтрализация холодовых антител, для чего могут быть использованы следующие вещества: субстанция P1, субстанция Le^a и Le^b (растворимый антиген, обнаруженный в плазме и слюне), субстанция I (можно найти в грудном молоке), субстанция Sda, полученная из мочи человека или морской свинки.

2. При отсутствии трансфузий эритроцитсодержащих компонентов в анамнезе и наличии тепловых **аутоантител** для выявления аллоантител следует использовать аутологичную или аллогенную адсорбцию. Методы аутологичной адсорбции предпочтительны для определения аллоантител у больных, которым трансфузии эритроцитсодержащих компонентов не проводились в течение 2–4 месяцев. При аутоадсорбции используются собственные эритроциты больного.

3. Недавние трансфузии эритроцитсодержащих компонентов и наличие **тепловых аутоантител**.

Аутоадсорбция не проводится, если больному проводились трансфузии эритроцитсодержащих компонентов в течение последних 2 месяцев и в исследуемом образце отмечается положительный ПАГТ, часто с появлением смешанной агглютинации. В этом случае целесообразно провести элюцию, особенно если при идентификации антител получают неопределенные результаты. В этом случае аутоконтроль у больного может быть положительным, а сыворотка может реагировать слабоположительно с большинством тестовых клеток.

Если ПАГТ и НАГТ положительны со всеми тестируемыми клетками, необходимо провести аллоадсорбцию. Методы аллогенной адсорбции предпочтительны для определения аллоантител у больных, которым в течении последних 2–4 месяцев проводились трансфузии эритроцитсодержащих компонентов. При аллоадсорбции, поскольку специфичность аллоантител неизвестна, сыворотка разливается на аликвоты, и для адсорбции разных аликвот используются эритроциты нескольких фенотипов. Если известен фенотип реципиента, число подбираемых эритроцитов для адсорбции можно сократить.

Были разработаны схемы, определяющие алгоритм действий врача-лаборанта, врача-трансфузиолога при возникающих проблемах серологического тестирования (рис. 1, 2).

Пример 1. Больная О., ИБ № 111827, 81 год. Поступила с жалобами на периодические боли в правом подреберье, слабость в течение последней недели, кожный зуд. В течение последнего месяца отмечала желтушность кожных покровов. Цвет кала и мочи, со слов больной, не менялись. Температура тела оставалась нормальной. В анамнезе — холецистэктомия в 1995 г. Гемотрансфузии отрицала. Акушерский анамнез: 10 беременностей, 2 родов, 8 медицинских абортов. Больной в связи с нормоцитарной гипохромной анемией (эритроциты $2{,}1\times10^{12}$/л, гемоглобин 48 г/л, гематокрит 19,4) показано переливание эритроцитсодержащих компонентов крови. Было выполнено стандартное иммуногематологическое обследование больной: определена группа крови по системам АВО и резус, проведен скрининг антител в гелевых картах в НАГТ(I–IV). Сыворотка больной агглютинировала

