

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации
А.И.ВЯЛКОВ
17 мая 2000 г.

СОГЛАСОВАНО
Начальник Управления
научно-исследовательских
медицинских учреждений
С.Б.ТКАЧЕНКО
17 мая 2000 г.

АЛГОРИТМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ И АНТИЭРИТРОЦИТАРНЫХ АНТИТЕЛ В СЛОЖНОДИАГНОСТИРУЕМЫХ СЛУЧАЯХ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ N 99/181

АННОТАЦИЯ

Методические рекомендации содержат алгоритмы, позволяющие провести диагностику сложновывявляемых вариантов антигенов эритроцитов (при исследовании группы крови и резус-принадлежности), а также исследование сывороток доноров и реципиентов на наличие антител к антигенам эритроцитов. Материал составлен с учетом международных требований, предъявляемых к иммуногематологическим исследованиям эритроцитов. Предложены новые варианты выявления причин положительных реакций при постановке пробы на совместимость перед гемотрансфузией. Материал иллюстрирован схемами.

Методические рекомендации предназначены для врачей и лаборантов СПК и лечебно-профилактических учреждений, занимающихся иммуногематологическими исследованиями крови доноров и реципиентов.

Организация-разработчик: Российский НИИ гематологии и трансфузиологии г. Санкт-Петербург.

Авторы: д.б.н. Минеева Н.В., врач Бодрова Н.Н., Гордеева Н.Ф., Андреева А.В., Артамонова В.Ю., Гетманец О.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Ошибки при определении группы крови, резус-принадлежности, исследовании антител к антигенам эритроцитов доноров и реципиентов могут явиться причиной возникновения посттрансфузионных осложнений гемолитического типа. Поэтому достоверная диагностика антигенов и антиэритроцитарных антител очень важна.

Ошибки в типировании антигенов эритроцитов могут быть обусловлены как техническими погрешностями и индивидуальными особенностями исследуемой крови, так и недостаточно высоким качеством применяемых реактивов. В настоящих методических рекомендациях подробно изложены ошибки, возникающие при исследовании антигенов эритроцитов и постановке пробы на совместимость, обусловленные индивидуальными особенностями исследуемой крови.

Антигены групп крови не являются изолированными от условий окружающей среды и могут модифицироваться при ее изменении. Ослабление выраженности антигенных детерминант на эритроцитах описано у больных онкологическими и гематологическими заболеваниями, беременных женщин, септических больных. При этом возникают определенные трудности с типированием антигенов эритроцитов.

Присутствие в исследуемой крови аутоантител также может искажать результаты исследования антигенов и антител в том случае, если аутоантитела вызывают неспецифическую агглютинацию эритроцитов. Поэтому при получении достоверного результата особенно важно уметь диагностировать неспецифические ауто- и аллоантитела.

Низкая активность аллоантител в сыворотке может также явиться причиной получения неправильного результата при определении группы крови или при проведении пробы на совместимость крови донора и реципиента. В данных методических рекомендациях содержится описание методик проведения исследования сложнодиагностируемых вариантов антигенов эритроцитов системы АВО и Резус, а также выявления аллоантител, имеющих клиническое значение. Впервые при описании приемов учтены современные международные требования к проведению иммуногематологических исследований эритроцитов.

Формула метода

Алгоритмы выявления антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител в сложнодиагностируемых случаях (ложноположительные и ложноотрицательные результаты исследования) заключаются в дифференцированной диагностике специфических и неспецифических ауто- и аллоантител в результате чего обеспечивается правильность определения группы крови, резус-принадлежности, а также достоверность результатов постановки пробы на совместимость крови доноров и реципиентов.

Показания к использованию алгоритмов

Алгоритмы исследования антигенов и антител необходимо применять: 1. При расхождении результатов определения группы крови и резус-принадлежности с результатами исследования, полученными ранее или результатами исследования, полученными в других лабораториях. 2. При несовпадении результатов исследования группы крови со стандартными сыворотками и стандартными эритроцитами. 3. При установлении специфичности антител к антигенам эритроцитов в случае наличия в исследуемом образце неспецифических ауто- и аллоантител, затрудняющих подбор совместимых пар донор-реципиент.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ОПИСАННЫХ АЛГОРИТМОВ ОТСУТСТВУЮТ

Материально-техническое обеспечение методов

1. Реактивы для определения группы крови, резус-принадлежности, приготовленные в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ N 2 от 09.01.98. "Об утверждении инструкций по иммуносерологии".

2. Система диагностическая для типирования антигенов эритроцитов и выявления антиэритроцитарных антител (карты ДиаМед Швейцария), N 95/401. Государственный реестр медицинских изделий. М. 1996.

3. Стандартные эритроциты, заготовленные в соответствии с "Инструкцией по изготовлению стандартных эритроцитов и их применению в изосерологических исследованиях". Приказ МЗ РФ N 2 от 09.01.98.

ОПИСАНИЕ АЛГОРИТМОВ

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГРУППЫ КРОВИ В СЛОЖНОДИАГНОСТИРУЕМЫХ СЛУЧАЯХ

При исследовании групповой принадлежности крови доноров и реципиентов могут наблюдаться отклонения от обычной картины агглютинации. Это выражается в отсутствии специфической или наличии неспецифической агглютинации, а также несовпадении результатов исследования по стандартным сывороткам и стандартным эритроцитам. Порядок проведения исследования групповой принадлежности крови, методические приемы, а также причины расхождений результатов приведены на схеме 1.

ВЫЯСНЕНИЕ ПРИЧИН РАСХОЖДЕНИЙ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ
ГРУППЫ КРОВИ

Результат исследования отличается от предыдущего



Повторить исследование на свежевзятом образце крови



Повторное исследование показывает такое же отличие. Результаты исследования со стандартными эритроцитами и стандартными сыворотками не совпадают.



Отрицательный результат по сравнению с ожидаемым (отсутствие ожидаемой агглютинации)



Положительный результат по сравнению с ожидаемым (наличие неожиданной агглютинации)



Повторить исследование с модификациями:
- Увеличить соотношение сыворотки к эритроцитам до 1:20
- Уменьшить T град. реакции, увеличить время инкубации до 30-60 минут при 8 град. C
- Исследовать результат под микроскопом
- Использовать разные типы реактивов



Провести исследование в соответствии со схемой на следующей странице

Причины слабой агглютинации:
Ослабление экспрессии антигенов при заболевании, беременности, из-за возрастных изменений, прием лекарственных средств.

