



СПРАВОЧНИК ЗАВЕДУЮЩЕГО КДЛ

№ 10 • октябрь
2013

Организация и управление работой КДЛ

Оснащение современной лаборатории

Новые методики исследований

Санэпидрежим в лаборатории

Нормативные документы

Охрана труда в КДЛ



Полибренный тест: эффективный диагностический тест для выявления аллоиммунных антител к групповым антигенам эритроцитов человека и определения групповой совместимости

Н.И. Оловникова

канд. биол. наук, зав. производственным отделом,

Г.Ю. Митерев

канд. мед. наук, директор ООО «Гематолог»,

А.Г. Стремоухова

врач-лаборант,

Л.Л. Головкина

д-р мед. наук, зав. лабораторией

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России

Наличие нерегулярных аллоиммунных антител (АИА) к групповым антигенам эритроцитов в сыворотке крови у реципиентов нередко является осложняющим фактором при подборе препаратов донорских эритроцитов перед трансфузией. В первую очередь это касается таких групповых систем эритроцитов, как Резус, Келл, Kidd, MNS, Diego, и ряда других, антигены которых в настоящее время называют «клинически значимыми» [2, 11]. АИА к этим антигенам могут быть причиной серьезных трансфузионных осложнений, если больному переливать эритроциты, несущие групповые антигены, к которым направлены АИА его сыворотки. Это заставляет принимать серьезные диагностические меры для выявления АИА у реципиентов, а также проводить заключительную оценку групповой совместимости крови донора и реципиента непосредственно перед трансфузией. В нашей стране наиболее распространенной стратегией является подбор крови по фенотипу и проведение пробы на индивидуальную совместимость с обязательным выявлением АИА.

Определение в сыворотке реципиента (больного) АИА, реагирующих непосредственно с донорскими эритроцитами, предназначенными для трансфузии, может быть осуществлено следующими способами:

- ~ применение антиглобулинового теста (реакции Кумбса, АГТ) или его модификаций – микроколоночного АГТ с использованием гелевой сре-

ды (гель-АГТ) или стеклянных микробусин (Ortho Clinical Diagnostics), а также с использованием магнитизированных эритроцитов (Diagast). АГТ в «классическом» варианте является чувствительным, но длительным тестом, а его современные модификации (например, гель-АГТ), обладающие еще большей чувствительностью, требуют специальной аппаратуры и являются весьма недешевыми. Очевидно, что АГТ можно проводить исключительно в условиях лаборатории;

- ~ применение конглотинационных методов с использованием желатина или полиглокина. Несмотря на свою простоту и скорость, эти методы обладают весьма существенным недостатком – низкой чувствительностью, что приводит к высокой частоте ложноотрицательных реакций [1].

Другой подход заключается в предварительном поиске в сыворотке крови реципиента АИА с использованием панели стандартных эритроцитов, несущих основные клинически значимые антигены, причем не только антигены «первой очереди», т. е. Резус и Келл, но также антигены систем Кидд, Даффи, MNS и др. Отсутствие АИА в сыворотке крови больного позволяет ограничить претрансфузионное тестирование проведением пробы на АВО-совместимость, без этапа выявления АИА. Скрининг и идентификация АИА с помощью наборов стандартных эритроцитов проводятся с использованием методов АГТ, гель-АГТ, с магнитизированными эритроцитами. Применение такой стратегии в нашей стране ограничено отсутствием отечественных панелей стандартных эритроцитов для скрининга антител необходимого качества (типированных по многим клинически значимым антигенам). Скрининг и идентификацию АИА с помощью указанных методов можно проводить только в лабораторных условиях.

