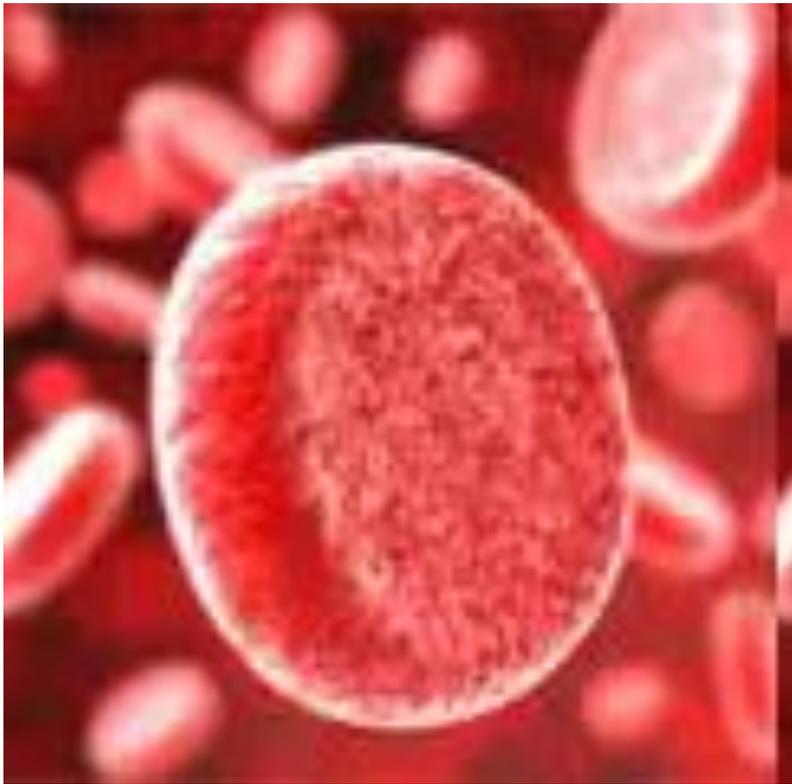


ОСНОВЫ СОВРЕМЕННОЙ ИММУНОГЕМАТОЛОГИИ

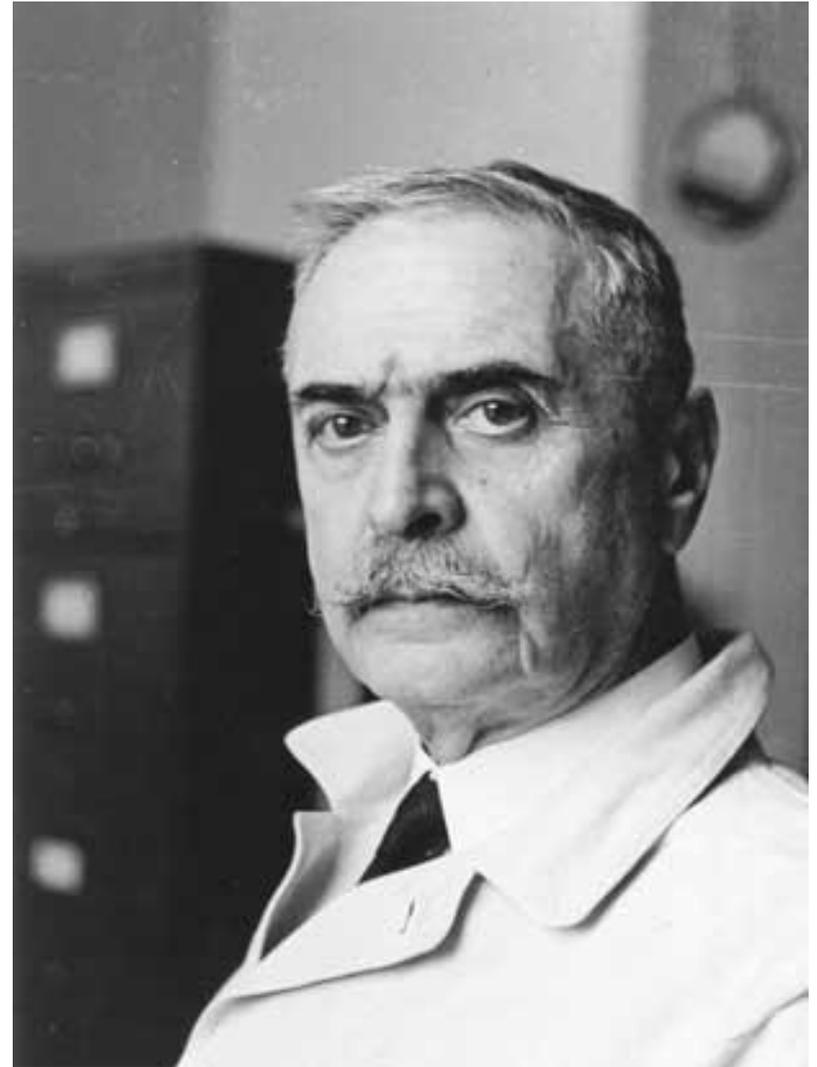


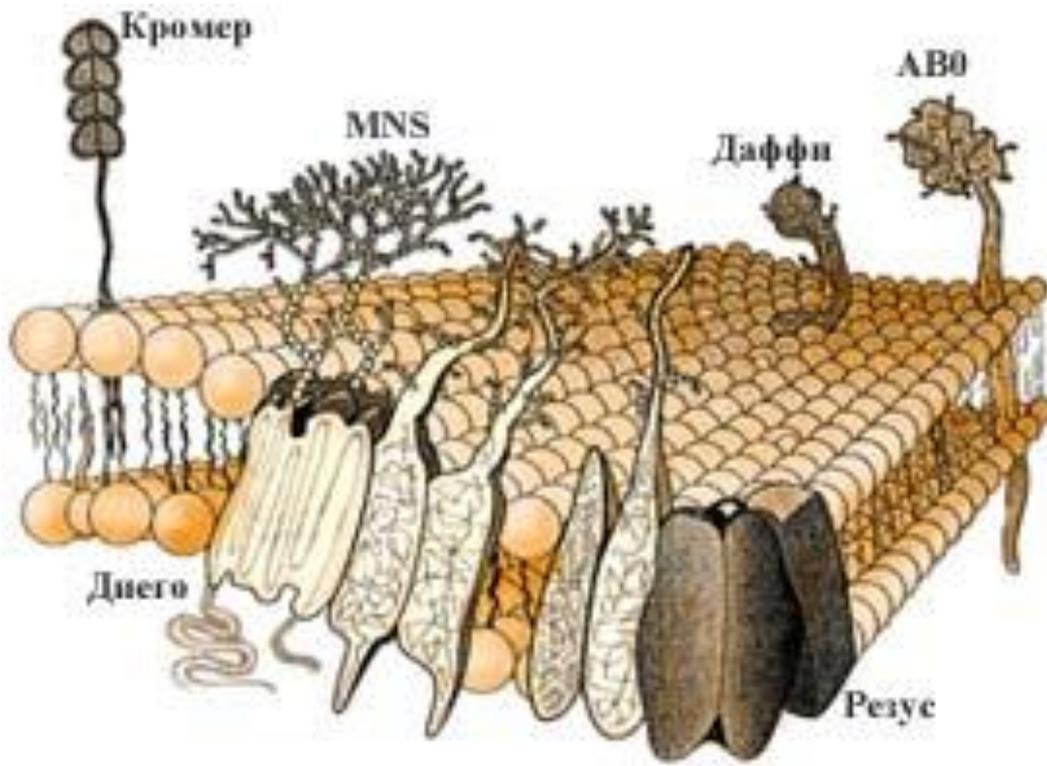
**к.м.н Гольдинберг Б.М.
Городской центр
трансфузиологии**

Иммуногематология

- *раздел иммунологии, изучающий антигены форменных элементов и жидкой части крови, антител к ним, а также заболевания, обусловленные иммунными реакциями, в основе которых лежит соединение антител с антигенами.*

- В основе всех иммуногематологических исследований лежит взаимодействие антигена с антителом.
- В 1901 году **Карл Ландштейнер** открыл группы крови человека по системе АВО, что послужило началом новой области иммунологии – изосерологии. За выдающееся открытие К. Ландштейнеру была присуждена Нобелевская премия, а его день рождения – 14 июня 1868 года – отмечается как Всемирный день донора. В отличие от других генетических систем групп крови человека, антигенам А и В системы АВО в сыворотке крови соответствуют так называемые естественные антитела α (анти-А) и β (анти-В). Появление их связано со скрытой сенсibiliзацией.



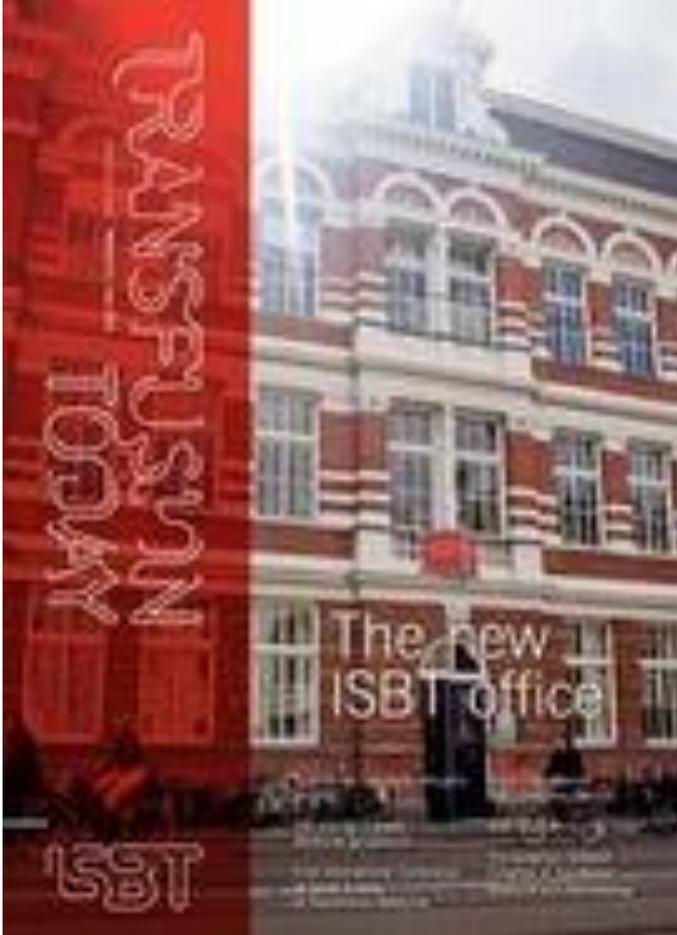


К настоящему времени известно 308 эритроцитных антигенов групп крови, объединённых в 36 систем (АВ0, Резус, Келл, Даффи, Кидд, MNS, P и т.п.), в соответствии с закономерностями их наследования.

Ни один врач, даже знающий о 36 системах групп крови и сотнях антигенов эритроцитов, составляющих эти системы, не может быть абсолютно уверен в благоприятном исходе трансфузии.

Тем не менее, во многих клинических ситуациях гемотрансфузия является единственным способом спасения жизни пациента.





В 1980 году на конгрессе в Монреале Международное общество переливания крови (ISBT – International Society of Blood Transfusion) организовало группу из ведущих специалистов в области иммуногематологии и трансфузиологии по разработке и упорядочению систем антигенов эритроцитов.

Правила обозначения:

антигены обозначаются A, B, O, D, C, c, K;

гены - A, B, O, D, C, c, K;

гаплотипы - CDE или CDE /cde;

фенотип системы Резус указывается, начиная с антигена D - DCcEe или системы Келл - KK или K+k-, или K1+ K2-);

в запись не включают антиген, который не определялся и группу крови обозначают по антигену, который присутствует на эритроцитах;

группа крови и резус принадлежность относятся к человеку, а не к крови (**неправильно сказать «резус-принадлежность крови», а надо «резус-принадлежность крови пациента»**);

титр антител, например, 1:32 - **«один на 32», но не «один к 32».**

Классификация групп крови человека

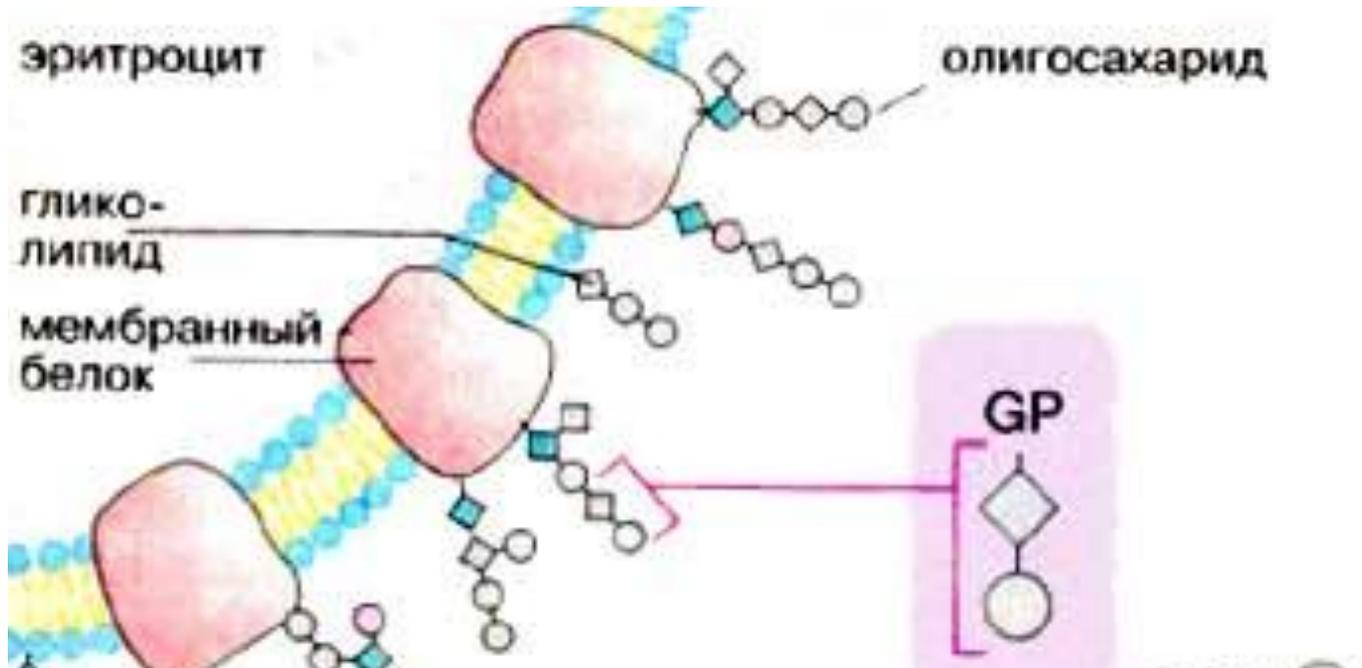
Групповые антигены подразделяются на 3 большие категории:

- **36 систем** - совокупность **антитетичных** (противоположных) антигенов, связь которых друг с другом хорошо прослеживается (K и k, C и c);
- **6 коллекций** - совокупность антигенов, которые имеют только фенотипическую связь (38 антигенов);
- **2 серии** - антигены, которые нельзя присоединить к системам или коллекциям.

Система H

Системы H и АВ0 существуют независимо друг от друга.