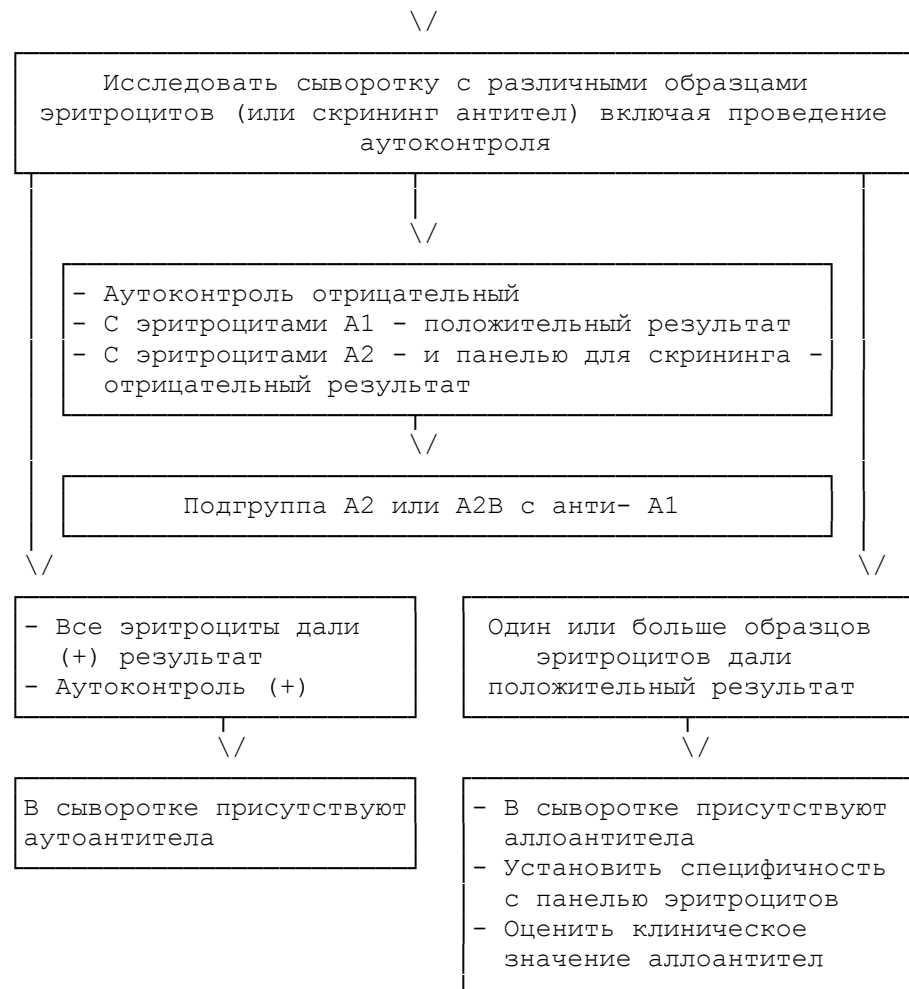
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ ПО СРАВНЕНИЮ С ОЖИДАЕМЫМ

Исследование эритроцитов



Исследование сыворотки





ПРАВИЛА, КОТОРЫЕ НАДО СОБЛЮДАТЬ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ
ГРУППЫ КРОВИ:

- Использовать для исследования реактивы, в качестве которых нет сомнения.
- Исследование необходимо проводить перекрестным способом. Не использовать для исследования эритроциты А, В и О от произвольно взятых лиц, применять только стандартные эритроциты.
- Использовать изогемагглютинирующую сыворотку АВ для контроля специфичности реакции агглютинации.
- Кровь для исследования брать до проведения больному гемотрансфузий, так как трансфузии несовместимой крови и больших объемов компонентов от лиц группы крови 0 могут приводить к последующему неправильному заключению о групповой принадлежности.
- Кровь для исследования брать до переливания плазмозамещающих растворов (для исключения ошибок, вызванных склеиванием эритроцитов в монетные столбики).
- Обращать внимание на диагноз. Ошибки чаще встречаются при исследовании крови больных онкологическими, гематологическими заболеваниями, беременных женщин.
- Взятие крови и определение групповой принадлежности производить дважды с использованием каждый раз двух серий сывороток.

Проведение исследования групповой принадлежности крови при наличии в исследуемой сыворотке Холодовых антител

1. Взять кровь у больного в теплую пробирку, которую поместить в термоконтейнер и транспортировать в лабораторию на исследование.
2. Поместить исследуемый образец крови в термостат при +37 град. С и держать там до окончания проведения исследования.
3. Предварительно нагреть раствор натрия хлорида 0,9%; стандартные сыворотки; эритроциты и плоскость, поместив их в термостат.
4. Провести исследование группы крови на теплой плоскости, подогретыми реактивами перекрестным способом со стандартными эритроцитами.
5. При необходимости произвести отмывание исследуемых эритроцитов теплым раствором натрия хлорида (наличие аутоантител на эритроцитах).
6. Если результаты исследования стандартными сыворотками и стандартными эритроцитами совпадают, агглютинация исследуемой сыворотки со стандартными эритроцитами О отсутствует и изогемагглютинирующая сыворотка группы АВ не агглютинирует исследуемые эритроциты, то группа крови определена правильно.
7. Если результаты исследования стандартными сыворотками и стандартными эритроцитами совпадают, агглютинация исследуемых эритроцитов с сывороткой АВ отсутствует, но исследуемая сыворотка взаимодействует с некоторыми образцами эритроцитов О - это свидетельствует о присутствии в сыворотке специфических Холодовых аллоантител. Для установления специфичности указанных антител необходимо провести исследования сыворотки с панелью эритроцитов, типированных по антигенам систем MNS, P.
8. Если результаты исследования стандартными сыворотками и стандартными эритроцитами не совпадают, исследуемая сыворотка все еще агглютинирует все образцы эритроцитов О (иногда включая собственные), это означает присутствие в исследуемом образце Холодовых аутоантител. Правильное исследование группы крови возможно после адсорбции аутоантител.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ В СЛОЖНОДИАГНОСТИРУЕМЫХ СЛУЧАЯХ

При исследовании резус-принадлежности крови наблюдаются ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

Ложноположительные результаты:

- Ошибочное использование реактива другой специфичности.
- В реактиве, используемом для определения резус-принадлежности, содержатся антитела дополнительной специфичности (например, а анти-К, -С, -Fu и так далее).
- На исследуемых эритроцитах присутствуют аутоантитела.
- Полиагглютинабельность исследуемых эритроцитов.
- Бактериальное загрязнение крови.