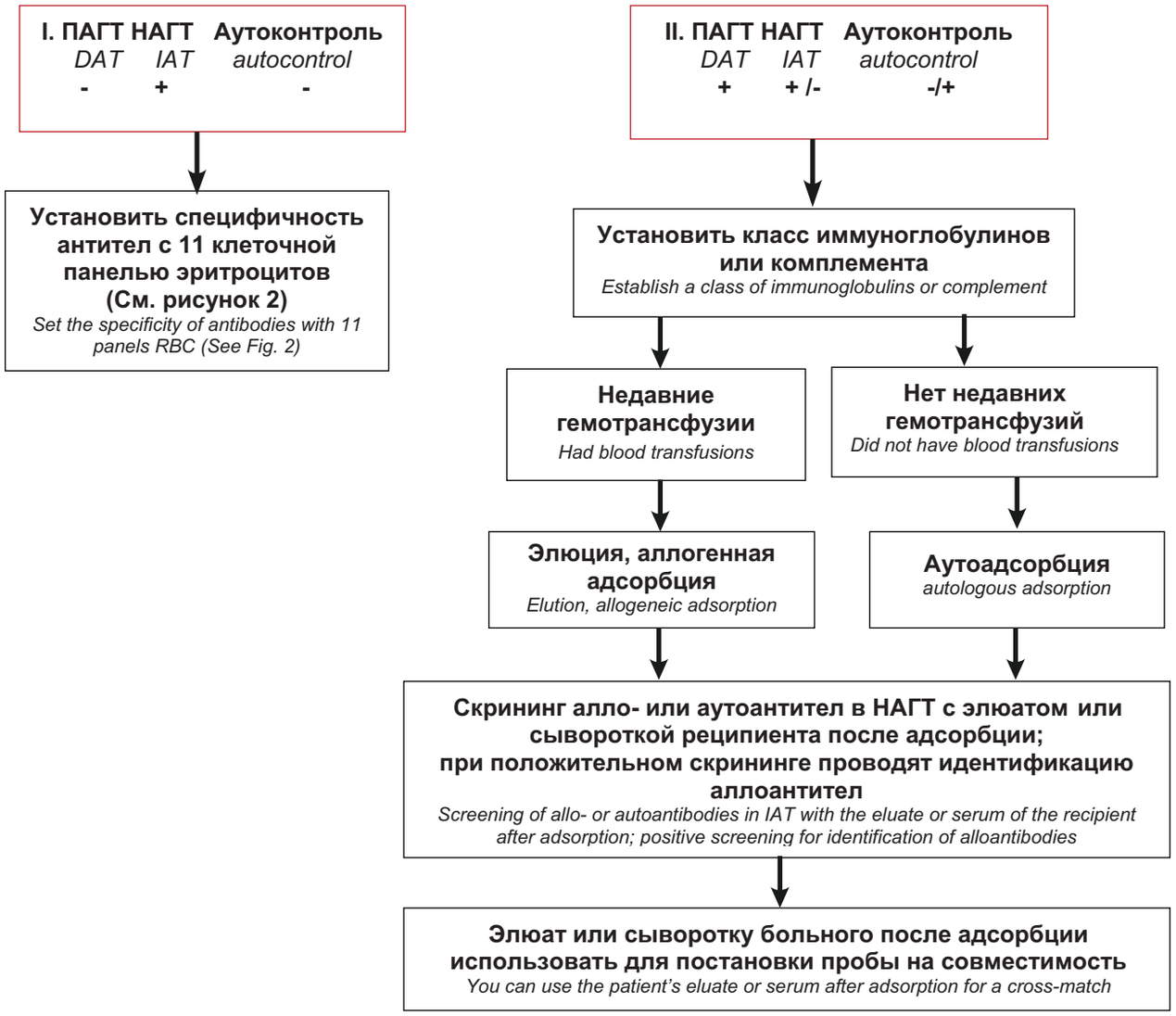

Рисунок 1. Схема алгоритма действий врача при серологическом тестировании антител
Примечание. ПАГТ — прямой антиглобулиновый тест, НАГТ — непрямой антиглобулиновый тест.

Figure 1. *The scheme of the algorithm of the doctor's actions in the serological testing of antibodies*
Note. DAGT — Direct antiglobulin test, IAGT — indirect antiglobulin test.