самостоятельного генного локуса *H*, ответственного за генетическую реализацию групповой субстанции H на эритроцитах крови человека, впервые было доказано Уоткинсом и Морганом в 1955 году.



Субстанция Н является олигосахаридной группой, расположенной на поверхности мембраны эритроцитов и связанной со сфинголипидами мембраны

H-дефицитные фенотипы



У подавляющего большинства людей (99,9%) эритроциты содержат H-антиген, однако существуют редкие H-дефицитные фенотипы, при которых H-антиген отсутствует.

К ним относятся типы Бомбей и пара-Бомбей.

Так, при исследовании трех поколений (родословной) одной семьи, Уоткинсом и Морганом было установлено, что три ее члена относились к типу Бомбей.



- Важно отметить, что в плазме крови людей с фенотипом Бомбей есть антитела ко всем антигенам системы АВ0 и системы Hh – к субстанции H, являющейся антигеном группы 0(I), антигену А и антигену В - анти-H(0), анти-А и анти-В соответственно. Это создает для реципиентов данного фенотипа высочайшую степень риска при переливании им крови или эритроцитарной массы любой группы системы АВ0.

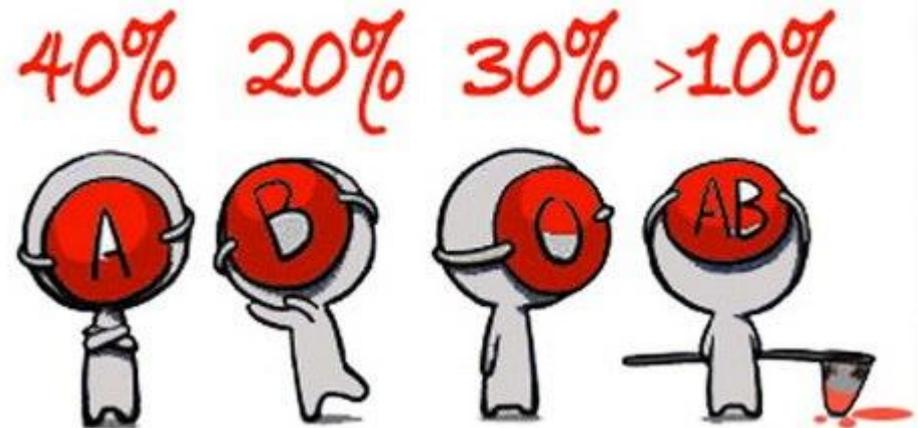
Антитела анти-H иногда встречаются в сыворотках крови А и АВ. Они относятся к холодовым агглютинином, имеют низкий титр и при 37° С не активны.

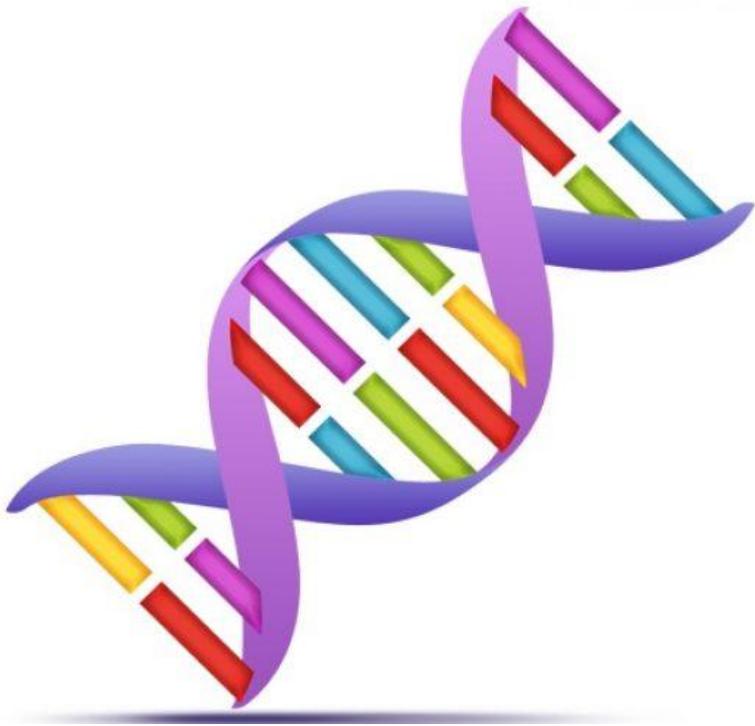
Если люди с Бомбейским фенотипом будут экстренно нуждаться в гемотрансфузии, сделать это будет практически невозможно, так как в банках крови отсутствуют запасы такой редкой группы.

Система АВО



Биологические субстанции, напоминающие групповые А- и В-антигены, широко распространены в живой природе (пищевые вещества, растительные продукты, микроорганизмы). В образовании иммунных групповых антител определенное значение имеют вакцинация анатоксином, серотерапия лошадиной сывороткой, контакт человека с бактериями и паразитами, содержащими субстанции А и В.

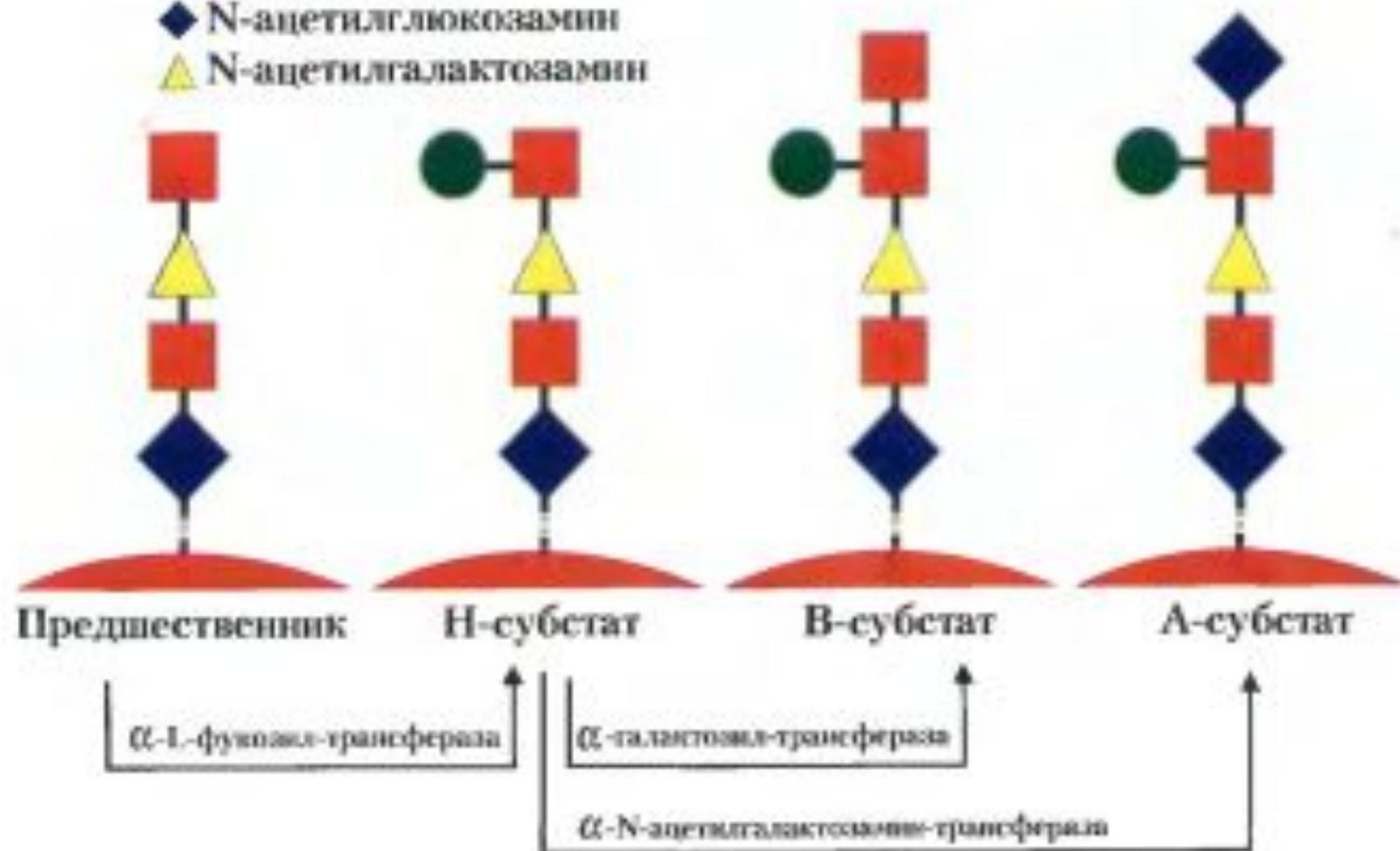




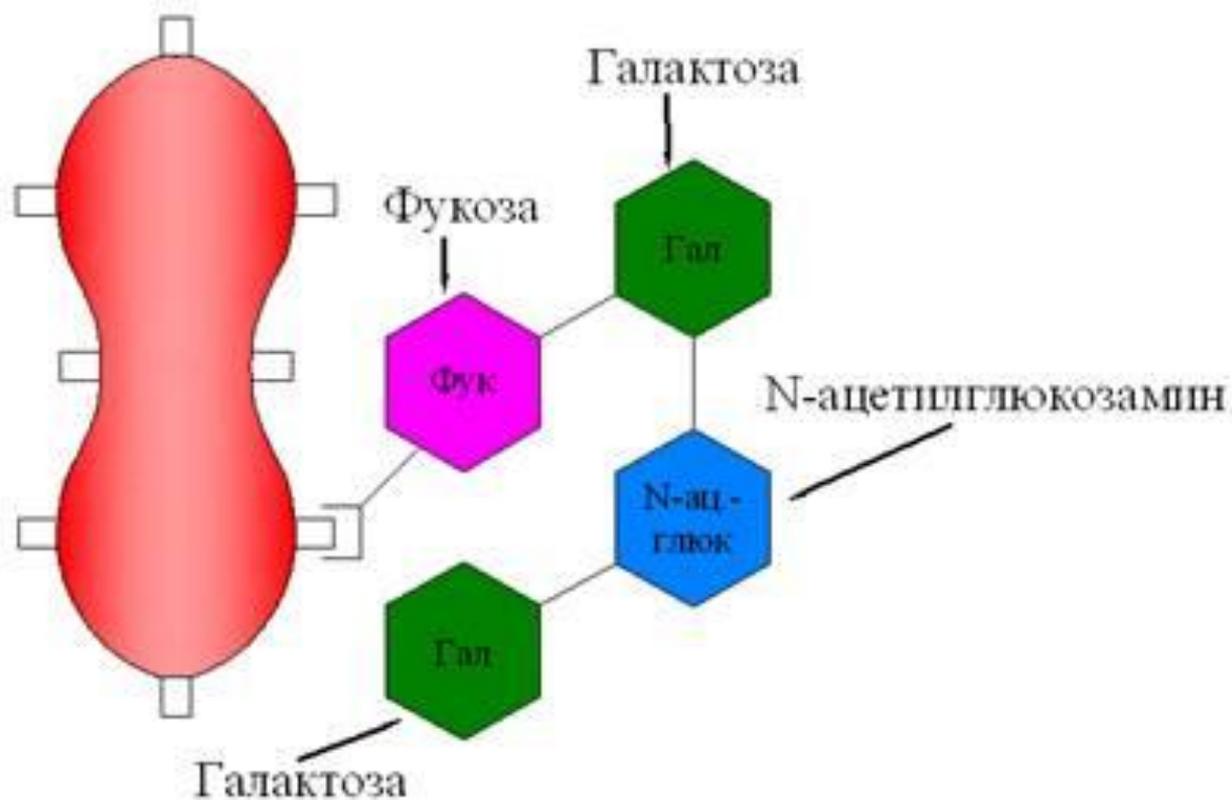
- В настоящее время хорошо изучена химическая структура групповых веществ. У всех трех антигенов А, В, О пептидный компонент одинаковый. Специфичность же определяется углеводной частью.
- Серологически определяемые антигены А, В и **не являются непосредственными продуктами генов**. Гены А, В и О контролируют синтез соответствующих ферментов – трансфераз. Трансферазы А и В отличаются друг от друга двумя аминокислотами.