Ложноотрицательные результаты:

- Ошибочное использование другого реактива.
- Недостаточно-высокое качество используемого реактива.
- Ослабление активности антигенов при заболеваниях.
- Использование реактива антирезус для метода исследования, который не указан на этикетке.
- Реактив антирезус не добавлен в исследуемый образец.
- Чрезмерно-интенсивное перемешивание взвеси эритроциты-реактив при проведении исследования, что приводит к распаду мелких агглютинатов

- Срок годности используемого реактива истек.

Возможные ошибки при определении резус-принадлежности крови

Наибольшие затруднения при определении резус-принадлежности крови вызывают интерпретации слабоположительных результатов реакции: когда агглютинация исследуемых эритроцитов с сывороткой анти-D оценивается положительной и представлена мелкими агглютинатами. Однако случаи слабоположительных реакций могут быть обусловлены несколькими причинами:

1) недостаточно высокое качество используемых для исследования реагентов, о чем свидетельствует слабоположительная реакция контрольных образцов с резус-положительной принадлежностью. Инструкция по определению резус-принадлежности крови предусматривает постановку таких контролей на серию исследований (ежедневный контроль качества реагента);

2) наличием на исследуемых эритроцитах аутоантител, вызывающих слабоположительную реакцию за счет связывания с компонентами реагента анти-резус (полиглобулином, желатином, альбумином). Исключить такие ложно-положительные реакции при определении резус-принадлежности крови возможно проведением предусмотренного инструкцией контроля на каждое исследование. Контроль представляет собой исследование образца с 33% полиглобулином или желатином и пр. (без анти-D антител);

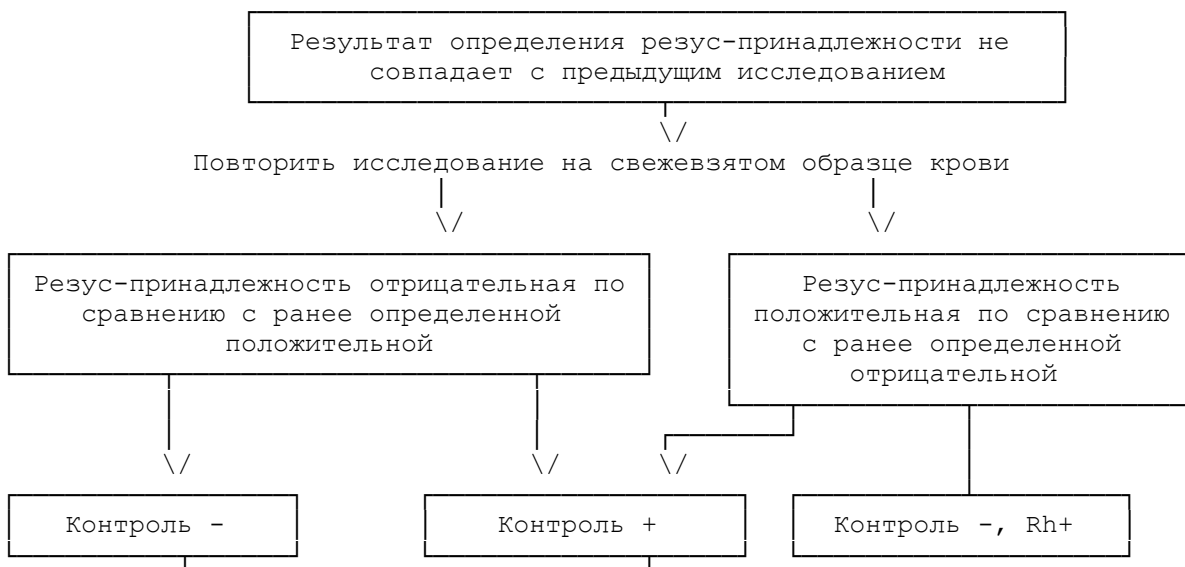
3) ослаблением активности антигенов системы Резус при заболеваниях. В этих случаях наблюдаются расхождения с результатами предыдущего определения резус-принадлежности у одного и того же лица: ранее определяемая Rh⁺ принадлежность крови выявляется как rh⁻ и наоборот.

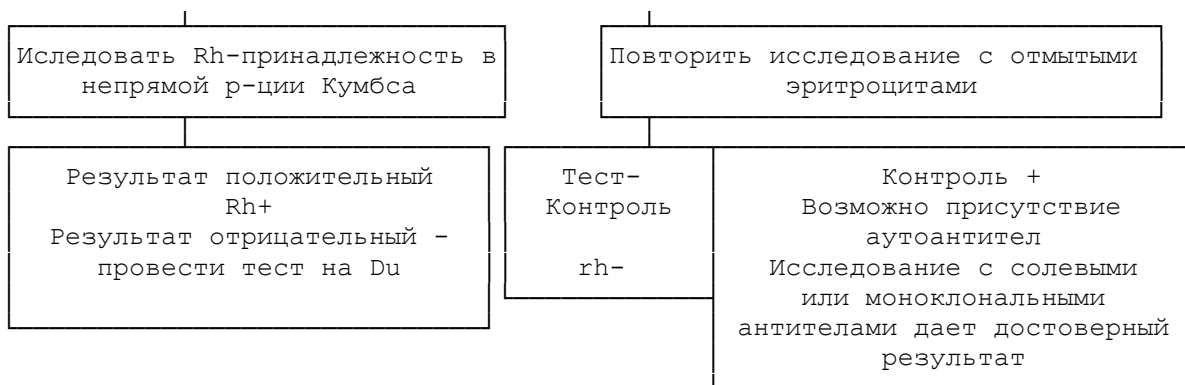
Чаще всего в таких случаях делают заключение о наличии антигена Du и, если исследуется кровь донора - резус-принадлежность расценивается положительной. Если исследуется кровь реципиента - резус-принадлежность расценивается как отрицательная.