все стандартные эритроциты, силу реакции оценили на 3+. Идентифицировать антитела не удалось, так как сыворотка больной агглютинировала все стандартные клетки (I–XV), на 3+. На собственных эритроцитах выявлены фиксированные антитела: ПАГТ 4+, класс иммуноглобулинов IgG. Реакция собственной сыворотки с аутологичными эритроцитами (аутоконтроль) была положительной на 4+. Проведены дополнительные клинико-лабораторные исследования для выявления причины анемии. В анализах крови были идентифицированы признаки гемолиза: ретикулоциты 18,3 % (норма 0,20–2,05), или $312{,}3 \times 10^9$/л (норма 7,00–104,50), гипербилирубинемия (билирубин общий 103,5 мкмоль/л, билирубин непрямой 94,2 мкмоль/л), лактатдегидрогеназа 1212,00 ед/л. Кроме того, был выявлен дефицит витамина B_{12} — 111,00 пмоль/л (норма 142,00–725,00). На основании результатов выполненных исследований был установлен диагноз: аутоиммунная гемолитическая анемия с тепловыми антиэритроцитарными антителами класса IgG, B_{12}-дефицитная анемия. Отсутствие в течение 2 месяцев трансфузий эритроцитсодержащих компонентов позволило выполнить адсорбцию тепловых аутоантител собственными эритроцитами больной (аутологичная адсорбция). Скрининг аллоиммунных антител был выполнен после проведения аутоадсорбции сыворотки в НАГТ (I–IV). Был получен отрицательный результат, свидетельствующий об отсутствии аллоиммунных антител у больной. Пробы на совместимость с донорскими эритроцитами были проведены с сывороткой после аутоадсорбции. Подобранные 4 дозы аллогенных эритроцитов были перелиты без осложнений.