Синтез антигенов АВН

- L-фукоза
- D-галактоза
- ◆ N-ацетилглюкозамин
- ▲ N-ацетилгалактозамин

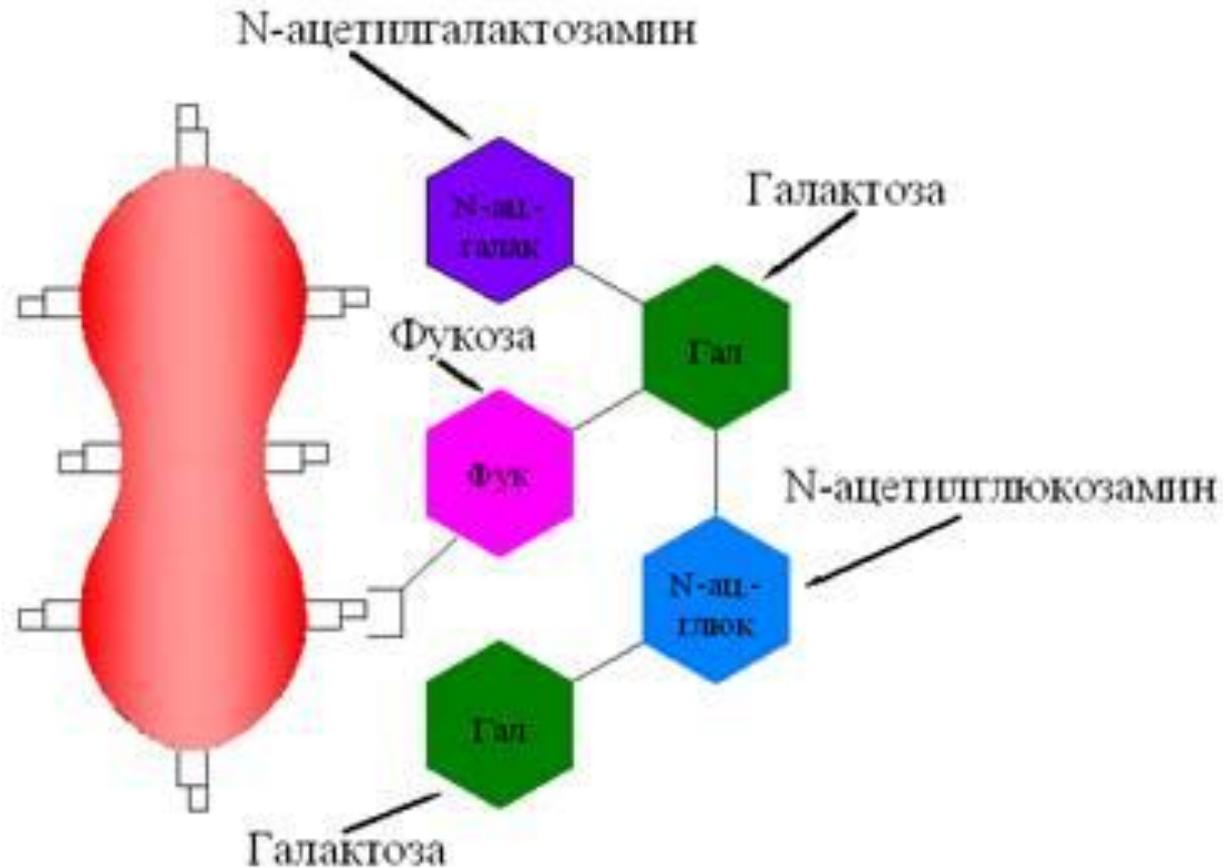


Структура антигена O



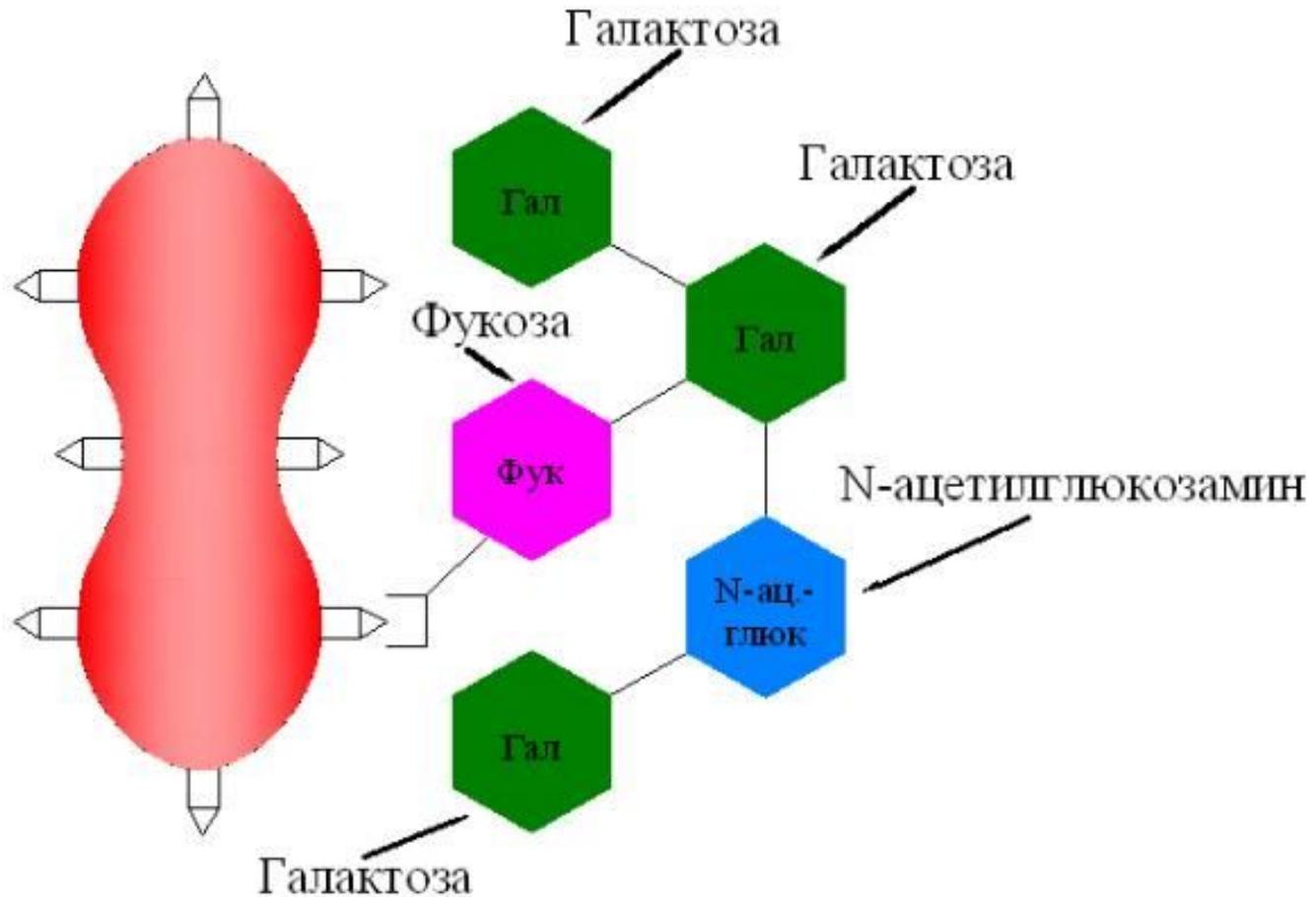
- Ген «O» не контролирует трансферазу и H-антиген остается неизменным, формируя группу крови O(I).
- Фермент фукозилтрансфераза кодируется геном *H* и связывает антиген H со сфинголипидами мембраны.

Структура антигена А

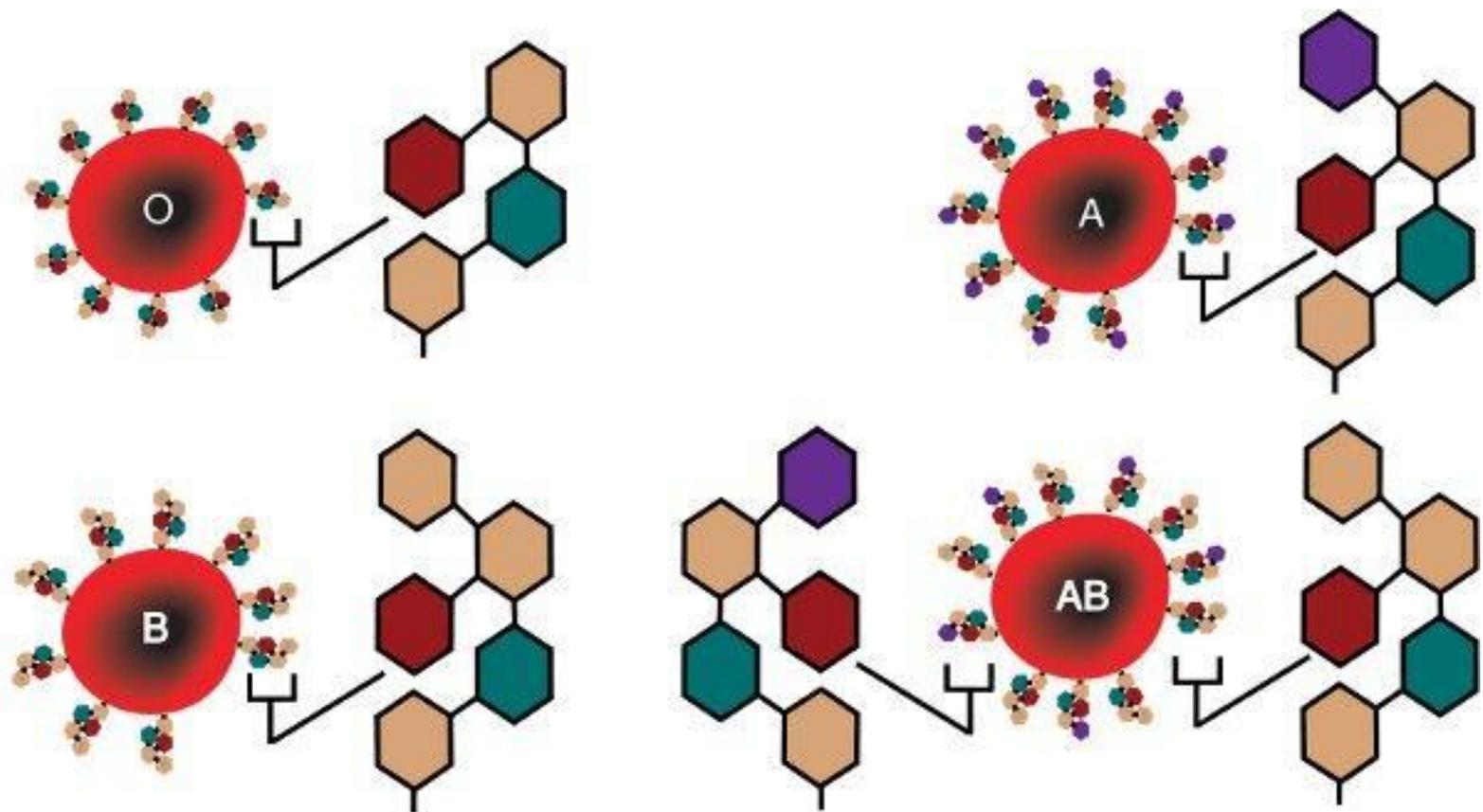


Субстанция Н трансформируется в антигены А под воздействием фермента α -N-ацетилгалактозамин-трансферазы, который присоединяет к субстанции Н иммунодоминантного белковоуглеводного соединения N ацетилгалактозамин

Структура антигена В



Субстанция Н трансформируется в антиген В α -галактотрансферазой, которая присоединяет к субстанции Н галактозу.



Legend



Red blood cell



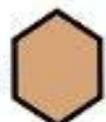
N acetyl-galactosamine



Fucose



N acetyl-glucosamine



Galactose

Различия между A₁ и A₂ антигенами являются качественными и количественными.

Слабый антиген A₂ даёт слабую и позднюю агглютинацию.

В результате **ошибочно**

кровь A₂ может быть отнесена к O (I) группе

A₂B — к B (III) группе крови

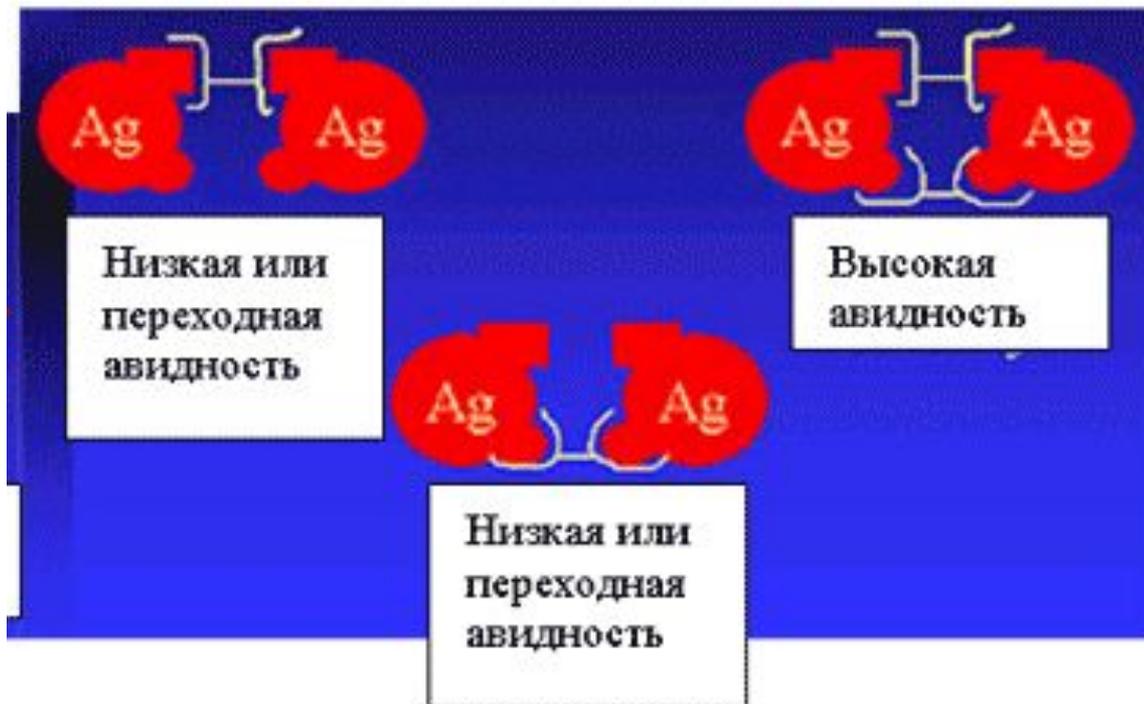
Основные свойства антител



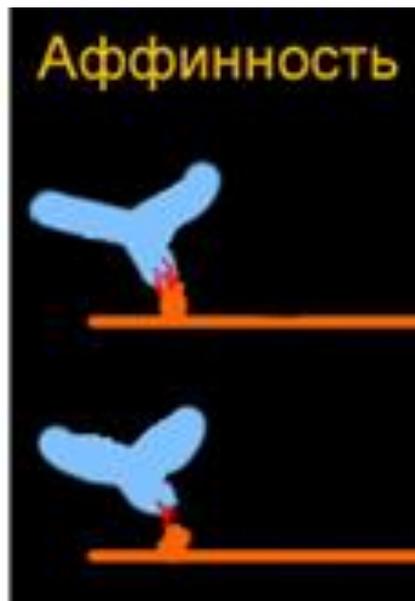
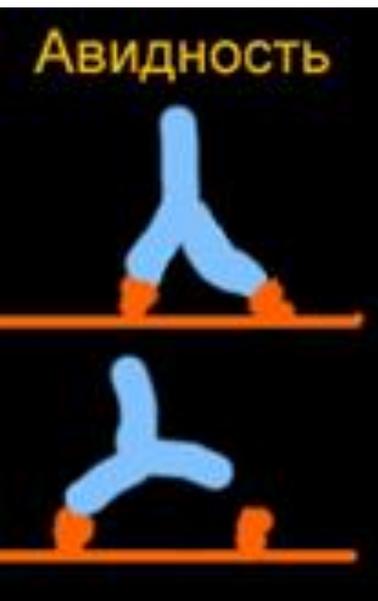
- **Антитела имеют синонимы: иммуноглобулины, гамма-глобулины, в изосерологии – агглютинины.**



**Специфичность
антител – это их
способность
реагировать
только с
определенными
антигенами.**



- Авидность (от лат. avidity – жадный) – свойство, характеризующее прочность связи комплементарной части молекулы антитела с антигеном.
- Под авидностью понимают качество, степень агглютинации.



Аффинность –
степень прочности
(необратимости)
реакции антиген-
антитело.

Авидность определяется аффинностью (от латинского affinis – родственный) антитела к антигену. Авидность антитела следует отличать от аффинности, так как аффинность является термодинамическим параметром, количественно описывающим силу единственного взаимодействия антигена и антитела, в то время как авидность описывает силу кооперативных взаимодействий аффинных взаимодействий

Классификация антител, исследуемых в иммуногематологии

- **Антитела, присутствие которых характерно для образцов крови большинства людей, называются регулярными (например, естественные групповые изоагглютинины α и β системы АВО).**
- **Антитела, появляющиеся в результате сенсibilизации, называются иррегуляторными (например, анти-А и анти-В по системе АВО, по системе Резус, Келл).**

- **Естественные антитела** (они же регулярные) содержатся в организме человека в небольших количествах. Появляются они, по-видимому, в результате незаметной фоновой иммунизации веществами окружающей среды. К ним относятся агглютинины α и β сыворотки крови, гетерофильные антитела.
- **Иммунные антитела** (они же иррегулярные) появляются в ответ на активное воздействие антигена (несовместимое переливание крови, беременность, несовместимая по антигенам эритроцитов).

- В зависимости от условий, в которых антитела агглютинируют эритроциты, антитела подразделяются на несколько групп:
- **полные агглютинирующие антитела;**
- **неполные агглютинирующие антитела;**
- **неполные блокирующие антитела.**

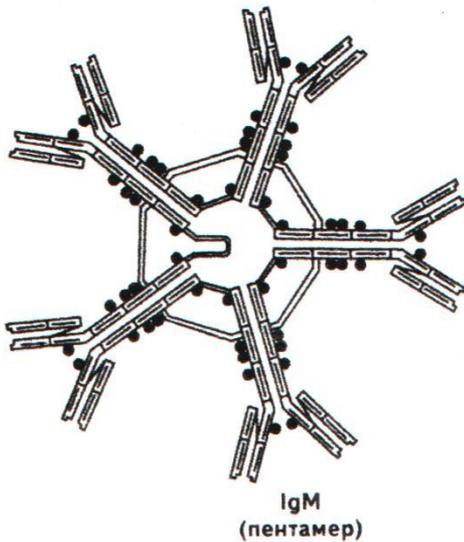
Полные антитела можно выявить в солевой среде при комнатной температуре или ниже (холодовые) или после подогревания до температуры тела человека (тепловые).