На схеме 2 приведен алгоритм проведения исследования резус-принадлежности крови при расхождении результатов исследования.

Схема 2

Алгоритм исследования резус-принадлежности крови в сложнodiагностируемых случаях (с сыворотками анти-D)





ПОРЯДОК ИССЛЕДОВАНИЯ СЫВОРОТОК НА НАЛИЧИЕ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ЭРИТРОЦИТОВ

Антигены эритроцитов обладают способностью к стимуляции иммунного ответа при попадании в организм другого человека. При этом образуются антитела к антигенам эритроцитов, отсутствующим у данного индивида. Гемотрансфузии эритроцитов доноров, содержащих антигены, к которым у реципиентов имеются антитела, приводят к взаимодействию антигенов и антител и последующему внутрисосудистому или внесосудистому гемолизу перелитых эритроцитов и затем к посттрансфузионному осложнению.

В связи с этим во всем мире принято перед гемотрансфузией проводить исследование сывороток реципиентов на наличие антител к антигенам эритроцитов.

На первый взгляд кажется, что эффективнее осуществлять гемотрансфузии с учетом антигенного состава эритроцитов (фенотипа) доноров и реципиентов. Однако практика показала, что невозможно и дорого проводить типирование антигенов эритроцитов всех реципиентов и достаточно трудно, а иногда невозможно, подобрать пару донор-реципиент одинакового антигенного состава эритроцитов. В противном случае всегда существует риск развития иммунологического конфликта по другим антигенам эритроцитов. Поэтому считается наиболее целесообразным проводить гемотрансфузии с учетом специфичности антител, выявленных у реципиента предварительным скринингом.

| |
|---|
| <p>Аллоантитела к антигенам эритроцитов исследуют в следующих случаях:</p> <ul style="list-style-type: none"> - У доноров перед кроводачей, для того чтобы быть уверенным, что заготовленная гемотрансфузионная среда не содержит антител, способных вызвать гемолиз эритроцитов реципиентов (тромбовзвесь, плазма, эритроконцентрат). - У реципиентов перед гемотрансфузией, чтобы предотвратить гемотрансфузию, несовместимую по антигенам эритроцитов донора с антителами реципиента. - У беременных женщин для выявления возможного иммунологического конфликта с плодом по антигенам эритроцитов (для диагностики гемолитической болезни новорожденных). - При выяснении причин ложноположительных реакций при определении группы крови и постановке пробы на совместимость. |
|---|

| |
|--|
| <p>Аутоантитела исследуются в следующих случаях:</p> <ul style="list-style-type: none"> - При выявлении аутоенсибилизации к антигенам эритроцитов при некоторых аутоиммунных заболеваниях. - При диагностике гемолитической болезни новорожденных, обусловленной иммунологическим конфликтом мать-плод по антигенам эритроцитов. - При исследовании антител к лекарствам. - При выяснении причин ложноположительных реакций в аутоконтроле при |
|--|

Антитела к антигенам эритроцитов (аллоантитела) бывают двух видов: естественные (или регулярные) и иммунные (или нерегулярные).

Естественные антитела к антигенам эритроцитов являются врожденными, содержатся в сыворотке без иммунного стимула, и, обычно, направлены против антигенов эритроцитов системы АВО.

Нерегулярные антитела вырабатываются как результат иммунного стимула, когда в организм попадает антиген, отсутствующий у хозяина. Чаще всего это происходит при несовместимой гемотрансфузии или при несовместимой беременности.

По способности вызывать гемолиз эритроцитов доноров при несовместимых гемотрансфузиях и разрушение эритроцитов плода при иммунологическом конфликте мать-плод, антитела подразделяют на имеющие и не имеющие клиническое значение. Клинически значимые антитела, это антитела, способные вызывать разрушение эритроцитов, несущих соответствующий антиген. Анти-А, -В, антитела всегда имеют клиническое значение.

Среди иммунных антител (или нерегулярных), клиническое значение имеют только те антитела, которые активны в непрямом антиглобулиновом тесте, выполняемом при 37 град. С.

В последние годы многие исследователи описывают клинически значимые антитела, выявляемые только при использовании методов с применением ферментов. Фермент-зависимые антитела могут вызвать посттрансфузионные осложнения. Чаще всего фермент-зависимые антитела имеют специфичность анти-Е. В связи с тем, что во многих случаях указанные антитела не выявляются при скрининге в антиглобулиновом тесте, в некоторых странах введено обязательное дополнительное определение антител в методах с применением ферментов. Эффективным методом выявления фермент-зависимых антител является гелевый тест (Инструкция по применению идентификационных карт для выявления антител к антигенам эритроцитов в гелевом тесте микрометодом (ID-карты ДиаМед).

Объекты поиска антител

Кровь доноров

Кровь доноров исследуется на наличие антител к антигенам эритроцитов независимо от резус-принадлежности. В случае обнаружения антител (цельная кровь или плазма донора не должна использоваться для переливания) допускается приготовление отмытых или размороженных эритроцитов), целесообразно использовать такую кровь для изготовления типизирующих сывороток.

Титр и специфичность выявленных антител исследуют при каждой кроводаче. У доноров, не имеющих в сыворотке антител к антигенам эритроцитов, повторные исследования проводят один раз в год.

Кровь больных

Исследование крови больных на наличие антител к антигенам эритроцитов проводится в том случае, когда предполагается проведение гемотрансфузионной терапии.

Если известно, что больной имеет антитела, специфичность их должна устанавливаться каждый раз при проведении исследования для исключения антител другой специфичности, которые могли выработаться дополнительно.

Кровь беременных женщин

Исследование сыворотки на содержание антител к антигенам эритроцитов у беременных женщин проводят независимо от резус-принадлежности крови. Первичное

исследование желательно проводить в 16-20 недель беременности, в случае отсутствия антител в сыворотке повторно - в 30-32 недели. При обнаружении антител или наличии в анамнезе гемотрансфузий, выкидышей, мертворождений либо гемолитической болезни новорожденных исследование антител проводят в динамике ежемесячно, а также после родов.