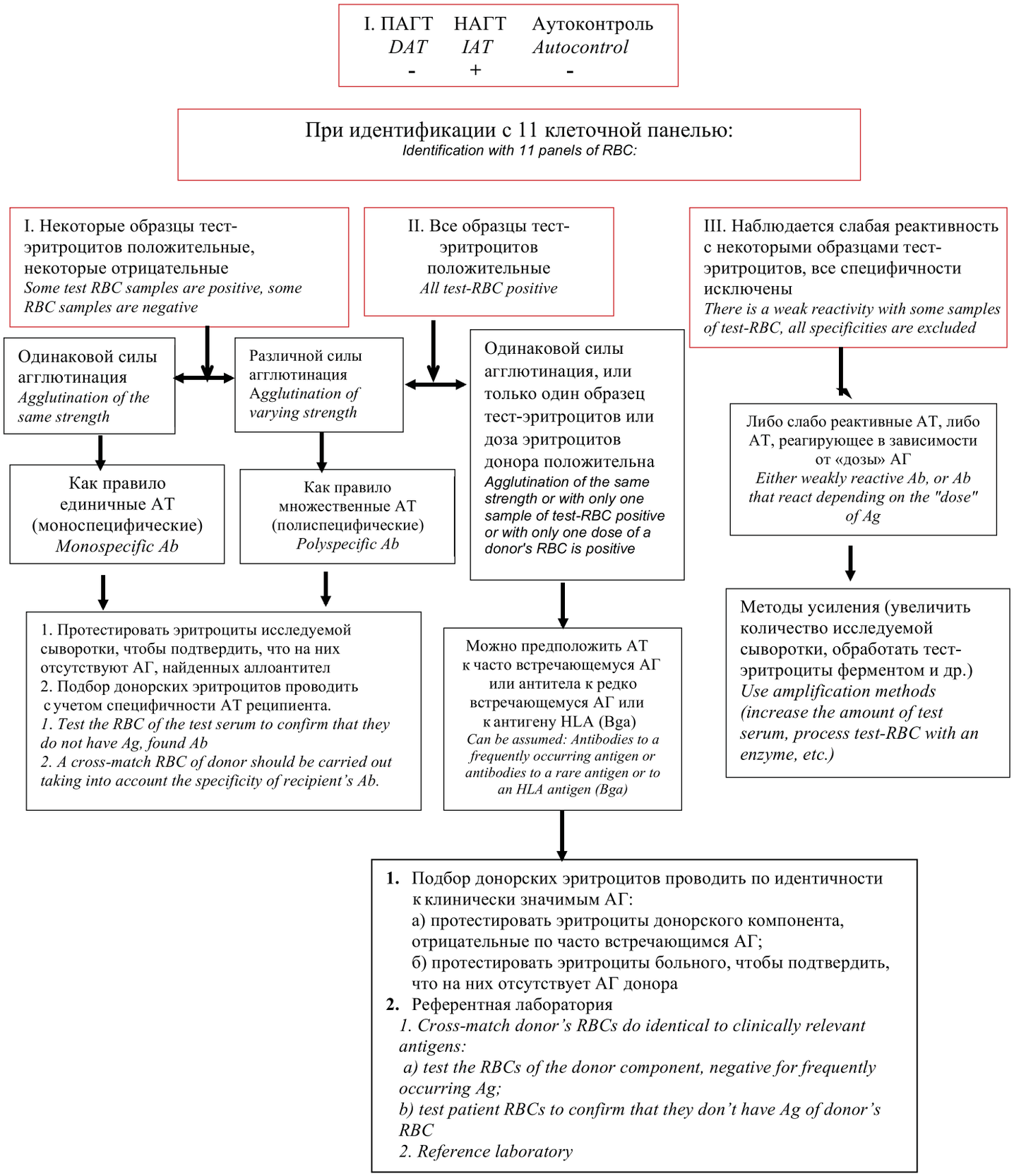

Рисунок 2. Алгоритм действий врача при идентификации антител

Примечание. ПАГТ — прямой антиглобулиновый тест, НАГТ — непрямой антиглобулиновый тест.

Figure 1. *The scheme of the algorithm of the doctor's actions in the serological testing of antibodies*

Note. DAGT — Direct antiglobulin test, IAGT — indirect antiglobulin test, AB — antibodys, AG — antigen, HLA — histocompatibility antigens.

Пример 2. Больной Л., 31 год. Диагноз: Гемолитическая анемия неясного генеза, спленомегалия. В анамнезе было переливание донорских эритроцитов за 3 недели до обследования. Планировалась спленэктомия. Были выполнено стандартное иммуногематологическое обследование больного: определена группа крови систем АВО и Резус, проведен скрининг антител в гелевых картах в НАГТ(I–IV). Сыворотка больного агглютинировала все стандартные эритроциты, силу реакции оценили на 4+. Идентифицировать специфичность антител не удалось, так как сыворотка больного агглютинировала все стандартные клетки (I–XV) на 4+. На собственных эритроцитах выявлены фиксированные антитела: ПАГТ 4+, класс иммуноглобулинов IgG. Реакция собственной сыворотки с аутологичными эритроцитами (аутоконтроль) была положительной на 4+. Для проведения аллогенной адсорбции, учитывая недавнюю трансфузию эритроцитсодержащих компонентов, определяли расширенный фенотип реципиента по клинически значимым антигенам систем Rh, Kell, Duffy Kidd, MNS, Lutheran, Lewis, P. Фенотип был определен как: D+, C+, c+, E-, e+, K-, k+, Kp^a-, Kp^b+, S+, s+, Fy^a+, Fy^b+, Le^a-, Le^b+, P1+, Lu^a-, Jk^a +, Jk^b +, антигены M, N, Lu^b определить не удалось, т. к. выявлены две популяции эритроцитов. Проводили адсорбцию сыворотки больного донорскими эритроцитами (аллогенная адсорбция), учитывая результаты расширенного фенотипирования. Оценить результаты аллогенной адсорбции не представлялось возможным из-за гемолизированной сыворотки больного. Тогда была проведена тепловая элюция фиксированных на аутологичных эритроцитах антител. С полученным элюатом был выполнен скрининг антиэритроцитарных антител со стандартными эритроцитами I–IV при температуре 37 °С, были выявлены аллоиммунные антитела. Специфичность выявленных аллоантител определена с помощью 15-клеточной панели стандартных эритроцитов как анти-M, -S. Из базы данных банка замороженных донорских эритроцитов были подобраны донорские эритроциты, не содержащие антигены M и S. Перед трансфузией пробы на совместимость были проведены с элюатом, результаты которых были отрицательные, то есть совместимы с донорскими эритроцитами. Проведена трансфузия эритроцитсодержащих компонентов без осложнений.