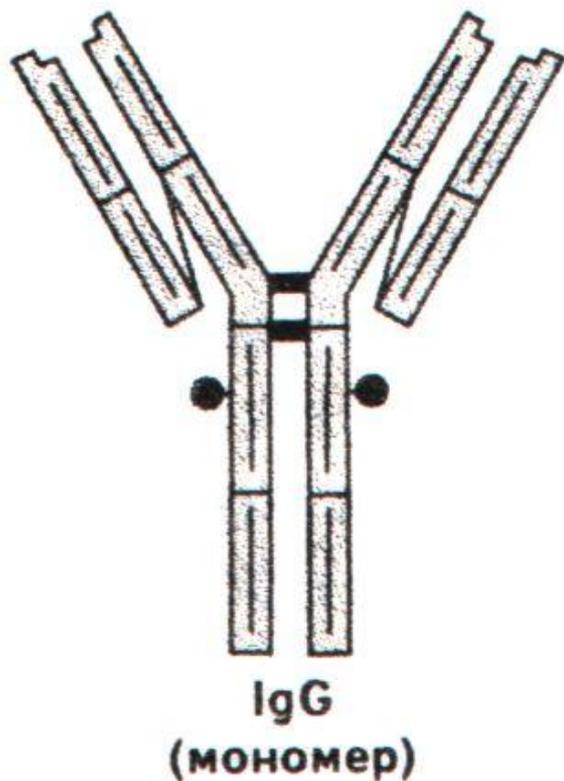
Неполные агглютинирующие антитела выявляются только в коллоидной среде, для чего в реакцию добавляют желатин, полиглюкин или альбумин.

Неполные блокирующие антитела не имеют достаточной силы (авидности) для агглютинции эритроцитов, помочь в которой могут античеловеческие антитела сыворотки Кумбса.

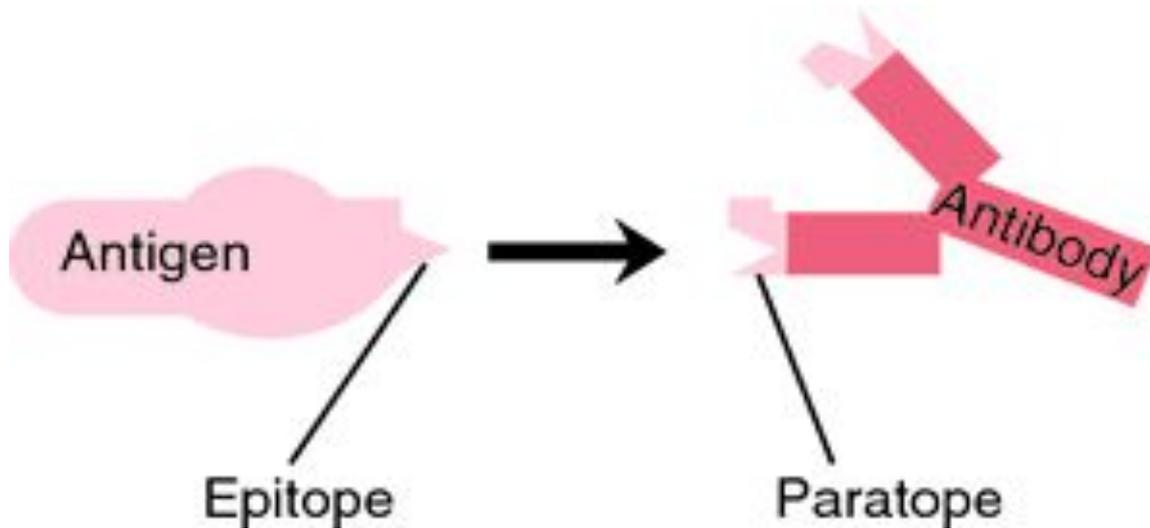
- По структуре иммуноглобулины делятся на **5 классов: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD**. Для трансфузиологии наиболее интересны 3 первые группы.

- **Иммуноглобулины M (IgM)** вырабатываются в ответ на первое воздействие антигена. Их присутствие свидетельствует о свежем иммунном конфликте. Это полные антитела, они способны вызывать агглютинацию эритроцитов в физиологическом растворе. Из-за крупных размеров (молекулярный вес 900 тыс.) они не способны проникать через плаценту. Через 2-3 недели IgM сменяются на **иммуноглобулины G (IgG)** с молекулярным весом 160 тыс. той же специфичности, но способных проникать через плаценту



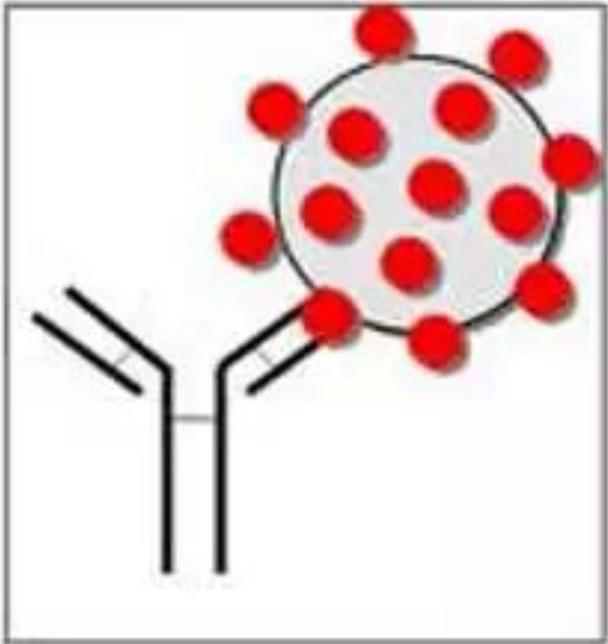


- **IgG** представлены **4 подклассами**: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; их относительное содержание составляет 66-70%, 23%, 7-8% и 2-4% соответственно. IgG непосредственно участвуют в реакциях иммунного цитолиза.
- У плода концентрация фетального IgG достигает 10% от взрослых значений к 20-й неделе беременности. Однако его насыщенность к 22-28 неделе стремительно увеличивается.



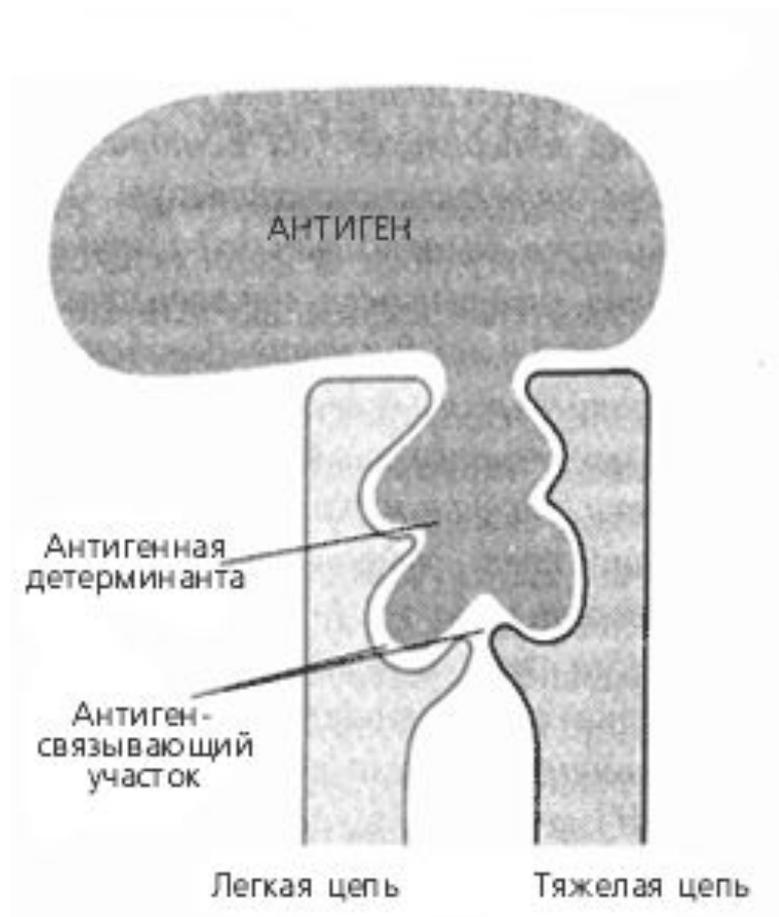
- **Эпитоп** – часть макромолекулы антигена (группа аминокислотных остатков белкового антигена или участок полисахаридной цепи).
- **Паратопом** – часть антитела, распознающая эпитоп.

Сущность процессов агглютинации



Агглютинация (позднелат. agglutinatio – склеивание) – склеивание и выпадение в осадок корпускулярных частиц – бактерий, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, клеток тканей, корпускулярных химически активных частиц с адсорбированными на них антигенами или антителами, взвешенных в среде электролитов (рис.). На рис. схематично показан процесс взаимодействия антигена с антителом.

Процесс взаимодействия антигена и антитела



- Гемагглютинация является двухфазной реакцией:
- фаза взаимодействия, в которой связываются антитела с преодолевающими инерцию антигенами отдельных эритроцитов;
- агглютинационная фаза (фаза проявления), в которой нагруженные переносимыми антителом клетки отождествляются с помощью дополнительных тестов

- Основными переменными величинами окружающей среды, влияющими на процесс агглютинации, являются: температура, кислотно-щелочное состояние среды (значения рН), сила ионов и диэлектрические константы.
- Ионная сила раствора – мера интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе, которая существенно сказывается на проявлении реакции «антиген–антитело». В среде с низкой ионной силой (Liss – Low ionic strength solution) фиксация неполных антител человека на эритроцитах происходит быстрее и повышается прочность комплекса антиген-антитело.

Раствор низкой ионной силы "LISS"



Предназначен для:

использования при постановке антиглобулинового теста (проба на индивидуальную совместимость донора и реципиента);

тестирования сыворотки пациента на наличие иммунных антител;

определения специфичности иммунных антител;

определения антигенов эритроцитов с помощью реагентов, содержащих неполные антитела.

Техника определения группы крови с помощью стандартных тест-сывороток



Определение группы крови проводится в помещении с хорошим освещением при температуре от $+15^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$. Для соблюдения температурного оптимума исследования в холодных или жарких условиях можно соответственно подогреть или охладить пластину, которой пользуются для определения группы крови.

Материал для исследования

Определение производится в нативной крови, взятой в консервант (цитрат натрия, ЭДТА, гепарин), в крови, взятой без консерванта, в том числе взятой из пальца.

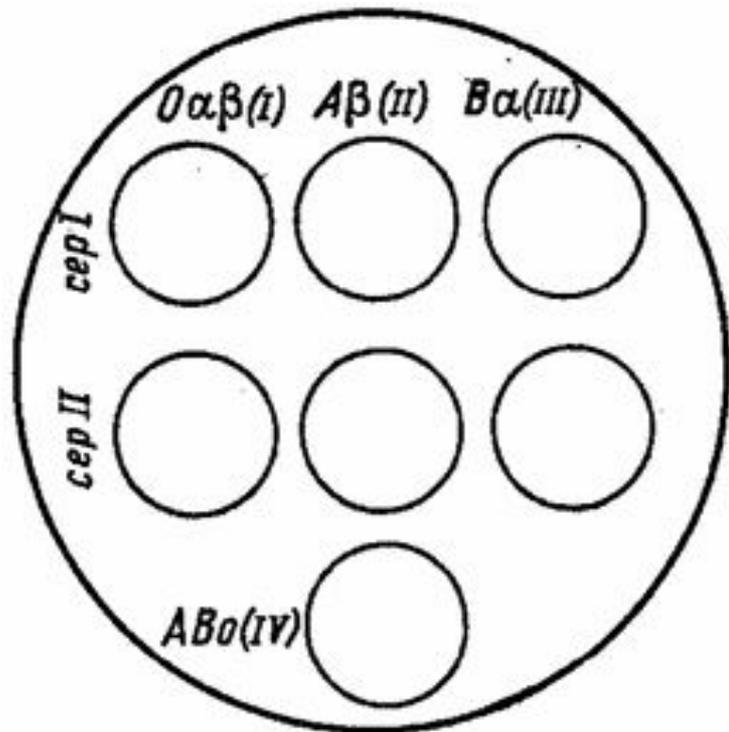
Гемолизированный образец должен быть заменен новым образцом, хилезная кровь также не используется.

Материал для исследования:

кровь, взятая из пальца или вены без консерванта;

кровь, взятая со стабилизатором (цитрат натрия, ЭДТА, гепарин).

Не используется гемолизованная и хилезная кровь.



На чистой, сухой и обезжиренной пластине с левой стороны надписывают $O\alpha\beta$ (анти- $A+B$), в середине $A\beta$ (анти- B) и справа $B\alpha$ (анти- A), на верхнем крае – фамилию и инициалы лица, у которого определяют группу крови.

Рядом с каждой каплей сыворотки наносят маленькую каплю (0,01 мл) исследуемой крови, соблюдая соотношение 10:1.

Смешивают каплю сыворотки с каплей крови индивидуальной чистой стеклянной палочкой. После размешивания каплю пластинку покачивают, затем на 1-2 минуты оставляют в покое и снова периодически покачивают.





Через 3 минуты в капли смеси сыворотки с эритроцитами, в которых наступила агглютинация, добавляют по одной капле (0,05 мл) изотонического раствора хлорида натрия и продолжают наблюдение при периодическом покачивании пластинки до истечения 5-ти минут. Оценка результата: реакция в каждой капле может быть положительной (наличие агглютинации эритроцитов) или отрицательной (отсутствие агглютинации).

O(I)

O $\alpha\beta$ (I)



A β (II)



B α (III)

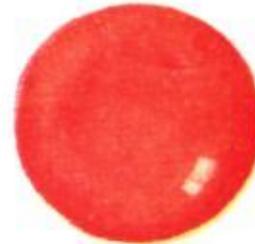


A(II)

O $\alpha\beta$ (I)



A β (II)



B α (III)



B(III)

0 $\alpha\beta$ (I)



A β (II)



B α (III)



AB(IV)

O $\alpha\beta$ (I)



A β (II)



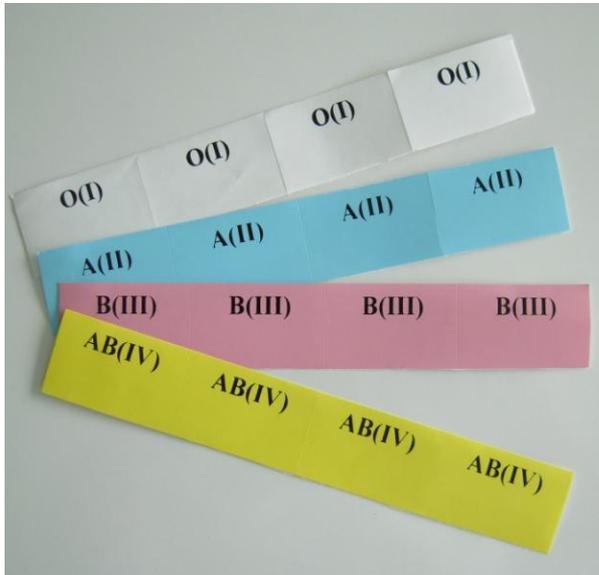
B α (III)



AB (IV)



Оформление образца крови для направления на изосерологическое исследование в клинико-диагностическую лабораторию



Результаты исследования немедленно вносятся:

- на пробирку для лабораторного исследования, путем наклеивания цветной марки соответствующей группы крови, на которой указывается номер медицинской карты стационарного пациента, фамилия, имя, отчество больного и дата взятия крови;

- направление для лабораторного исследования, в клиничко-диагностическую лабораторию, на котором указывается номер медицинской карты стационарного пациента, фамилия, имя, отчество больного и дата взятия крови.