Обязательным является исследование в сыворотке крови иммунных анти-А, анти-В антител, если группа крови женщины 0, А или В и не совпадает с группой крови мужа.

Требования к образцам крови, взятым на исследование

Для проведения исследования антител к антигенам эритроцитов можно использовать сыворотку или плазму. При использовании для исследования плазмы существует опасность не выявления слабоактивных антител за счет разведения.

Сроки сбора образцов на исследования зависят от наличия в анамнезе недавних трансфузий или беременностей. Нужно помнить, что у реципиента в результате повторных гемотрансфузий могут дополнительно выработаться антитела другой специфичности. Образцы на исследование нужно брать так, чтобы выявить возможные вновь образующиеся антитела.

Если реципиенту часто проводят гемотрансфузии, не нужно запрашивать образцы на исследование ежедневно, достаточно проводить выявление антител каждые 72 часа. В том случае, если предыдущие трансфузии проводились более, чем за 72 часа, новый образец сыворотки необходим в соответствии со схемой:

| | |
|-------------------------------|--|
| Больной получил трансфузию | Образец на исследование берут перед трансфузией не более, чем за |
| От 3 до 14 дней назад | 24 часа до трансфузии |
| От 14 до 28 дней назад | 72 часа до трансфузии |
| От 28 дней до 3 месяцев назад | 1 неделю до трансфузии |

Методы исследования антител

Главной проблемой при поиске антиэритроцитарных антител является выбор адекватных методов исследования. Данные о выявляемости антител различными методами приведены в таблице 1. Из таблицы видно, что метод выявления антител с применением 33% раствора полиглобулина мало пригоден для поиска антиэритроцитарных антител: во-первых, метод не позволяет выявлять антитела любой специфичности, присутствующие в сыворотке в низком титре, во-вторых, не выявляет антитела к некоторым системам антигенов эритроцитов (например, Даффи и Кидд). Метод с применением желатина с учетом результата при микроскопировании позволяет выявить большинство специфичностей антител, в том числе и присутствующие в сыворотках в низком титре. Однако нужно помнить, что часто встречаются образцы антител (кроме антител системы АВО, MNS, P,), взаимодействующие с эритроцитами только в антиглобулиновом тесте. Длительность и трудоемкость выполнения антиглобулинового теста в обычной постановке не дает возможности рекомендовать его для широкого использования при поиске антител.

Использование гелевого теста позволяет не только сократить время проведения исследования, но и повысить его чувствительность.

Таблица 1

Эффективность различных методов исследования для обнаружения антител к антигенам эритроцитов в сыворотке

крови человека

| Специфичность антител к антигенам | Методы выявления | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|-----------------------|--------------|
| | На плоскости в соленой среде | Экспресс с 33% полиглюкином | Конглотинация с желатиновым микроскопированием | Антиглобулиновый тест | Гелевый тест |
| AB | Да | Да и нет зависит от титра | Да | Нет | Да |
| DCE | Маловероятно | Да и нет зависит от титра | Да | Да | Да |
| Kk | Маловероятно | Да и нет зависит от титра | Да | Да | Да |
| a b Fy Fy | Нет | Нет | Нет | Да | Да |
| a b Jk Jk | нет | Нет | Нет | Да | Да |
| S | Маловероятно | Нет | Нет | Да | Да |
| a b Le Le | Да | Да | Да | Да | Да |
| P1 | Да | Да | Да | Маловероятно | Да |
| MN | Да | Маловероятно | Да | Маловероятно | Да |
| H | Да | Маловероятно | Да | Маловероятно | Да |

Выявление антител к антигенам эритроцитов проводят в два этапа:

1. Исследование наличия или отсутствия антител к антигенам эритроцитов (которое не всегда позволяет установить специфичность выявленных антител).
2. Установление специфичности антител, выявленных при скрининге (идентификация антител).

Эритроциты для скрининга и идентификации антител

Тест-эритроциты для скрининга не следует смешивать (пулировать). Смешивание нескольких образцов эритроцитов хотя и позволяет получить большее содержание различных антигенов, однако количество эритроцитов с каким-либо антигеном может оказаться меньше, чем необходимо для реакции агглютинации при выявлении антител. Это может привести к ложноотрицательным результатам при скрининге.

Эритроциты для исследования от типированных доноров могут быть свежезаготовленными или консервированными.

При первичном скрининге сывороток на антитела к антигенам эритроцитов принято пользоваться образцами эритроцитов следующей специфичности, заготовленными в консервированном виде:

- эритроциты групп крови А и В - для выявления иммунных анти-А, анти-В антител;

- эритроциты группы крови О - три образца. Один образец эритроцитов должен иметь фенотип $ccDDEE$, второй образец - фенотип $CCDee$, третий образец - cde . В панели желательно иметь гомозиготы по генам Fy^w , Fy^a , Fy^b , Jk^a , Jk^b , S , s .

Пример панели эритроцитов для первичного скрининга антител приведен в табл. 2.

Для установления специфичности антител, выявленных первичным скринингом, необходимо использовать панель эритроцитов, включающую 11-15 образцов. Пример панели тест-эритроцитов для идентификации антител приведен в таблице 3.

Исследование проводят таким же методом, при котором антитела выявлены при первичном скрининге. Для выявления вновь образующихся антител дополнительной специфичности необходимо использовать для исследования эритроциты, не содержащие антигенов против антител, которые уже идентифицированы.

При установлении специфичности, как правило, необходимо типирование эритроцитов лица, в сыворотке которого обнаружены антитела.

