

Новые технологии иммуногематологического обследования реципиентов и беременных

Зав. лабораторией клинических исследований
КГБУЗ «Диагностический центр Алтайского края»
Доцент кафедры терапии и общей врачебной практики
АГМУ, к.м.н.

Королёва Елена Анатольевна

При поддержке *Johnson & Johnson* company

Приказ МЗ РФ 183н от 2 апреля 2013 г.

Правила проведения трансфузии (переливания)
донорской крови и (или) ее компонентов

Врач клинического отделения:

- Первичное определение группы крови АВ0 и резус-фактора (антигены А, В, D) при поступлении

Врач КДЛ:

- Подтверждающее исследование группы крови АВ0
 1. антигены А, В, А1
 2. у взрослых и детей старше 4 мес. - антитела анти-А и анти-В IgM (естественные агглютинины)
- Резус-фенотип (антигены D, С, Е, с, е, Сw)
- Антигены Келл и Челлано (K, k)
- Антиэритроцитарные антитела к перечисленным антигенам, а также антигенам систем Даффи, Кидд, MNS и др. (IgG).

Алгоритм обследования реципиента

Антигены A, B, 0
Антитела анти-A, анти-B

Резус и Келл фенотип
D C E c e Cw K k

Скрининг антител

АТ есть

АТ нет

Индивидуальный
подбор

Пробы
Трансфузия



- Письмо Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 10 октября 2008 г. N 15-4/3118-09 "О порядке проведения иммуногематологических исследований у беременных, рожениц, плодов и новорожденных"

Скрининг антител:

Анти-D-C-c-E-e-K-k, Duffy, Kidd, MNSS

Возможные методы:

- 1. Желатиновый тест**
- 2. Антиглобулиновый тест в геле**

Стандартные эритроциты:

набор из трех образцов

Антигены эритроцитов - более 250.

Системы групп крови (23 системы, содержащие 194 антигена)

13 систем – клиническое значение:

ABO, Резус, Келл (Kell), Даффи (Duffy), MNSs, Кидд (Kidd), Льюис(Lewis), Лютеран (Luteran), Р, Диего (Diego), Аубергер (Auberger), Домброк (Dombrock), Ай (i).

У каждого человека в эритроцитах имеются антигены нескольких антигенных систем. Вариантов сочетания - более 11 млн.

При каждой трансфузии переливается кровь или компонент, не соответствующие по антигенному составу, что может привести к иммунизации и посттрансфузионному осложнению (ПТО).

Резко возрастает опасность ПТО после 5 гемотрансфузий.

Групповые антитела крови

- являются иммуноглобулинами
- находятся в сыворотке(плазме)крови
- специфично соединяются с одноименными антигенами
- по размеру, весу и строению делятся на 2 класса: IgG и IgM.

IgM - можно выявить на плоскости

IgG – в пробирке с конглютинином или (лучше!) в пробе Кумбса

Система АВ0

- Антигены системы АВ0 – в эритроцитах, лейкоцитах, тромбоцитах и тканевых клетках организма
- Антигены А и В – агглютиногены
- Антигены А1 и А2 – разновидности А
- Антиген 0 – не вызывает агглютинацию, не имеет практического значения.
- Естественные антитела - агглютинины
 - α (альфа, анти-А) – взаимодействует с А
 - β (бета, анти-В) – взаимодействует с В
- Иммунные анти-А, анти-В - гемолизины

Система Резус

- Система Резус является второй по значению после системы АВ0.
- Всего 51 антиген.
- Основные антигены: D d C c E e. Они образуют три пары антигенов:
 - DD, dd, CC, cc, EE, ee
 - Dd, Cc, Ee
- Частота встречаемости антигенов системы Резус: D - 85%, C - 70%, E - 30%, c - 80%, e - 97%. Различные сочетания антигенов резус образуют 28 групп системы Резус.