КЛАССИФИКАЦИЯ КРОВИ ПО ГРУППАМ

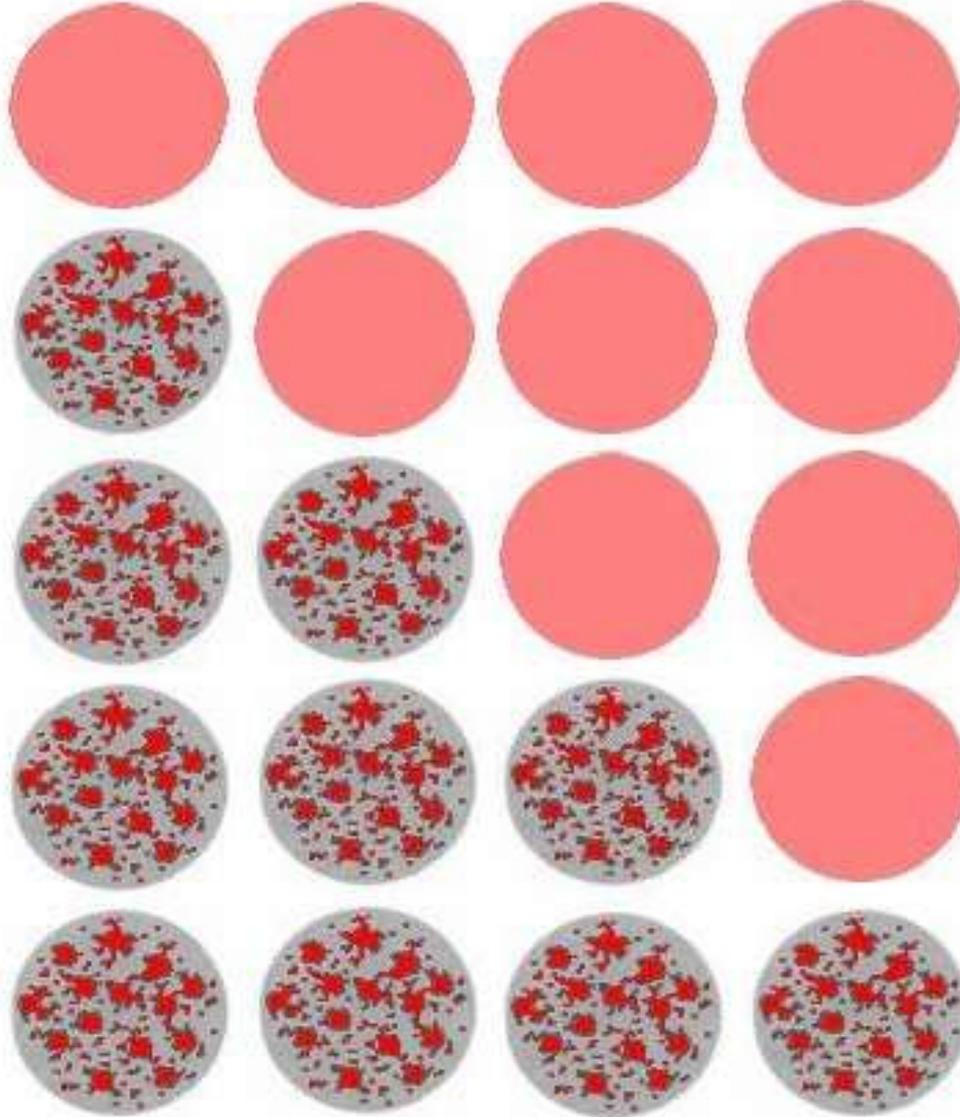
ГРУППА	A	B	AB	O
ЭРИТРОЦИТЫ				
АНТИТЕЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ	 АНТИ-B	 АНТИ-A	НЕТ	 АНТИ-B И АНТИ-A
АНТИГЕНЫ В МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТОВ	 A	 B	 A И B	 НЕТ

АНТИ- A	АНТИ- B	I (0 α β)
АНТИ- A	АНТИ- B	II (A β)
АНТИ- A	АНТИ- B	III (B α)
АНТИ- A	АНТИ- B	IV (A B)

Моноклональная технология



анти-А анти-В анти-Д NaCl 0.9%





Группа крови по системе АВО до 6 месяцев жизни может быть определена только по эритроцитным антигенам ребенка с помощью сывороток или моноклональных реагентов, содержащих антитела в стандартизированных концентрациях.

ПРИЧИНЫ ОШИБОК И МЕРЫ ИХ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ



- технических условий проведения реакции;
- методических условий проведения реакции;
- связанной с биологическими особенностями исследуемой крови.



К нарушениям, связанным с техническими сторонами реакции, относятся:

- несоблюдение условий взятия крови, доставки проб крови, оформления направления и маркировки пробирки;
- перепутывание при вклеивании в медицинскую карту анализов, механические ошибки при переписывании результатов;
- ошибочный порядок расположения стандартных сывороток и эритроцитов в штативах и неправильное нанесение их на пластинку;
- загрязнение или применение мокрых пипеток, пластинок, палочек, неправильная маркировка пипеток; использование недоброкачественных стандартов, например, сыворотки с истекшим сроком годности (недостаточно активной), загрязненной, помутневшей или частично высохшей, которая может вызвать неспецифическую реакцию агглютинации.



Для предупреждения возможных ошибок такого свойства необходимо в начале работы тщательно проверить расположение в штативах стандартных реагентов, сывороток, эритроцитов, их качество, групповую принадлежность, номер серии, срок годности. Строго соблюдать правила взятия крови, выписки направления, маркировки и доставки проб крови.



Ко второй возможной группе ошибок относятся несоблюдение методики определения группы крови и, как результат, - неправильная оценка реакции как в целом, так и в каждой отдельной капле, заключающаяся в следующем:

- лицо, определяющее группу крови, считает, что агглютинации не произошло, в то время как она фактически должна появиться (ложноотрицательный результат);
- лицо, определяющее группу крови, предполагает, что произошла агглютинация, в то время как она фактически отсутствует (ложноположительный результат);



Ложноотрицательный результат реакции проявляется при:

несоблюдении времени, необходимого для проведения реакции (5 минут). В случае, если эритроциты исследуемого лица обладают слабой агглютинабельностью, стандартная сыворотка в течение первых минут реакции дает замедленную, нечеткую, слабовыраженную агглютинацию, которая постепенно усиливается только к 5-ой минуте. Наиболее частой ошибкой является невыявление слабой подгруппы $A_2B(IV)$, которую ошибочно относят к $B(III)$, и подгруппы $A_2(II)$, которую ошибочно относят к $O(I)$ группе;



Ложноотрицательный результат реакции проявляется при (продолжение):

- неправильном соотношении количества сыворотки и эритроцитов; при избытке крови, если взята слишком густая капля крови и не выдержано соотношение крови и сыворотки 1:10;
- неполном смешивании сыворотки и эритроцитов (плохо размешана капля, не покачивается пластинка);
- нарушении температурного режима реакции (температура ниже $+15^{\circ}\text{C}$ и температура выше $+27^{\circ}\text{C}$).



Ложноположительный результат реакции наблюдается при:

- неспецифической агглютинации, когда эритроциты исследуемой крови складываются в «монетные столбики», которые невооруженным глазом можно принять за агглютинаты;
- при феномене ауто- или панагглютинации, когда исследуемые эритроциты агглютинируются стандартными сыворотками всех групп, включая АВ (IV), а также сывороткой исследуемой крови;
- при подсыхании капли, когда пластинку со смесью эритроцитов и сыворотки не покачивают или удлиняют время наблюдения сверх 5 минут.



В этих случаях необходимо:

провести повторное исследование испытуемой крови перекрестным методом для установления полной формулы крови по системе АВО, заменив стандартные изогемагглютинирующие сыворотки другими сериями;

для исключения неспецифической агглютинации необходимо добавить одну каплю (0,05 мл) изотонического раствора хлорида натрия во все капли, где произошла агглютинация с последующим покачиванием пластинки;

для исключения феномена ауто- или панагглютинации необходимо отмыть испытуемые эритроциты теплым изотоническим раствором хлорида натрия (температура $+37^{\circ}\text{C}$) путем центрифугирования и повторить реакцию со стандартными сыворотками.

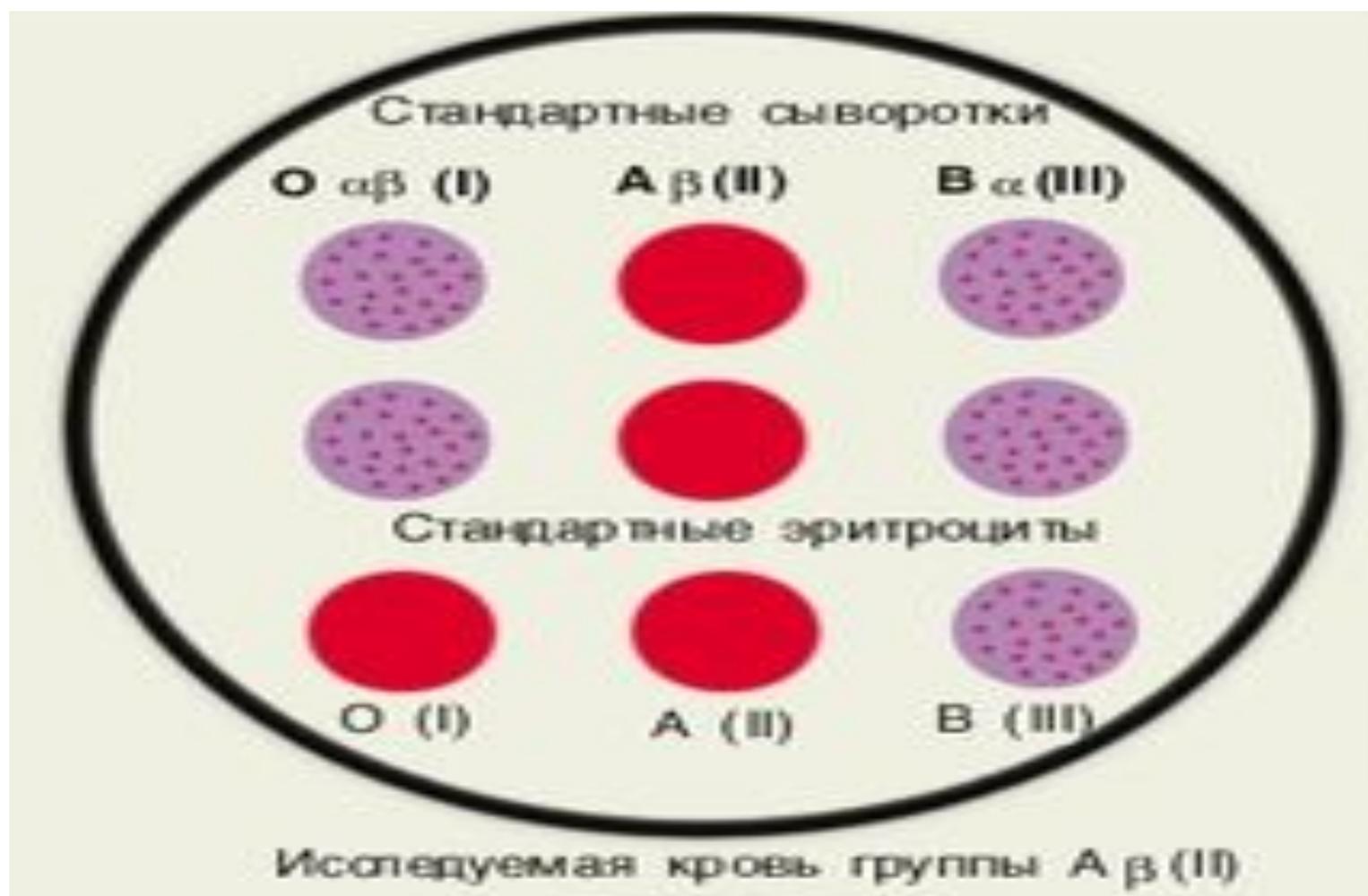


Ошибки, связанные с биологическими особенностями исследуемой крови



Могут быть обусловлены наличием слабых антигенов – A_2 , B_2 , A_2B , AB_2 , экстраагглютининов, панагглютинации, аутоагглютинации, кровяной химеры вследствие гемотрансфузии, ослаблением агглютинабельности эритроцитов при онкопатологии.