Таблица 2

**Панель эритроцитов для скрининга антител
к антигенам эритроцитов**

| | | Резус | | | | | | Келл | | | | | | Даффи | | Кидд | | Левис | | MNS | | | | Р | Лютеран | |
|----|--------|-------|---|---|---|---|----------------|------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|---|---|---|----|-----------------|-----------------|
| | | D | C | E | c | e | C ^w | K | k | Kp ^a | Kp ^b | Js ^a | Js ^b | Fy ^a | Fy ^b | Jk ^a | Jk ^b | Le ^a | Le ^b | M | N | S | s | P1 | Lu ^a | Lu ^b |
| 1. | CwCDee | + | + | 0 | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | + | + | 0 | + | 0 | + | + | + | + | 0 | 0 | + |
| 2. | ccDEE | + | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 |
| 3. | ccdee | 0 | 0 | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | + | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | | |

Таблица 3

**Панель эритроцитов для идентификации антител
к антигенам эритроцитов**

| | | Резус | | | | | | Келл | | | | | | Даффи | | Кидд | | Левис | | MNS | | | | Р | Лютеран | |
|----|--------|-------|---|---|---|---|----------------|------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|---|---|---|----|-----------------|-----------------|
| | | D | C | E | c | e | C ^w | K | k | Kp ^a | Kp ^b | Js ^a | Js ^b | Fy ^a | Fy ^b | Jk ^a | Jk ^b | Le ^a | Le ^b | M | N | S | s | P1 | Lu ^a | Lu ^b |
| 1. | CwCDee | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | + |
| 2. | CCDee | + | + | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | 0 | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | 0 | + |
| 3. | ccDEE | + | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | + | + | + | + |
| 4. | Ccdee | 0 | + | 0 | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | + | + | 0 | 0 | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + |
| 5. | ccdee | 0 | 0 | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | 0 | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + |
| 6. | ccdee | 0 | 0 | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | + | + | 0 | + | 0 | 0 | + |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7. | ccdee | 0 | 0 | 0 | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 |
| 8. | ccDee | + | 0 | 0 | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | + | + | + | 0 | 0 | + |
| 9. | ccdee | 0 | 0 | 0 | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + |
| 10. | ccDEE | + | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + |
| 11. | ccdee | 0 | 0 | 0 | + | + | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | 0 | + |

Соотношение эритроцитов и исследуемой сыворотки при выявлении антител

При исследовании антител, особенно низкой активности, используют избыток антител по отношению к эритроцитам. Оптимальным является соотношение 10:1, что соответствует трем каплям сыворотки и одной капле 3-5% взвеси эритроцитов (или 1 капля сыворотки и 2 капли 0,8% эритроцитов в микротипирующей системе ДиаМед).

При обнаружении антител к антигенам эритроцитов выписывается ответ, который переносится в донорский журнал или историю болезни. В ответе обязательно указывается, что в случае необходимости проведения гемотрансфузионной терапии, индивидуальный подбор крови осуществляют с применением антиглобулинового теста. Бланк ответа остается у донора или больного, хранится в течение жизни и предъявляется при госпитализации.

Необходимо иметь в виду, что если у реципиента однажды были выявлены клинически значимые антитела к антигенам эритроцитов, такой реципиент всегда должен получать гемотрансфузионную среду, не содержащую антигенов к антителам выявленной специфичности. Это правило должно соблюдаться даже, если в последствии антитела указанной специфичности перестали выявляться в сыворотке (во избежание повышения выработки антител в результате стимуляции вторичного иммунного ответа).

| Причины ложноотрицательных реакций при выявлении аллоантител |
|--|
| - Сыворотка на исследование заготовлена в несоответствующее время |
| - Активность антител ниже порога чувствительности метода |
| - Неправильное соотношение сыворотки и тест-эритроцитов |
| - Применение низкочувствительного метода исследования |
| - Тест-эритроциты, выбранные для исследования антител, не содержат необходимый антиген |
| - Исследуемая сыворотка не добавлена в пробирку |
| - Иммунный ответ клеточный, а не гуморальный |

АНАЛИЗ НЕСОВМЕСТИМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПОДБОРОВ КРОВИ ПО АНТИГЕНАМ ЭРИТРОЦИТОВ

Наличие в крови реципиентов ауто- и аллоантител создает проблемы при проведении иммуногематологических исследований, т.к. искажает правильность типирования антигенов эритроцитов при определении группы крови, резус-принадлежности и постановке пробы на совместимость за счет неспецифической и специфической агглютинации, обусловленной антителами.

Получение несовместимых результатов при постановке тестов на совместимость приводит к отказу от проведения трансфузии, а так же зачастую к потере трансфузионной среды. Однако не все антитела, выявляемые у реципиентов *in vitro*, имеют клиническое значение при гемотрансфузиях. Поэтому важно установить причину, по которой при проведении пробы на совместимость или индивидуального подбора крови был получен несовместимый результат.

Согласно действующим инструкциям исследование антител и постановку пробы на совместимость проводят методом солевой агглютинации, конгломинации с желатином, антиглобулиновым тестом в общепринятой постановке и методом агглютинации в геле.

Положительные реакции могут наблюдаться на разных стадиях проведения исследования: агглютинация при комнатной температуре на плоскости, агглютинация в пробирках при использовании желатинового метода, агглютинация в фазе сенсibilизации

при использовании антиглобулинового теста или агглютинация в фазе добавления антиглобулинового реактива или сыворотки.

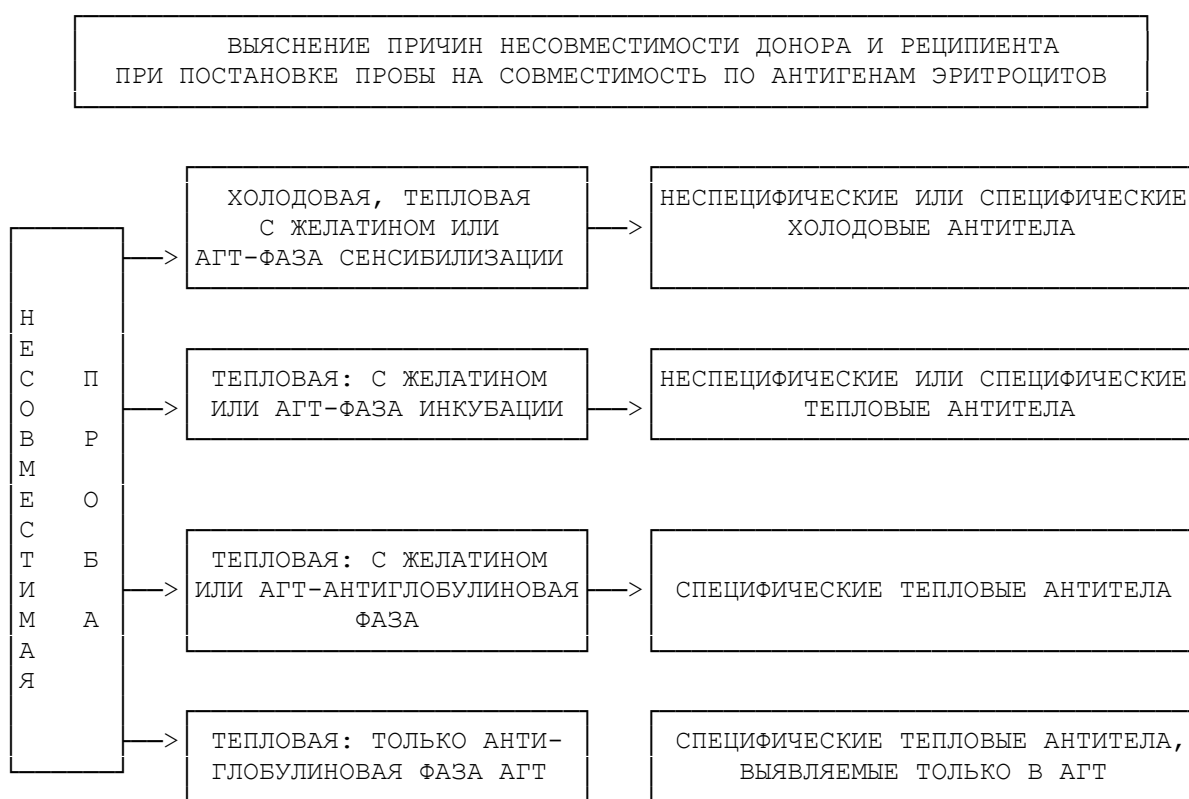
Варианты несовместимых проб и характеристика антител, вызывающих несовместимость, приведены на схеме 3.