Учитывая эти обстоятельства, компанией «Гематолог» был разработан и приспособлен для практического применения чувствительный и простой в исполнении тест для выявления АИА и проведения пробы на совместимость. В основе теста лежит известный в мировой практике метод усиления реакции агглютинации с помощью полибрена [5, 7]. Набор, созданный нами на основе этого теста, получил название ЭРИТРОТЕСТ™-Иммуно-Контроль (ручной полибренный тест-иммуноконтроль – РПТ-ИК) и был зарегистрирован в России как медицинское изделие в 2013 г. (регистрационное удостоверение № РЗН 2013/418). Определение АИА базируется на принципе последовательного использования двух реагентов – агглютинирующего и ресуспендирующего. Агглютинирующий раствор содержит полибрен (гексадиметрина бромид), который вызывает агглютинацию эритроцитов, что заменяет центрифугирование, а ресуспендирующий раствор диссоциирует неспецифические агглютинаты, не разрушая при этом агглютинаты, вызванные антителами. Тестирование с помощью нового набора осуществляется на плоскости и занимает около 5 мин. В настоящей работе приводятся результаты исследования эффективности набора РПТ-ИК в выявлении АИА различной антигенной специфичности в сравнении с широко используемыми методами: АГТ, гель-АГТ, желатиновым и полиглокиновым тестами.

Образцы донорских сывороток, содержащих АИА в различных титрах, были любезно предоставлены сотрудниками отделения переливания крови ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, иммуногематологического отделения ГБУЗ «Станция переливания крови Департамента здравоохранения г. Москвы», а также ООО «Гемостандарт» (г. Москва). В качестве образцов антисывороток к некоторым антигенам групп крови (Jk^a, Jk^b, Fy^b, s) были использованы препараты производства Bio-Rad Laboratories и Diagast S.A.S. В некоторых случаях антисыворотки были искусственно смоделированы добавлением моноклональных антител класса IgG (анти-D, анти-c, анти-k или анти-Fy^a) в донорскую сыворотку АВ (IV) группы.

Образцы донорских эритроцитов были любезно предоставлены сотрудниками отделения переливания крови ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. Фенотип эритроцитов по антигенам систем АВО, Rh (D, C, c, C^w, E, e), Kell (K, k) определяли в реакции прямой агглютинации на плоскости, по антигенам систем Kidd (Jk^a, Jk^b), MNS (S, s), Lewis (Le^a, Le^b) – в реакции прямой агглютинации в пробирках, по антигенам системы Duffy (Fy^a, Fy^b) – в гель-АГТ (ScanGel, Bio-Rad). Для фенотипирования были использованы реагенты производства компании «Гематолог».

Выявление АИА в иммунных сыворотках проводили с применением классического варианта метода АГТ [3], гель-АГТ с использованием гелевых карт ScanGel (Bio-Rad), желатинового теста с использованием 10% желатина (ОАО «Мосхимфармпрепараты»), а также полиглюкинового теста с использованием 33% раствора полиглюкина [4].

Набор РПТ-ИК использовали в соответствии с инструкцией по применению.

Одновременно методом гель-АГТ, с применением желатинового и полиглюкинового тестов, набором РПТ-ИК были протестированы 11 образцов сывороток с АИА, среди которых было 8 образцов с анти-D, 2 образца с анти-C и 2 образца с анти-K антителами. Тестирование проводили с эритроцитами соответствующего фенотипа. Как видно из табл. 1, во всех случаях тестирования с применением набора РПТ-ИК был получен положительный результат (в одном случае с анти-C АИА – слабоположительный); при применении гель-АГТ во всех случаях также отмечен положительный результат; желатинового теста – положительный результат получен только в 3/9 случаев (причем в двух из них – слабоположительный), полиглюкинового теста – также только 4/9 положительных результата (в двух из них – слабоположительный). Приведенные данные по анти-D, анти-C и анти-K АИА указывают на почти полное соответствие результатов гель-АГТ и набора РПТ-ИК, а также на низкую эффективность желатинового и полиглюкинового тестов.