Стандартные сыворотки

O $\alpha\beta$ (I)

A β (II)

B α (III)



Стандартные эритроциты

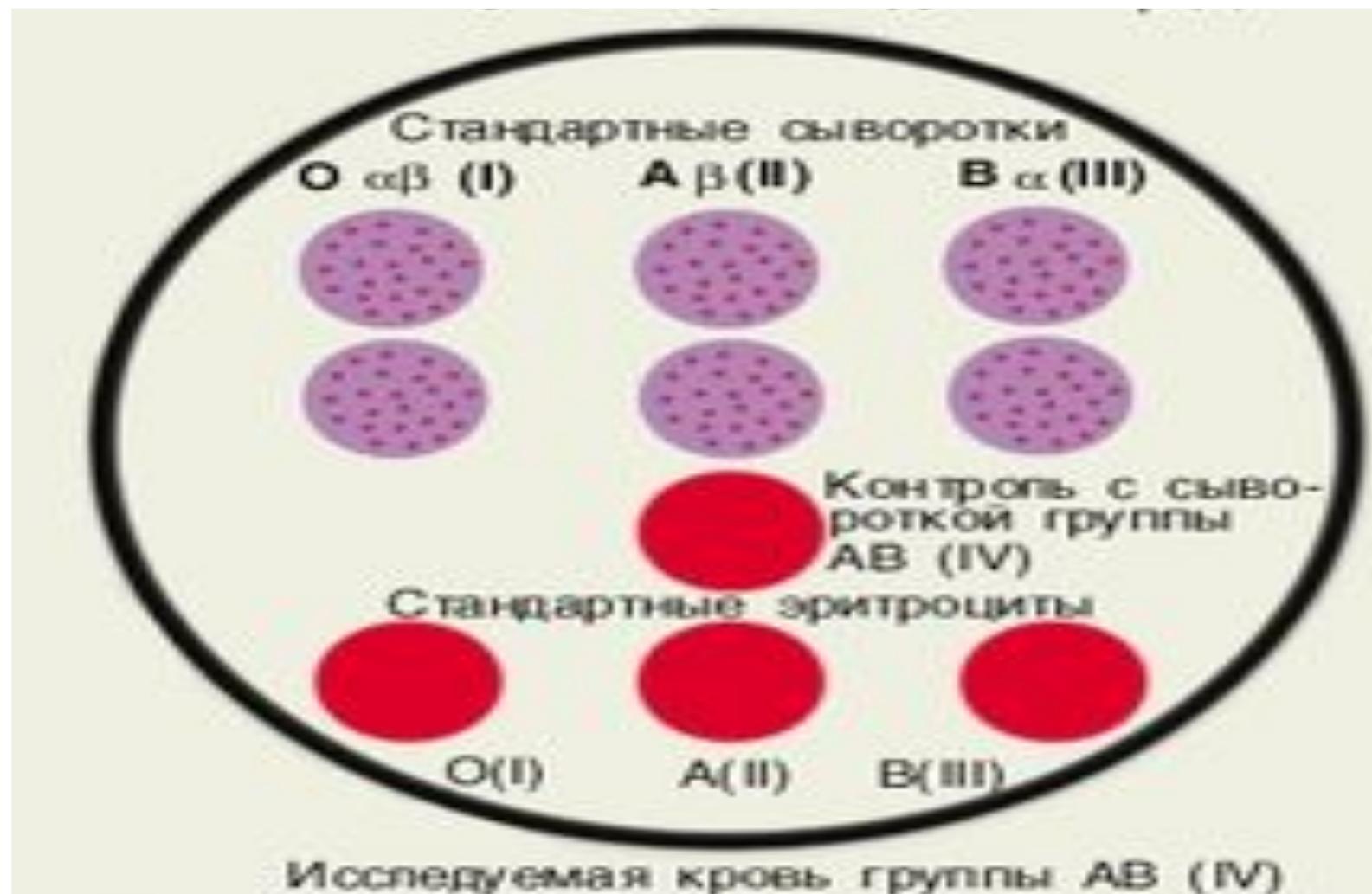


O (I)

A (II)

B (III)

Исследуемая кровь группы **B** α (III)



A1 > A2 > A3 > ... Ax

РЕЦИПИЕНТАМ С ГРУППОЙ КРОВИ A2,3,4 —
x (II) НЕОБХОДИМО ПЕРЕЛИВАТЬ **ОТМЫТЫЕ**
ЭРИТРОЦИТЫ O (I), СЗП — A(II)

РЕЦИПИЕНТАМ С ГРУППОЙ КРОВИ A2,3,4B
(IV) - НЕОБХОДИМО ПЕРЕЛИВАТЬ **ОТМЫТЫЕ**
ЭРИТРОЦИТЫ B (III), СЗП — AB (IV)

РЕЦИПИЕНТАМ С ГРУППОЙ КРОВИ AB2 —
(IV) НЕОБХОДИМО ПЕРЕЛИВАТЬ **ОТМЫТЫЕ**
ЭРИТРОЦИТЫ A (II), СЗП — AB (IV)



Значение для переливания



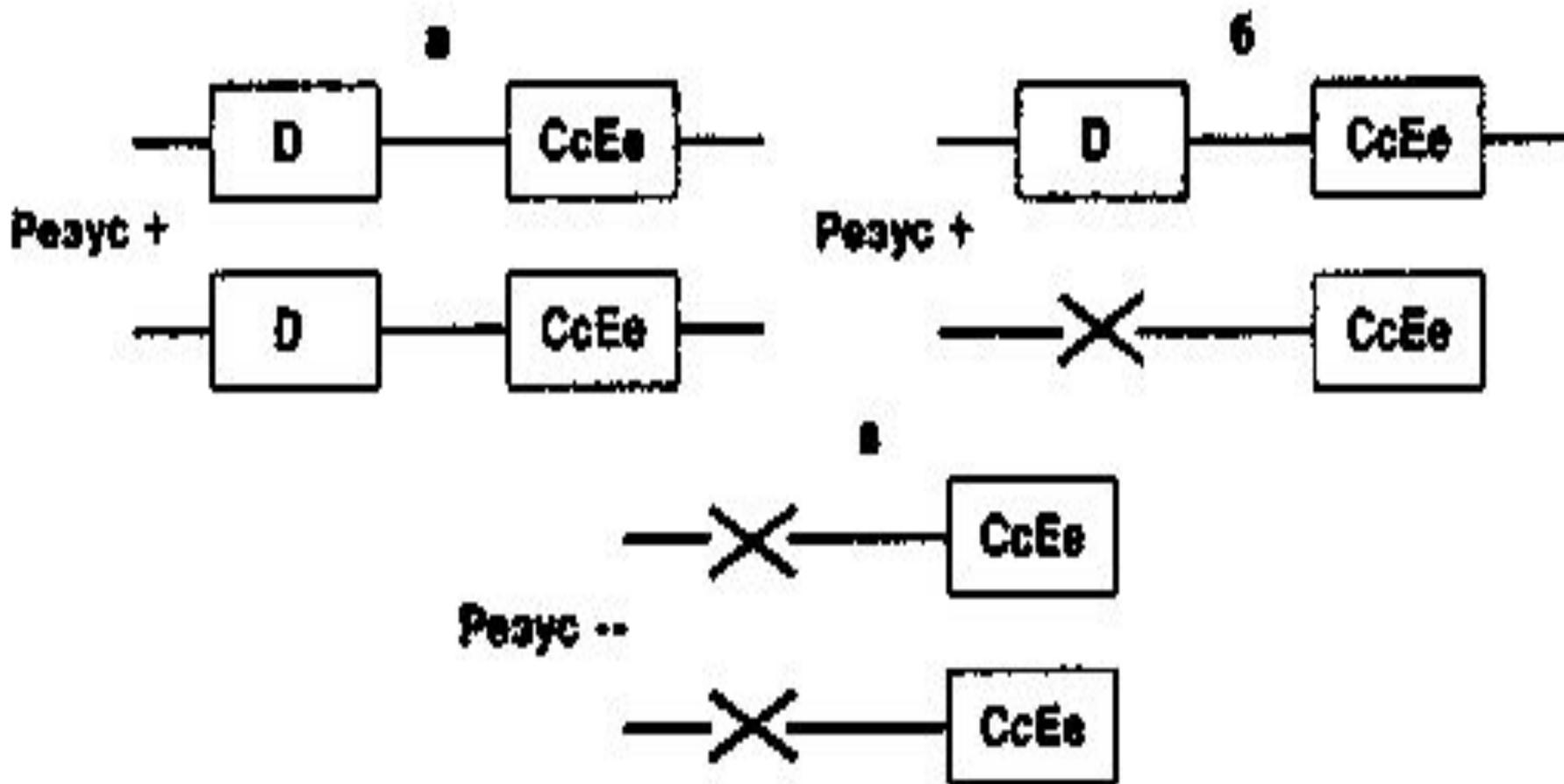
Система Резус

Номенклатура Винера		Номенклатура Фишера	
Rh_0	Hr_0	D	d
rh'	hr'	C	c
rh''	hr''	E	e



Макак-резус (или макака-резус) является видом мартышек-макак, наиболее распространенным и многочисленным среди всех приматов (не считая человека). Основанный на серологических сходствах резус-фактор макаки, обнаруженный в 1919 году, впоследствии был использован для антигенов и анти-Rh-антител, найденных у тех людей, которые были описаны ранее Левиным и Стетсоном. Хотя различия между этими двумя сыворотками были обнаружены еще в 1942 году и наглядно продемонстрированы в 1963 году, широко применяемый термин «резус» использовался для клинического описания человеческих антител, которые отличаются от тех, которые связаны с системой Резус обезьяны. Этот реальный фактор, найденный в системе Резус макаки, был классифицирован в системе антигена Ландштейнера-Винера (антиген LW, антитела анти-LW), названной в честь первооткрывателей.

Схема вариантов генотипов системы Резус



Частота встречаемости антигенов системы Резус

- **D – 85%**
- **C – 70%**
- **E – 30%**
- **c – 80%**
- **e – 97,5%**

- * Антигена d не существует
- * dd обозначает отсутствие в фенотипе антигена D
- * Dd – генотип гетерозиготы по этому признаку

Частота встречаемости фенотипов системы Резус

CcDee - 34%

CCDee - 19,5%

CcDEE (полный фенотип) - 14%

ccddee (D и резус - отрицательный) - 13%

ccDEE - 12%

ccDee - 3%

cDEE - 2,9%

Ccddee - 1%

CcddEe - 0,5%

ccddEe - 0,1%

C^w – встречается у 2%
людей

CcC^wDee

(вариант фенотипа)

Всего в системе Резус открыты **54 антигена**, среди которых 26 – редко встречающиеся.

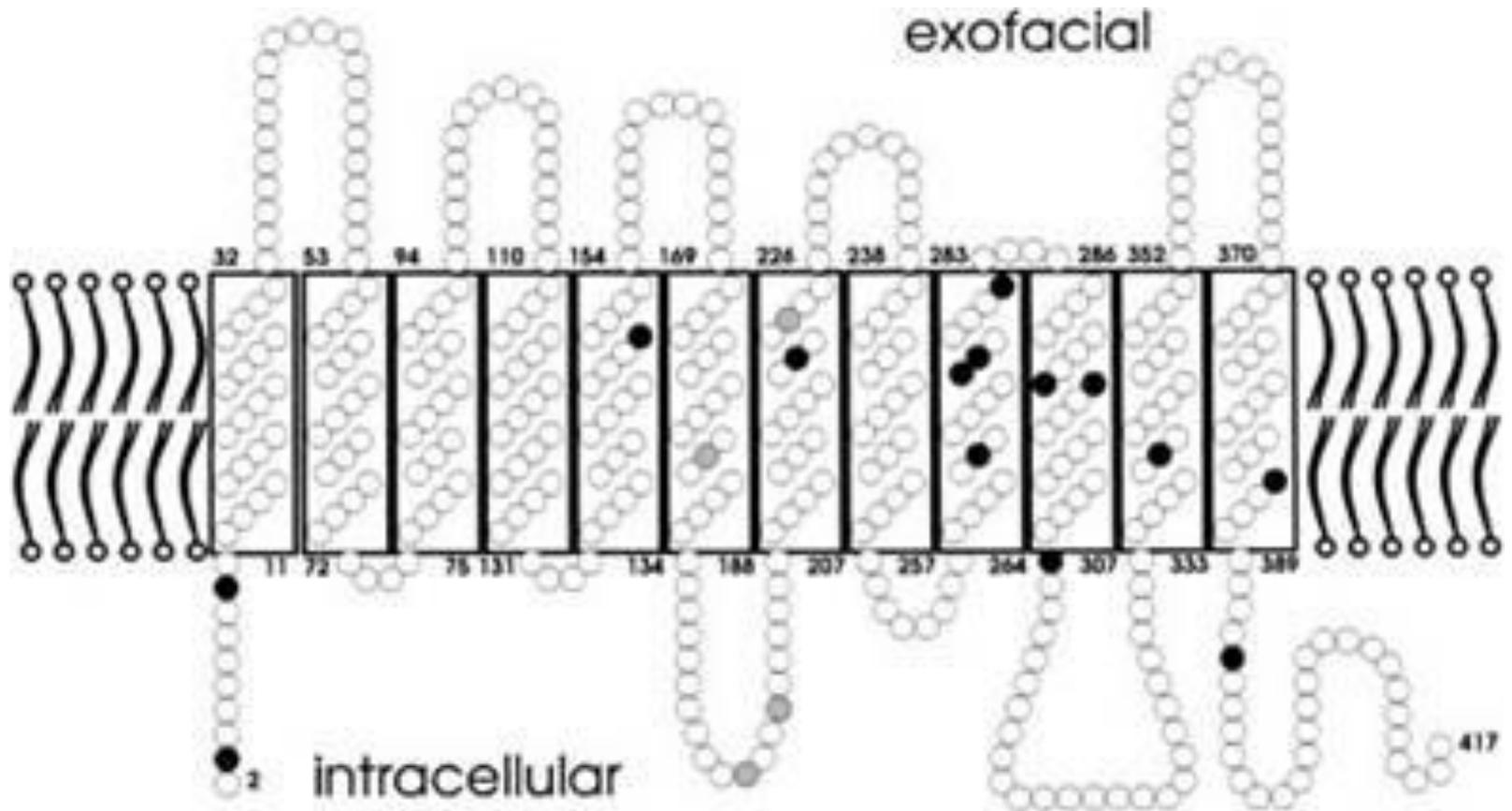
Известно более **200 аллелей гена RHD** и **более 100 аллелей гена RHCE**.

Люди с вариантными антигенами RHCE могут вырабатывать антитела к антигенам системы Rh. Подозрение на наличие вариантного антигена RHCE возникает при обнаружении соответствующего антитела (например, **анти-С или анти-е в плазме С+ или е+** пациента соответственно), а также при вариабельности результатов типирования.

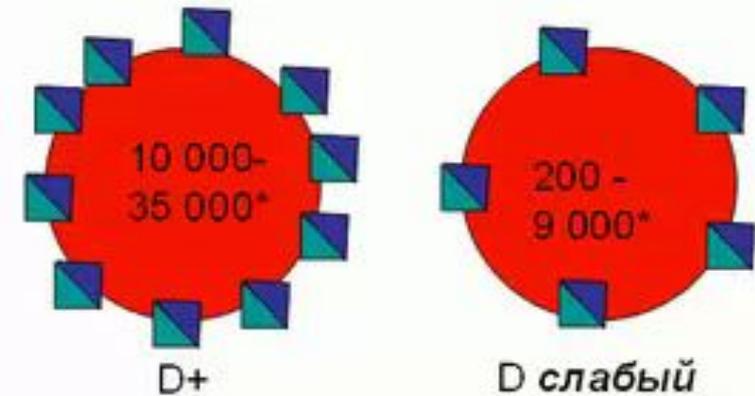
При выявлении аутоантител анти-С, -Се, -е, -Е (но не анти-с) их нужно дифференцировать от аллоантител.

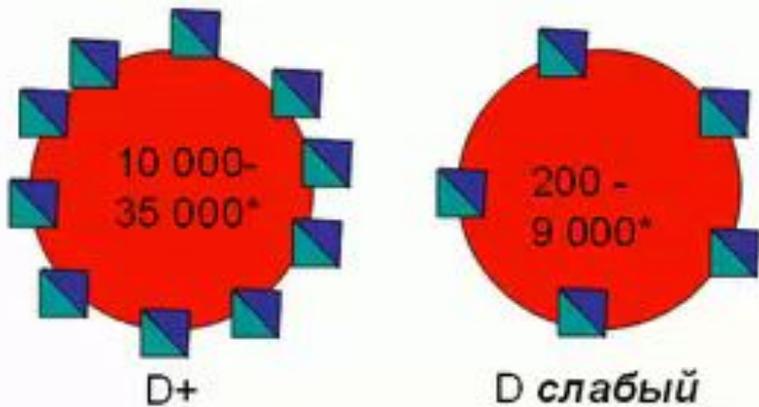
Может потребоваться не только серологическая, но и генетическая совместимость донора и пациента.