■ Наиболее частые фенотипы:

■ CcDEe – 14 %

■ CcDee - 32 %

■ ccDEe – 12 %

■ CCDee – 19,5 %

■ ccDee – 3 %

■ ccddee – 13 %

■ Ccddee – 1,5 %

- Антиген D в 1% случаев встречается в слабо выраженном варианте - **Du**. Это может быть обусловлено как отсутствием нескольких эпитопов, так и слабо выраженной экспрессией нормального антигена D.
- **D-слабый (weak)** – снижено количество антигенных детерминант в 3-10 раз
- **D-вариантный (partial)** – качественные отличия, отсутствие нескольких эпитопов
- Другие антигены Резус тоже имеют разновидности, например **Cw**

Антитела к антигенам Резус и Келл

- Частота встречаемости антител различна и определяется иммуногенностью антигенов и частотой их встречаемости. Иммуногенность антигенов Резус и Келл представлена следующим образом $D > D_u > K > c > E > C_w > C > e$.
- Чаще всего в крови доноров и реципиентов выявляют анти-D антитела. Более 90% ПТО, обусловленных резус-несовместимостью донора и реципиента, связаны с разновидностью антигена D. Следующее место по частоте встречаемости занимают анти-c антитела. Наиболее редко встречаются анти-e антитела.

Определение резус-фенотипа и антигенов К,к

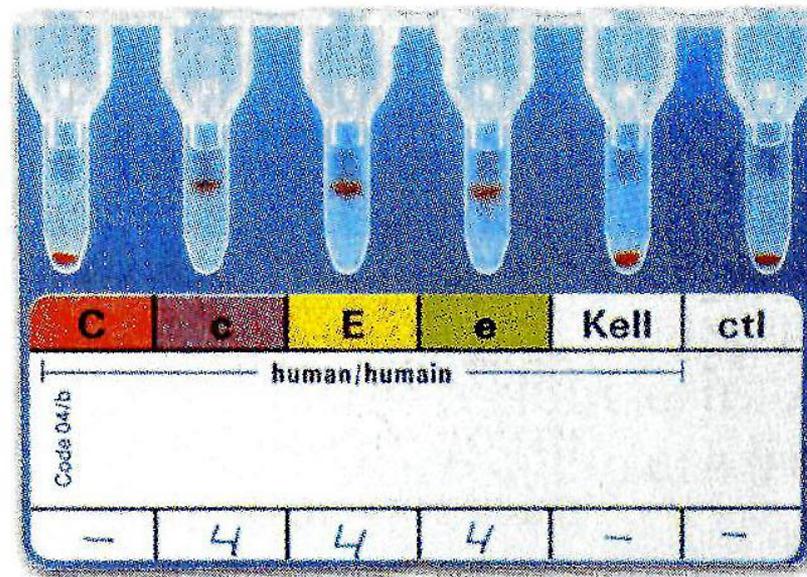
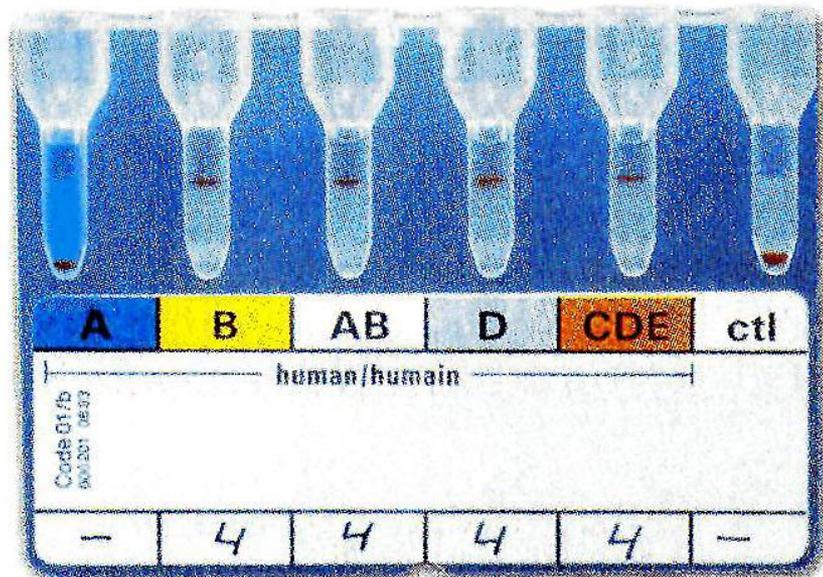
- В настоящее время применяются реактивы на основе моноклональных антител. Сейчас для практического применения доступны Цоликлоны: анти-D, анти-C, анти-E, анти-c, анти-e, анти-Cw, анти-K, анти-k. Название Супер означает, что реакция проводится на плоскости (IgM).
- Инструкция по применению цоликлона анти-D Супер (приложение 10 приказа №2 МЗ России от 09.01.1998 года).