Алгоритм исследования сывороток реципиентов при выяснении причин несовместимости крови донора и реципиента приведен на схеме 4.

В холодной фазе проведения пробы несовместимость обусловлена присутствием неспецифических Холодовых антител, что подтверждается по положительному холодному аутоконтролю с собственными эритроцитами. В ряде случаев предварительное прогревание сыворотки приводит к получению совместимого результата.

Присутствие специфических Холодовых антител в исследуемой сыворотке подтверждается отрицательным аутоконтролем. Выявление специфичности с панелью типированных эритроцитов показывает обычно наличие анти-P1,-M антител.

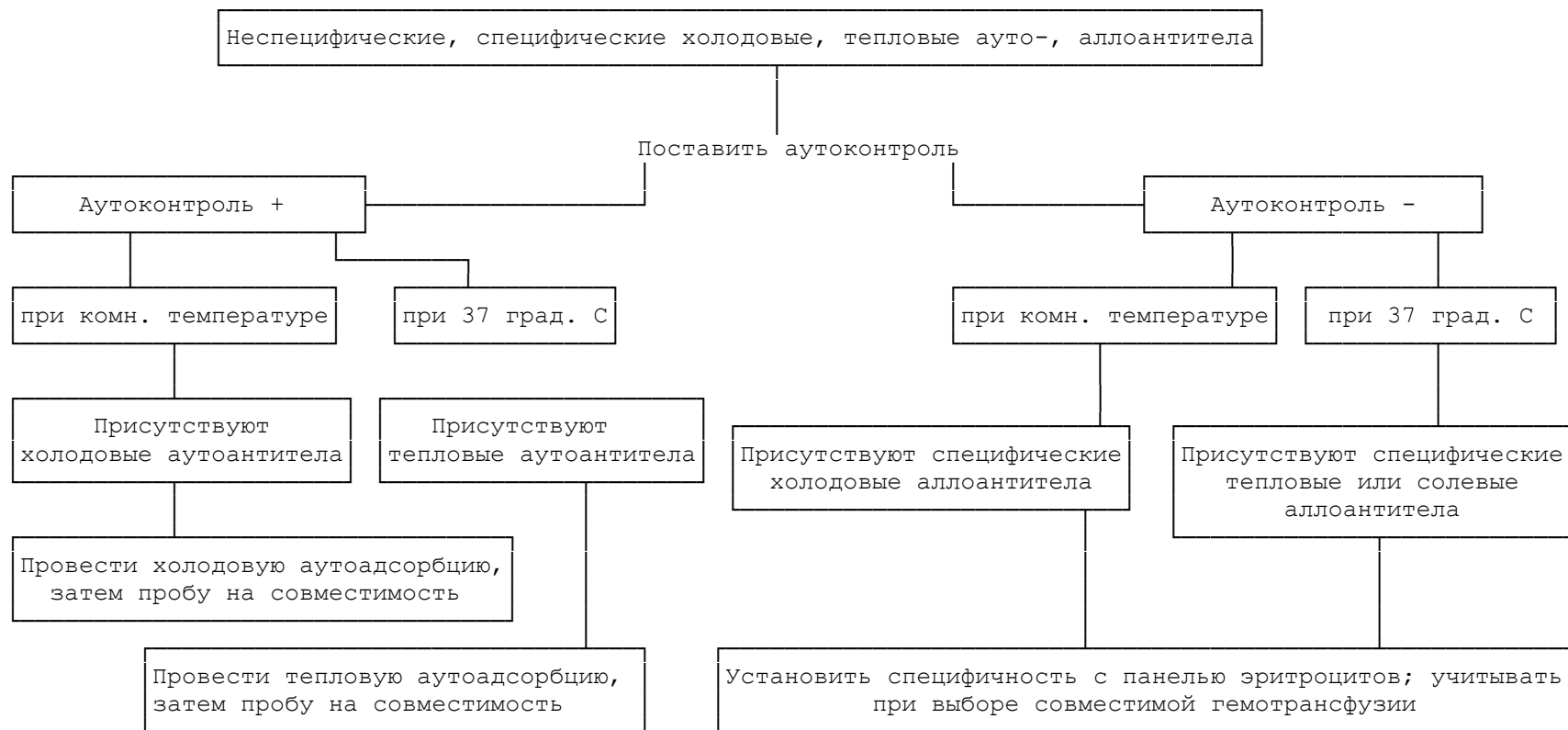
Схема 3



ОБОЗНАЧЕНИЯ: АГТ-АНТИГЛОБУЛИНОВЫЙ ТЕСТ (РЕАКЦИЯ КУМБСА)

Схема 4

Схема проведения исследований при наличии у реципиентов антител к эритроцитам



Специфические тепловые антитела наиболее часто являются причиной несовместимых проб крови донора и реципиента. При этом с панелью типированных эритроцитов выявляются антитела следующей специфичности а b анти-D, -C, -E, -c, -K, -Fy, -Lu. Этим больным необходим индивидуальный подбор крови доноров, фенотипированной по антигенам эритроцитов с учетом специфичности выявленных антител.