Таким образом, целью предтрансфузионного тестирования реципиентов и доноров является подбор совместимых компонентов донорской крови, который может представлять трудности, обусловленные заболеванием больного, особенностями его генетической или иммунной системы, влиянием различных анамнестических факторов (беременностей, предыдущих гемотрансфузий и др.). Врач-иммуногематолог должен максимально полно провести иммуносерологические исследования перед трансфузией, чтобы избежать возможных осложнений. Представленные в настоящей работе алгоритмы помогут систематизировать действия по повышению иммунологической безопасности трансфузионной терапии.

Литература

1. Garratty G., Arndt P.A. Positive direct antiglobulin tests and hemolytic anemia following therapy with beta-lactamase inhibitor containing drugs may be associated with nonimmunologic adsorption of protein onto red blood cells. Br J Haematology.1998; 100: 777–83.

2. Issitt P.D., Anstree D.J. Applied blood group serology. 4th ed. Montgomery: Scientific Publications; 1998. 1208 p.

3. Milkins C., Berryman J., Cantwell C., et. al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology. Transfusion Medicine. 2013; 23(1): 3–35.

4. Минеева Н.В., Бодрова Н.Н., Заварзина О.А. и др. Анализ ошибок при проведении иммуногематологических исследований. Вестник службы крови. 2007; 2: 3–5.

5. Минеева Н.В. Совершенствование системы обеспечения трансфузий, совместимых по антигенам эритроцитов. Здравоохранение и медицинская техника. 2004; 5(9): 25–7.

6. Минеева Н.В., Бутина Е.В. Иммуногематологическое обследование доноров крови и (или) ее компонентов и реципиентов. Методические указания МУ ФМБА России 11.6.1-2017.

7. Пашкова И.А., Рыжанова Л.Г., Федоренко Т.В. и др. Анализ специфичности аллоиммунных антител, выявленных у реципиентов. Гематология и трансфузиология. 2009; 54(5): 31–4.

8. Pashkova I., Porhanov V., Gilevich I., et al. Surgeon patients and Transfusion in a Krasnodar regional hospital. Vox Sanguinis. 2013; 105(1): 266.

References

1. Garratty G., Arndt P.A. Positive direct antiglobulin tests and hemolytic anemia following therapy with beta-lactamase inhibitor containing drugs may be associated with nonimmunologic adsorption of protein onto red blood cells. Br J Haematology.1998; 100: 777–83.

2. Issitt P.D., Anstree D.J. Applied blood group serology. 4th ed. Montgomery: Scientific Publications; 1998. 1208 p.

3. Milkins C., Berryman J., Cantwell C., et. al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology. Transfusion Medicine. 2013; 23(1): 3–35.

4. Mineeva N.V., Bodrova N.N., Zavarzina O.A., et al. Error analysis during immunohematological studies. Vestnik sluzhby krovi. 2007; 2: 3–5 (In Russian).

5. Mineeva N.V. Improving the system for ensuring transfusions compatible with red blood cell antigens. Zdravoohranenie i medicinskaya tekhnika. 2004; 5(9): 25–7 (In Russian).

6. Mineeva N.V., Butina E.V. Immunohematological examination of blood donors and/or its components and recipients. Metodicheskie ukazaniya MU FMBA Rossii 11.6.1-2017 (In Russian).

7. Pashkova I.A., Ryzhanova L.G., Fedorenko T.V., et al. Analysis of the specificity of alloimmune antibodies detected in recipients. Gematologiya i transfuziologiya. 2009; 54(5): 31–4 (In Russian).