Антиген D системы Резус



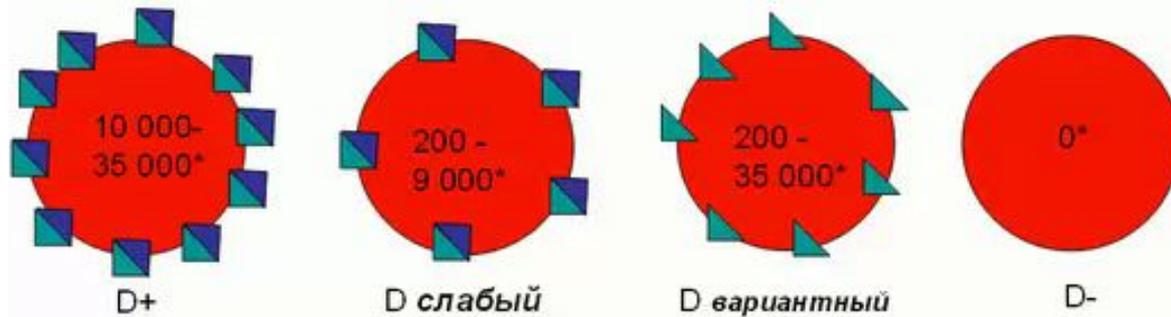
- В 1946 году был обнаружен антиген D системы Резус, который слабо реагирует с сывороткой анти-D. Среди европеоидов он встречается с частотой 0,1%. В настоящее время официальное его название – **слабый антиген D (weak D)**. Он отличается от обычного антигена D уменьшенным количеством обычного антигена, соединяющегося с антителами.





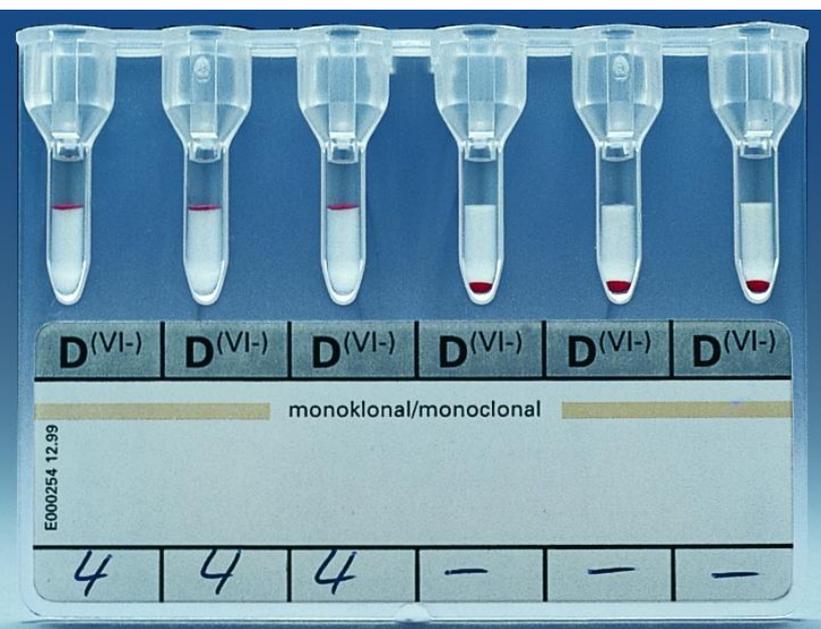
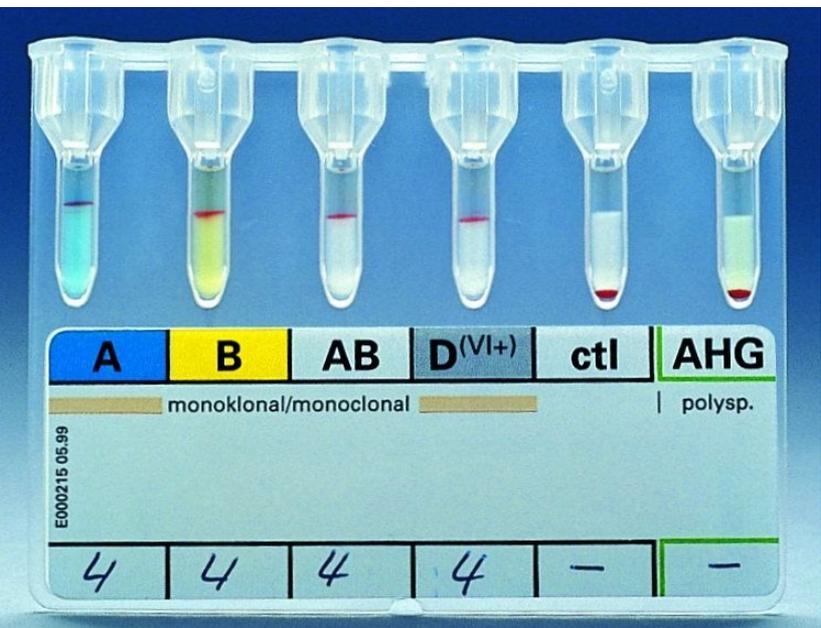
D weak

Сплошь и рядом, на всякий случай, их относят к резус-отрицательным, чем, говоря словами одного из героев популярного мультфильма, «портят статистику» распространения резус-принадлежности в женской половине популяции, неоправданно затрачивают трудовые и финансовые ресурсы на динамику наблюдения за этой когортой напрасно напуганных беременных. Лица Dw-антигеном как D-положительные не способны образовывать анти-D-антитела как на переливание резус-положительной крови, так и ни при беременности D-положительным плодом.

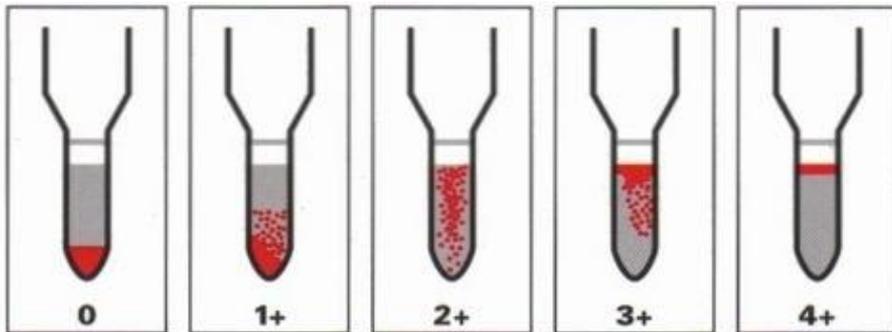


D partial

- В отличие от обычного антигена D, а также его разновидности D weak (слабого антигена), встречается 36 разновидностей парциальных (вариантных, частичных) антигенов D (D-partial). Они определяются в гелевой технологии.
- Для переливания крови и для беременности существенное значение имеет вариант D^{VI} частичного антигена D, который за счет «бедности» эпитопов схож с резус-отрицательным антигеном и способен реагировать на резус-положительные эритроциты донора и плода выработкой антиэритроцитных антител и риском возникновения гемолитической болезни плода и новорожденного.



- В клинко-диагностической лаборатории с помощью гелевой технологии все перечисленные разновидности антигена D можно установить.
- Для более точного определения категорий антигена D необходимы молекулярно-биологические методы исследования (ПЦР – полимеразная цепная реакция).



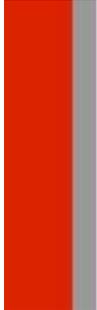
Если выявлен D^{VI} – вариантный антиген D, то кровь ее признается резус-отрицательной, так как при беременности плодом с резус-положительной принадлежностью эритроцитов у беременной женщины могут образоваться анти-D антитела.



Система Резус. Антигены системы Резус.

- 2-е место после антигена D по иммуногенности занимает антиген c
- Все rh- (отр) лица содержат антиген c
- 20% Rh+ лиц имеют CCD (группа риска)
- Так как rh- (отр) кровь содержит антиген c, она не является универсальной
- Истинно резус-отрицательным является тот человек, у которого нет антигенов D, C, E

Иммуногенность антигенов системы Резус:



D > c > E > C_w > C >
e

ccddee D — отрицательный , Rh-отрицательный
(реципиент и донор)

cCddee D — отрицательный, Rh-положительный
донор, но резус — отрицательный реципиент

ccddEe D — отрицательный , Rh-положительный
донор, но резус — отрицательный реципиент

ПЛАНШЕТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ



анти-А



анти-В



анти-АВ



Контроль



анти-С



анти-с



анти-С^w



анти-D



анти-Е



анти-е



анти-К



анти-к

Иванов И.И. A(II)Rh⁺(C⁺c⁺C^{w-}D⁺E⁻e⁺)K⁺k⁻

Фамилия, И.О.

Фенотип

Дата

Подпись

Порядок проведения анализа на наличие резус-фактора (RhD) с использованием реагента анти-D IgG



Моноклон анти-D IgG, применяемый для анализа крови на наличие резус-фактора (RhD), может быть использован в непрямом антиглобулиновом тесте (непрямая проба Кумбса) или в реакции конглоутинации с желатином в пробирочном тесте.

Непрямой антиглобулиновый тест (непрямая проба Кумбса)

- Приготовьте образец исследуемой крови. Для этого в пробирку внесите примерно 0,25 мл крови, три раза отмойте эритроциты в физиологическом растворе.



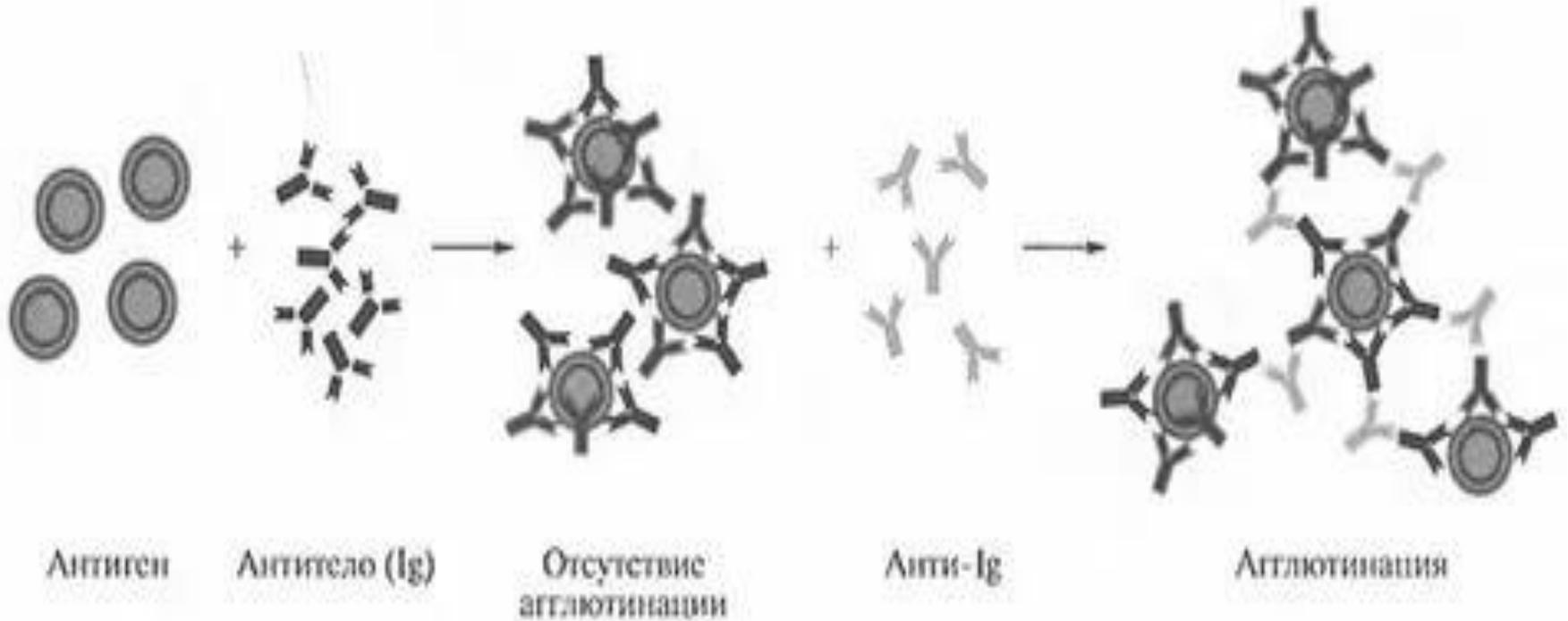


- Ресуспендируйте осадок в 2 - 3 мл физиологического раствора или в растворе с низкой ионной силой – LISS для получения 2 – 5 % суспензии исследуемых эритроцитов.
- Промаркируйте чистую пробирку, указав фамилию, имя, отчество исследуемого лица.



- Внесите в пробирку одну каплю 2 – 5 % взвеси исследуемых эритроцитов.
- Инкубируйте смесь в термостате или на водяной бане при температуре + 37 ° С в течение 10 - 15 мин.
- Добавьте в пробирку 5 мл физиологического раствора. Центрифугируйте пробирку со смесью в течение 2 - 5 мин. при 2000 об./мин. Полностью удалите физиологический раствор.
- Добавьте одну каплю (~ 0,1 мл) антиглобулинового реагента к осадку эритроцитов и тщательно перемешайте.

Непрямая проба Кумбса





- Центрифугируйте пробирку с исследуемым образцом эритроцитов в течение 15 - 20 секунд при 2000 об./мин.
- Осторожно ресуспендируйте осадок эритроцитов и визуально определите наличие или отсутствие агглютинации. При положительном результате на дне пробирки образуется один или несколько крупных агглютинатов на фоне прозрачного раствора.
- Менее выраженная агглютинация свидетельствует о наличии на эритроцитах вариантов антигена D (DI - DVII).
- В случае отрицательного результата анализа на резус-фактор осадок легко разбивается и представляет собой непрозрачную суспензию эритроцитов.

Реакция конглотинации с желатином в пробирочном тесте

- Промаркируйте чистую пробирку, указав фамилию, имя, отчество исследуемого лица.
- В пробирку внесите одну каплю (0,05 - 0,1 мл) исследуемой крови. Добавьте две капли по 0,1 мл 10 % желатина, предварительно прогретого в термостате или на водяной бане при температуре + 48 °С до разжижения. Добавьте две капли по 0,1 мл реагента для анализа на наличие резус-фактора Изосероклонтм анти-D IgG, тщательно перемешайте суспензию.
- Инкубируйте в течение 10 - 15 мин. на водяной бане или 30 мин. в термостате при температуре + 48°С. Добавьте в пробирку 5 мл физиологического раствора, закройте её резиновой пробкой, а затем осторожно переверните пробирку 1 - 2 раза.
- Результаты реакции оцените визуально. При положительном результате анализа крови на резус-фактор образуется один или несколько крупных агглютинатов на фоне прозрачного физиологического раствора. Менее выраженная агглютинация свидетельствует о наличии на эритроцитах вариантов антигена D ($D^I - DV^{II}$). При отрицательном результате образуется равномерная, непрозрачная суспензия эритроцитов.

Контроль специфичности



Для контроля специфичности (вне зависимости от используемой методики) с каждой серией анализируемых образцов крови следует выполнять контрольные исследования моноклонами анти-D IgG со стандартными D-положительными и D-отрицательными эритроцитами. Результаты считают действительными лишь в случае правильной реакции моноклонами анти-D IgG со стандартными эритроцитами.



Установлено, что от класса иммуноглобулинов может зависеть острота гемолиза, место преимущественной деструкции эритроцитов. При одновременном участии в патологическом процессе нескольких классов иммуноглобулинов отмечается усиление гемолиза.

Прямой антиглобулиновый тест (DAT)



В настоящее время применяется гелевый тест, аналогичный пробе Кумбса, но более чувствительный. Метод не требует отмывания эритроцитов, так как гель разделяет эритроциты и плазму.