В случае наличия неспецифических тепловых антител у реципиентов наблюдается положительный тепловой аутоконтроль - агглютинация эритроцитов собственной сывороткой в том методе, в котором проводили исследование: желатине, непрямом антиглобулиновом тесте. Чтобы выяснить наличие аллоантител у этих реципиентов, перед исследованием проводят аутоадсорбцию

аутоантител. Для аутоадсорбции используют собственные эритроциты реципиента, трижды отмытые от сыворотки. Процесс сорбции осуществляли 3-5 раз при 37 рад. С в течение 30 мин. После адсорбции аутоантител проводят исследование аллоантител и их специфичность с панелью типированных эритроцитов. Если специфичность антител не установлена, в дальнейшем пробу на совместимость ставят с предварительно адсорбированной сывороткой.

Необходимо отметить, что в ряде случаев у реципиентов в сыворотке присутствуют аллоантитела, которые выявляются только в непрямом антиглобулиновом тесте и не активны в других методах исследования. Специфичность антител обычно: анти-Е, -К.

Эффективность использования метода

Эффективность применения предложенных алгоритмов выявления группы крови и резус-принадлежности подтверждена при исследовании 251 образца крови, имевших сложнодиагностируемые варианты антигенов АВО и Резус (частота встречаемости таких образцов крови составила 0,7%). Кроме того, алгоритмы проведения исследования ауто- и аллоантител апробированы на 92 образцах сывороток крови реципиентов, имевших несовместимость с образцами крови доноров (частота встречаемости таких образцов крови составила 1,34%). Это позволило избежать ложноположительные и ложноотрицательные результаты при диагностике антител и дифференцировать специфические антитела от неспецифических во всех исследованных случаях.

Исследование сывороток реципиентов с панелью типированных эритроцитов позволило выяснить специфичность антител, обусловивших эти реакции и подобрать этим реципиентам фенотипированные эритроциты доноров с учетом специфичности выявленных антител.

Приложение N 1

АУТОАДСОРБЦИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ХОЛОДОВЫХ, ТЕПЛОВЫХ АУТОАНТИТЕЛ

1. Взять 20 мл крови больного в 2 пробирки: пробирка N 1-10 мл без консерванта и пробирка N 2-10 мл на антикоагулянте (0,5% ЭДТА).

2. Поместить пробирку N 1 в холодильник на 20 мин. для лучшей адсорбции Холодовых антител на сгусток (если предполагается адсорбция Холодовых антител) или поместить пробирку N 1 в термостат на 20 мин. для лучшей адсорбции тепловых антител (если предполагается адсорбция тепловых неспецифических антител).

3. Подогреть до 37 град. С 0,9% раствор натрия хлорида. Отмыть эритроциты из пробирки N 2 три раза. После последнего центрифугирования с эритроцитов максимально удалить физ. раствор.

4. Разделить эритроциты на 4-5 частей.

5. К первой порции эритроцитов добавить 2 мл сыворотки реципиента(пробирка N 1) и поместить в холодильник (или термостат) на 20 минут. Отделить сыворотку центрифугированием.

6. Добавить к сыворотке следующую порцию эритроцитов для сорбции, поместить в холодильник (термостат) на 20 минут. Отделить сыворотку центрифугированием.

7. Повторить пункт 6 три-четыре раза.

8. После последней сорбции исследовать сыворотку на аллоантитела.

Примечания. Процедуру аутоадсорбции не проводят, если:

1) больной имеет положительный прямой антиглобулиновый тест (аутоантитела, адсорбированные на эритроцитах);

2) больной имел гемотрансфузии в течение последних 2-х месяцев. В этом случае оставшиеся в циркуляции эритроциты донора могут сорбировать специфические антитела.

ПРОВЕДЕНИЕ АУТОКОНТРОЛЯ (НА НАЛИЧИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ХОЛОДОВЫХ ИЛИ ТЕПЛОВЫХ АУТОАНТИТЕЛ)

1. Поместить 2 капли сыворотки больного в пробирку N 1.

2. В каждую пробирку добавить по 2 капли 3% взвеси эритроцитов больного в той же суспензирующей среде, которая использовалась при постановке пробы на совместимость (0,9% раствор натрия хлорида, желатин, сыворотка). Если для проведения пробы на совместимость использовались отмытые эритроциты донора, то для проведения аутоконтроля эритроциты реципиента нужно отмыть.

В пробирку N 2 поместить 2 капли используемой взвешивающей среды (физ. раствор желатин, сыворотка) + 2 капли 3% взвеси эритроцитов - контроль.

3. Центрифугировать пробирки N 1 и N 2 1 мин. при 1000 об/мин.

4. Оценить агглютинацию макроскопически (от 4 + до -). Положительный результат свидетельствует о наличии холодowych неспецифических антител.

5. Если холодowych неспецифических антитела отсутствуют, инкубировать пробирки N 1 и N 2 15 мин. при 37 град. С.

6. Центрифугировать 1 мин. при 1000 об/мин.

7. Оценить наличие агглютинации или гемолиза (от 4 + до -).

8. При отрицательном результате, если необходимо, провести АГТ (реакцию Кумбса) с пробирками N 1 и N 2.

Если аутоконтроль отрицательный на всех этапах проведения, исследуемый образец сыворотки реципиента, вероятно, содержит специфические антитела и гемотрансфузия не должна проводиться без установления их специфичности.

Если аутоконтроль положительный при тех же условиях проведения, что и проба на совместимость, то сыворотка больного содержит неспецифические антитела.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммуносерология (нормативные документы) М. 1998. 195 с.
 2. Руководство по организации Службы крови /Ред. Гиббс В., Бриттен А.-1995.
 3. Issitt P., Anstee D. Applied Blood Group serology. 4th ed. Scientific Publication USA. 1998, 1208p.
 4. Technical Manual American Association of Blood Banks 12th ed. 1996, 752 p.
-