Гелевая технология для определения группы крови системы АВ0 и резус-фенотипа

Гелевая технология впервые предложена Lapiere (Швейцария) в 1990 г.

- Метод основан на агглютинации эритроцитов в геле, помещенном в микропробирки
- Система представляет собой пластиковые карты, содержащие 6 или 8 микропробирок, заполненных гелем.
- Для определения группы крови системы АВ0 используют карту, в микропробирки с гелем которой добавлены соответствующие цоликлоны.

Схематическое изображение ID-карты для определения группы крови и резус-принадлежности и для типирования антигенов эритроцитов



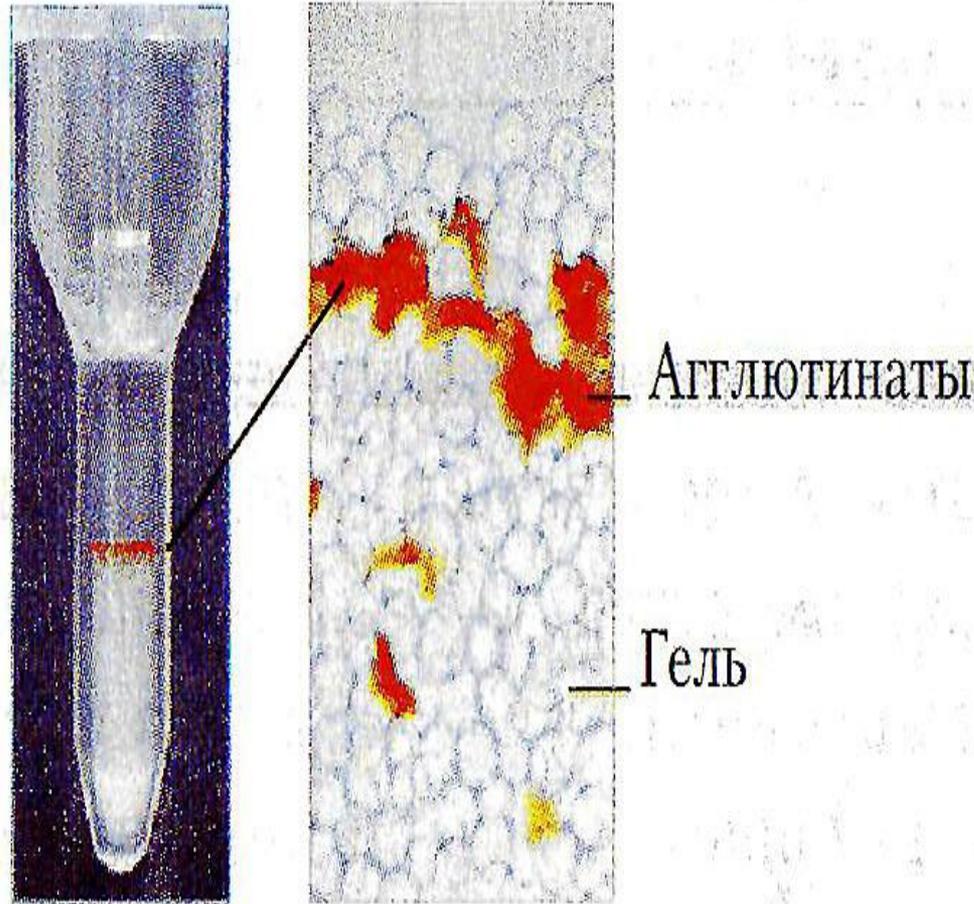
Маркировка пробирок в ID-карте осуществляется по выявляемым антигенам и имеет следующие обозначения:

- A, B, AB, D, CDE, Ctl (Контроль)
- C, c, E, e, K, Ctl (Контроль).

Гелевая технология для определения группы крови по системе АВ0 и резус-фенотипа

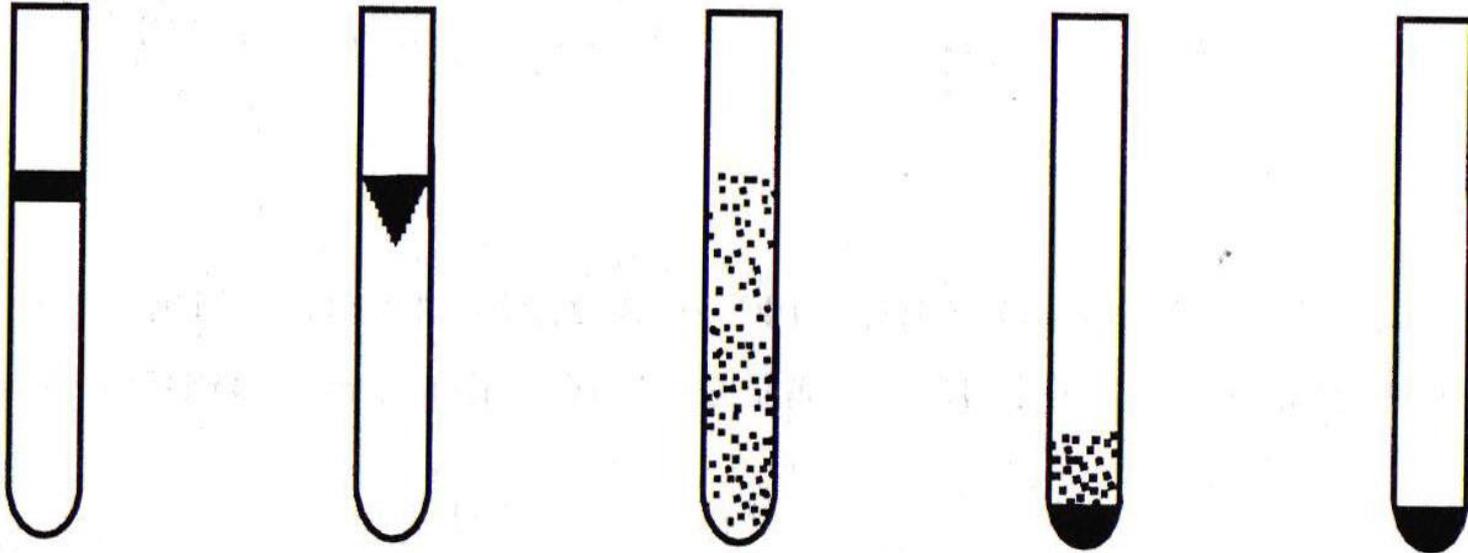
- Оборудование: центрифуга, дозатор на 10-50 мкл с переменным объемом, наконечники
- Реагенты:
 - 1. диагностическая карта
 - 2. раствор для разведения эритроцитов
- Эритроциты исследуемого лица

Агглютинация эритроцитов антителами в ID-карте DiaMed



Микропробирка

Оценка результатов реакции агглютинации в гелевом тесте



Положительная Положительная Положительная Положительная Отрицательная

4+ 3+ 2+ + -

Новые технологии для скрининга неполных антител IgG систем Резус, Келл и др.