- Принцип теста гелевой методики основан на реакции агглютинации эритроцитов. Агглютинация происходит тогда, когда антигены эритроцитов вступают в контакт с соответствующими антителами, присутствующими в реагенте либо в образце сыворотки или плазмы. В ходе центрифугирования и в зависимости от размера агглютинатов, агглютинированные эритроциты улавливаются на поверхности либо вдоль колонки с гелем. Неагглютинированные эритроциты оседают на дно микропробирки.
- Каждая микропробирка содержит гелевый раствор, смешанный с различными реагентами (антитела, античеловеческий глобулин или буфер). Микропробирки без антител используются в методиках, где антитела вступают в прямую реакцию с эритроцитами в распределительной камере. В соответствии с содержимым каждой микропробирки, существуют профили карт для проведения различных исследований.

Моноклональные антитела - революция в иммуногематологии

1975 г - Келер и Мильштейн предложили технологию получения **моноклональных антител**, которые синтезируются **гибридомами**, образованными путем слияния иммунного лимфоцита с миеломными клетками.

Преимущества моноклональных антител по сравнению с гемагглютинирующими сыворотками:

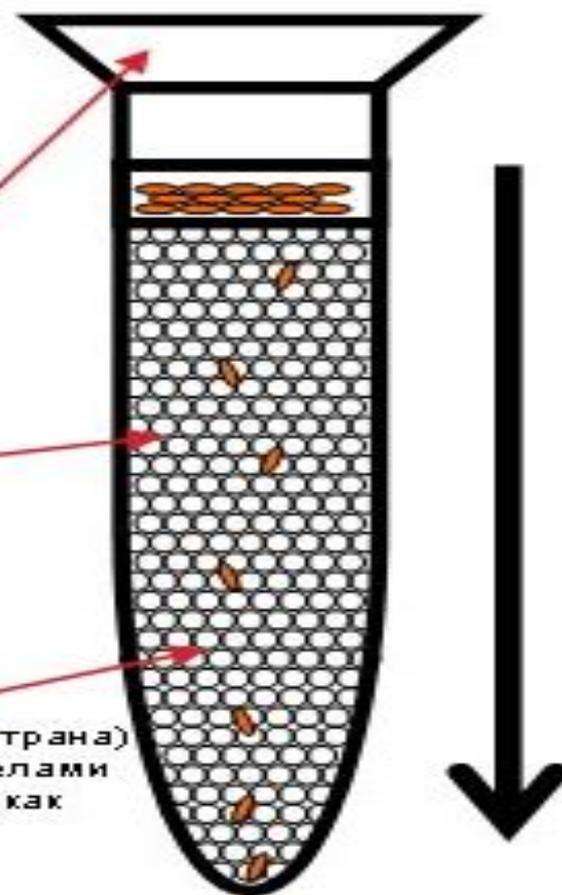
- производство антител не требует иммунизации;
- моноклональные реагенты заведомо свободны от патогенных микроорганизмов и безопасны для персонала;
- высоко специфичны и стандартизованы;
- Обладают необходимой активностью, которая задана в процессе отбора гибридом;
- Источник моноклональных антител неограничен, поскольку им является бесконечно делящаяся *in vitro* клеточная линия

Реакционная
камера

Колонка с
гелем



Гель (микросферы декстрана)
с добавленными антителами
или без них. Действует как
сито.



№1

№2

№3

№4

№5

№6

-

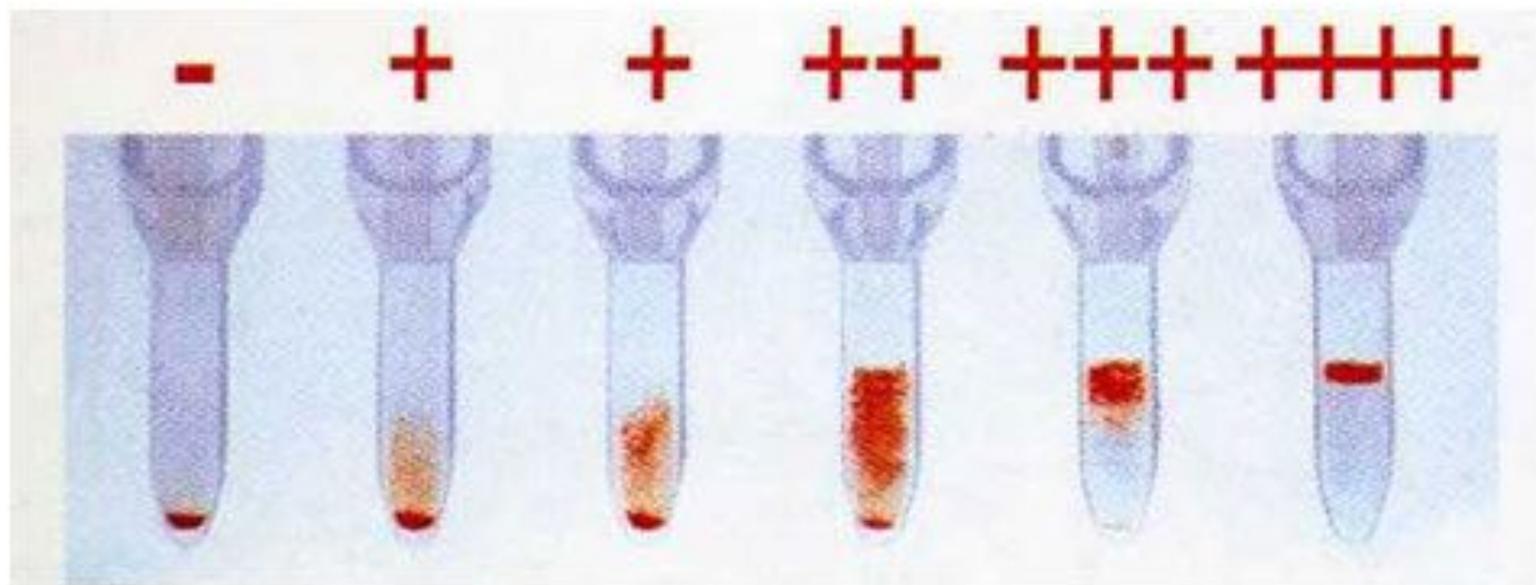
+

+

+++

++++

+++++





Скрининг антител

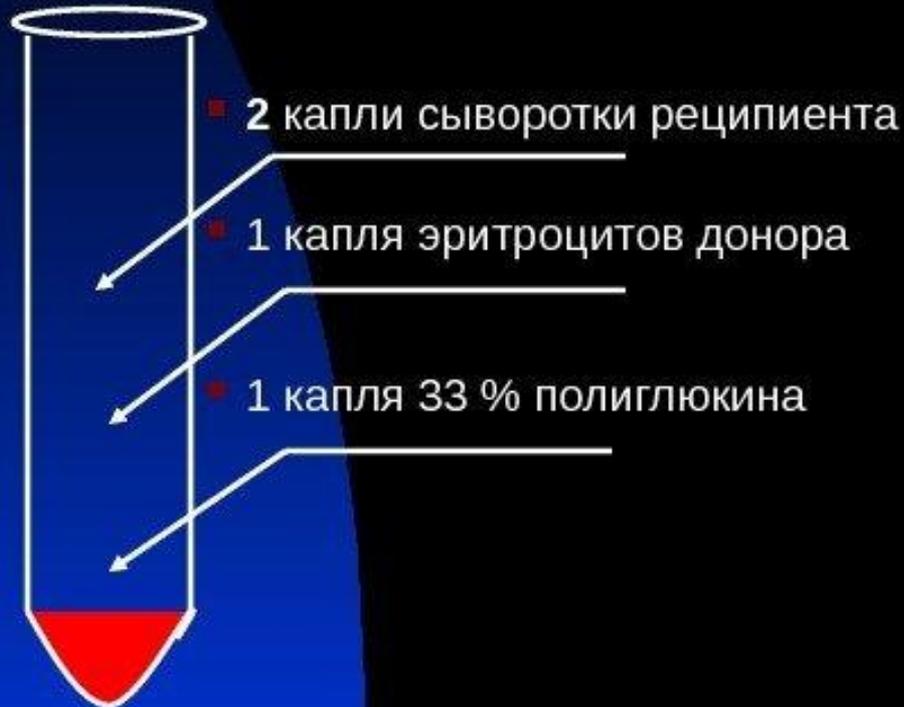
Скрининг антител выполняется как в нейтральном геле, так и в геле, содержащем антиглобулиновый реагент.

В первом случае для исследования используются обработанные ферментом эритроциты, во втором - суспензия эритроцитов в растворе низкой ионной силы. Скрининг и идентификация антител производятся с помощью стандартной панели эритроцитов.

При оценке эффективности гелевого теста для скрининга и идентификации антител была установлена его более высокая чувствительность по сравнению с традиционными методиками.

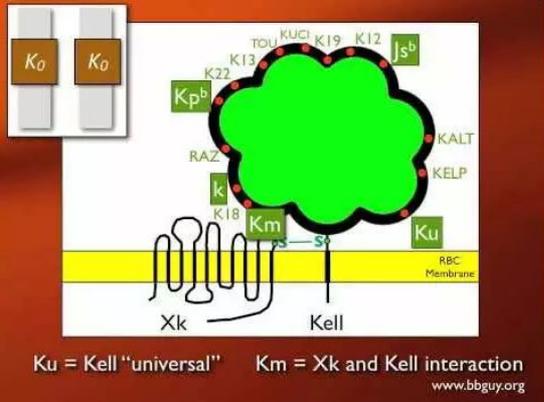
Проба на совместимость с применением 33 % полиглюкина

- Экспозиция 3 – 5 минут



- Реакция предназначена для выявления у реципиента неполных групповых антител.

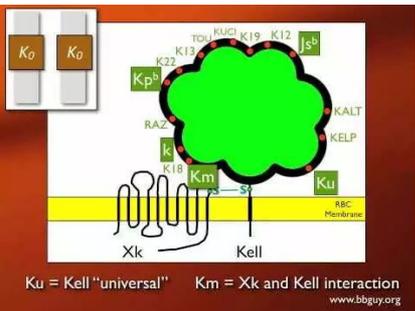
СИСТЕМА АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ КЕЛЛ (KELL)



Антиген К (кей) был открыт в 1946 г. Р. Кумбсом при исследовании с помощью антиглобулиновой пробы причины гемолитической болезни новорожденного у родильницы Kelleher. От сокращения ее фамилии был и назван антиген – Kell.

- Антиген К является сильным иммуногеном: иммунизацию могут вызвать даже одна трансфузия К-положительных эритроцитов, даже одна беременность или один аборт при несовместимости матери и плода по К-фактору.

- В 1949 г. у женщины по фамилии Cellano (в русской транскрипции Челлано) были обнаружены антитела, которые агглютинировали эритроциты у 99,8% обследованных лиц. Отсутствующий у нее антиген, который обусловил выработку защитных антител получил название по ее фамилии – Челлано и обозначение «k». Установлено, что антиген K и k являются генетической парой (имеют антитетичную связь). Лица, не содержащие антиген K всегда имеют антиген k и, наоборот, лица, не имеющие k всегда содержат K.
- Таким образом по системе Келл могут быть следующие комбинации антигенов: KK, Kk и kk.



Система Келл (Kell)



- Открытие и название системы связаны с именем беременной женщины миссис Kellacher, у которой в 1945 году были установлены специфические антитела. Ее сыворотка реагировала с эритроцитами мужа и ее новорожденного ребенка [92].
- В 1948 году у беременной женщины миссис Cellano были обнаружены антитела еще одной специфичности системы Келл – против антигена, получившего название по ее фамилии (в русской транскрипции Челлано)

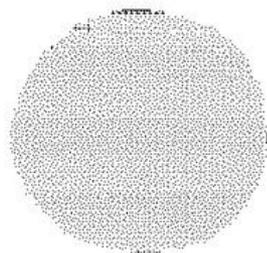


- В настоящее время антигены системы Kell (известны 24 антигена) разделяются на 4 группы. Для репродукции человека наиболее актуальной является 1-я группа, включающая 11 антигенов, объединенных в 5 подгрупп. Трансфузионно значимыми являются только два антигена системы Kell: самый иммуногенный – K (произносится «кей» и по международной классификации обозначается K1 или KEL 1), который может явиться причиной аллосенсибилизации как во время беременности, так и при трансфузиях крови, а также менее агрессивная его аллель – k (Челлано, по международной классификации – K2 или KEL 2).

- Фенотип по системе Келл оформляется по результатам иммуногематологического исследования: при отсутствии агглютинации с сывороткой анти-К записывается как К–, а при наличии агглютинации – К+; при исследовании двумя сыворотками (анти-К и анти-k) результаты записываются по факту полученной агглютинации: К–k+ (с частотой встречаемости 91,8%), К+k+ (7,84%) или К+ k– (0,15%).



Положительный



Отрицательный

ABO (*перекрестный метод*)

Rh / K (*D, C, E, e, c, K*)

донор

реципиент

Скрининг антиэритроцитарных
аллоантител

Индивидуальный подбор

На мембранах лейкоцитов помимо антигенов системы ABO, MN, Левис содержатся антигены гистосовместимости HLA (от Human Leucocyte Antigens), представленные более чем 150 антигенами, а также антигены нескольких других генетических систем — NA, NB, NC, ND, NE и др. Лейкоцитарные антигены находятся в растворимой форме в плазме крови, присутствуют на поверхности других клеток крови.

Антигены гистосовместимости HLA представлены и на поверхности тромбоцитов. Несовместимость по антигенам HLA комплекса у донора и реципиента при переливании цельной крови и ее компонентов (лейкоцитарной или тромбоцитарной массы) приводит к иммунизации реципиента. Образовавшиеся в организме реципиента антитела против антигенов системы HLA или антигенов лейкоцитов NA-NE при повторном переливании крови реципиенту вызывают различные осложнения (лихорадку, возникающую в результате освобождения пирогенных веществ из поврежденных антителами лейкоцитов; антитела вызывают разрушение донорских лейкоцитов и тромбоцитов и др.).

Показания для индивидуального подбора

- Отягощенный трансфузионный или акушерский анамнез (реакции и осложнения на прежние гемотрансфузии, беременности, закончившиеся рождением новорожденных с желтухой или другими признаками ГБН)
- Больные, имеющие антиэритроцитарные аллоантитела в сыворотке
- Положительный или сомнительный результат индивидуальных проб на совместимость
- Больные, которым предполагается проведение многократных трансфузий (например, онкогематологические)
- Новорожденные с признаками гемолитической болезни

Несколько уровней автоматизации:

Оборудование

– Центрифуга для 6, 12 или 24 гелевых карт



– Инкубатор для гелевых карт с контролируемой температурой 37°C (подходит любой термостат, поддерживающий такую температуру)



SWING



Автоматизированная система откапывания
для иммуногематологических исследований

SAXO прибор для центрифугирования гелевых карт, считывания и хранения результатов



Полностью автоматизированная система для иммуногематологических исследований IH-1000



Принципиально новая логика IH-1000 делает систему значительно более гибкой и

производительной:

Производительность: 720 тестов в час
(Определение групп крови по системе ABO и Rh/Kell

фенотипа: 60 исслед-й в час.)

- 2 независимые дозирующие иглы
- Независимый транспортный модуль для

распределения карт

- 3 центрифуги
- 2 встроенных компьютера

□ Элементы



**А теперь
в придачу
желаем
Вам удачу!!!**

**ГОТОВ
ОТВЕТИТЬ
НА ВАШИ
ВОПРОСЫ!**