8. Pashkova I., Porhanov V., Gilevich I., et al. Surgeon patients and Transfusion in a Krasnodar regional hospital. Vox Sanguinis. 2013; 105(1): 266.

9. Brecher M.E. (editor). Technical Manual AABB, 15th Edition. 2005. 407–81 p.
10. Haas F.J.L.M., van Rhenen D.J., de Vries R.R.P. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transfusion Medicine. 2004; 14: 59–73.
11. Минеева Н.В. Группы крови человека. Основы иммунологии. СПб.; 2004. 188 с.
12. Прокоп О., Гелер В. Группы крови человека. М.: Медицина; 1991. 511 с.
13. Минеева Н.В. Антитела к антигенам эритроцитов и методы их выявления. Методические рекомендации. СПб.; 2000. 14 с.
14. Минеева Н.В., Бодрова Н.Н., Трофимова С.А. Значение ферментного метода для выявления клинически значимых антиэритроцитарных антител. Новое в трансфузиологии. 2001; 29: 55–8.
15. Klapper E., Zhang Y., Figueroa P., et. al. Toward extended phenotype matching: a new operational paradigm for the transfusion service. Transfusion. 2010; 50(3): 536–46.
16. Sapatnekar S., Figueroa P.I. How do we use molecular red blood cell antigen typing to supplement pretransfusion testing? Transfusion. 2014; 54(6): 1452–8.
17. Garratty G., Postoway N., Nance S., Brunt D. Spontaneous agglutination of red cells with a positive direct antiglobulin test in various media. Transfusion. 1984; 24: 214–7.

Информация об авторе

Пашкова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, заведующая отделением переливания крови Краевой клинической больницы № 1 им. С.В. Очаповского Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: irpash@mail.ru, тел.: +7(861)252-52-59, +7(906)187-21-81;
350086, г. Краснодар, ул. 1 Мая, д. 167.
ORCID: http: //orcid.org/0000-0003-0850-7343

Поступила: 16.02.2019
Принята к печати: 14.05.2019

9. Brecher M.E. (editor). Technical Manual AABB, 15th Edition; 2005. 407–81 p.
10. Haas F.J.L.M., van Rhenen D.J., de Vries R.R.P. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transfusion Medicine. 2004; 14: 59–73.
11. Mineeva N.V. Blood groups. Osnovy immunologii. St. Petersburg; 2004. 188 p. (In Russian).
12. Prokop O., Geler V. Blood groups. Moscow: Medicine; 1991. 511 p. (In Russian).
13. Mineeva N.V. Antibodies to erythrocyte antigens and methods for their detection. Guidelines. St. Petersburg; 2000. 14 p. (In Russian).
14. Mineeva N.V., Bodrova H.H., Trofimova S.A. The value of the enzyme method for the detection of clinically significant anti-erythrocyte antibodies. Novoe v transfuziologii. 2001; 29: 55–8 (In Russian).
15. Klapper E., Zhang Y., Figueroa P., et. al. Toward extended phenotype matching: a new operational paradigm for the transfusion service. Transfusion. 2010; 50(3): 536–46.
16. Sapatnekar S., Figueroa P.I. How do we use molecular red blood cell antigen typing to supplement pretransfusion testing? Transfusion. 2014; 54(6): 1452–8.
17. Garratty G., Postoway N., Nance S., Brunt D. Spontaneous agglutination of red cells with a positive direct antiglobulin test in various media. Transfusion. 1984; 24: 214–7.

Information about the author

Irina A. Pashkova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Blood Transfusion Department, Research Institute — Regional Clinical Hospital 1 n.a. Prof. S.V. Ochapovsky,
e-mail: irpash@mail.ru, тел.: +7(861)252-52-59, +7(906)187-21-81;
350086, Krasnodar, 1st of May str., 167.
ORCID: http: //orcid.org/0000-0003-0850-7343

Received 16 Feb 2019
Accepted 14 May 2019