- Оборудование: центрифуга, термостат на 37 С, дозатор на 10-50 мкл с переменным объемом, наконечники
- Реагенты:
 - диагностическая карта или кассета с добавлением сыворотки Кумбса
 - набор стандартных эритроцитов (3 типа) содержащих в каждом флаконе определенный набор антигенов
 - сыворотка реципиента или беременной

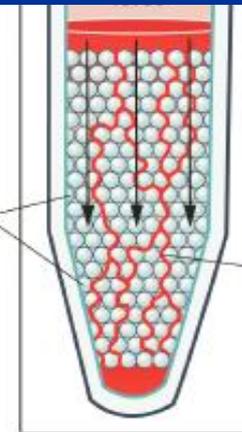
Колоночная агглютинация с использованием микросфер BioVue

Основание колонки
заполнено стеклянными
шариками

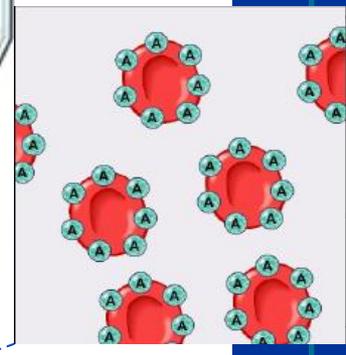
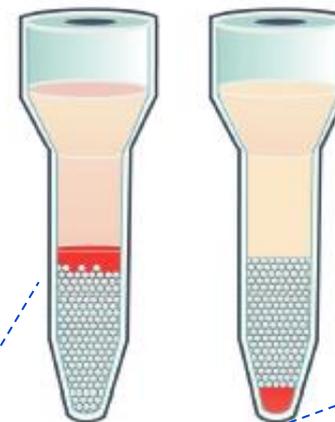
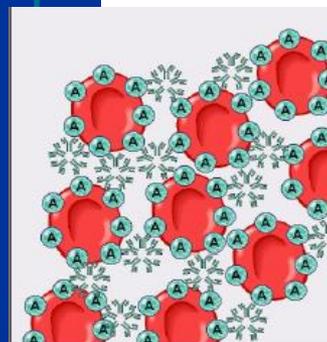


Центрифугирование: центробежная сила

Шарики –
препятствие
для
агглютини-
рованных
эритроци-
тов



Отдельные
эритроциты
без труда
проходят
между
шариками



положительная

отрицательная

Колоночная агглютинация с использованием микросфер BioVue



Колоночная агглютинация с использованием микросфер BioVue



Сравнение методов определения резус-фенотипа цоликлонами, в гелевых картах и диагностических кассетах

Показатели	Цоликлоны	Гелевые карты	Диагностич кассеты
Разведение эритроцитов	Нет	Есть, РНИС	Есть, физраствор
Слабые варианты D	D-weak	D-weak D-partial	D-weak D-partial
Время тестирования	5 мин	9-10 мин	5 мин

Сравнение методов скрининга антител

Показатели	Гелевые карты 6	Гелевые карты 8	Диагностич кассеты 6
Время инкубации	15 мин	15 мин	10 мин
Центрифуга	10 мин	9 мин	5 мин
Выявление АТ из 300 сывороток беременных	36 - анти-D 1 - анти-с 1 - анти-К	36 - анти-D 1 - анти-с 1 - анти-К	36 - анти-D 1 - анти-с 1 - анти-К

Эффекты новых технологий

Введение новых правил – увеличение трудозатрат и расходов на реагенты в КДЛ

Увеличение объема анализов – снижение себестоимости

Специфичность АТ – только в централизованной лаборатории

**Централизация + Автоматизация + ЛИС =
Доступность и качество медицинской помощи**

Спасибо за внимание!