Сравнение результатов выявления АИА набором РПТ-ИК и АГТ было проведено с использованием 25 препаратов сывороток с АИА (из них 8 образцов – с анти-D, 8 – с анти-DC, 1 – с анти-DCE, 2 – с анти-E, 2 – с анти-Келл и анти-E, 1 – с анти-Lea, 1 – с анти-s, 1 – с анти-Jka, 1 – с анти-Jkb и 1 – анти-Fyb), а также «смоделированных» сывороток с монокло-

Таблица 1

**Результаты выявления аллоиммунных антител
при использовании набора РПТ-ИК, гель-АГТ, полиглюкинового
и желатинового тестов**

Фенотип эритроцитов	Антигенная специфичность аллоиммунных антител	Результаты тестов			
		Иммуно-Контроль	гель-АГТ	желатиновый	полиглюкиновый
1	2	3	4	5	6
CCDeeK-	Анти-D	+*	+	-	-
ccDeeK-	Анти-D	+	+	+	+
CCDeeK-	Анти-D	+	+	+/-	+
CCDeeK-	Анти-D	+	+	нт**	-
CcDEeK-	Анти-D	+	+	-	-
ccDEeK-	Анти-D	+	+	-	-
CcDEeK-	Анти-D	+	+	-	-
CCDeeK-	Анти-C	+	+	+/-	+/-
CCDeeK-	Анти-C	+/-	+	-	-
CcDEeK+	Анти-K	+	+	нт	-
CcDEeK+	Анти-K	+	+	-	+/-

* Оценка результатов: отрицательный (-), слабоположительный (+/-), положительный (+).

** Не тестирувано.

нальными антителами класса IgG: 3 препаратов с анти-D (серии 89, 104 и 106, ООО «Гематолог»), с анти-с и анти-к (ООО «Гемостандарт), а также с анти-Fya (Diagast). Во всех случаях для тестирования специально подбирали эритроциты, содержащие соответствующий антиген, что выявляли предварительным фенотипированием (табл. 2). Как видно из представленных данных, во всех 8 случаях анти-D АИА отмечали полное совпадение результатов при использовании набора РПТ-ИК и АГТ. Для оценки выявления анти-C АИА в 2 случаях анти-DC препаратов (содержащих одновременно анти-D и анти-C АИА) для тестирования были использованы эритроциты фенотипа Ccdee; результаты в обоих случаях оказались положительными. Три препарата на основе моноклональных анти-D были протестированы с 8 образцами эритроцитов разных Rh-фенотипов и дали положительный результат.

Таблица 2

**Результаты выявления антител при использовании набора
РПТ-ИК, АГТ и гель-АГТ**

Фенотип эритроцитов	Антигенная специфичность аллоиммунных антител	Результаты тестов	
		Иммуно-Контроль	антиглобулиновый тест
1	2	3	4
CCDee	Анти-D	+*	+
CcDEe	Анти-D	+	+

1	2	3	4
CCDee	Анти-D	+	+
ccDEE	Анти-D	+	+
CcDEe	Анти-D	+	+
CcDee	Анти-D	+	+
ccDEE	Анти-D	+	+
ccDEe	Анти-D	+	+
Ccdee	Анти-DC	+	+
Ccdee	Анти-DC	+	+
CcDEe	Анти-DC	+	+
CcDEe	Анти-DC	+	+
CcDEe	Анти-DC	+	+
CcDEe	Анти-DC	+	+
CcDEe	Анти-DC	+	+
CcDee	Анти-DC	+	+
CcDEe	Анти-DCE	+	+
ccddeeK+	Анти-K+E	+	+
ccddeeK+	Анти-K+E	+	+
K+	Анти-K	+/-	+
ccDEE	Анти-D Моно (сер.89)	+	+
CCDee	Анти-D Моно (сер.89)	+	+
CcDee	Анти-D Моно (сер.89)	+	+
CcDEe	Анти-D Моно (сер.104)	+	+
CCDee	Анти-D Моно (сер.104)	+	+
CcDEe	Анти-D Моно (сер.106)	+	+
CCDee	Анти-D Моно (сер.106)	+	+
ccDEe	Анти-D Моно (сер.106)	+	+
CcDee	Анти-с Моно	+	+
ccDEE	Анти-E	+	+
ccddEe	Анти-E	+	+
ccddEe	Анти-E	+	+
CcDee Fya+	Анти-Fya Моно	+/-	+
CcDee Fya+	Анти-Fya Моно	+/-	+
CcDee Fya+	Анти-Fya Моно	+/-	+
CcDEe Fyb+	Анти-Fyb	+/-	+
CcDee Fyb+	Анти-Fyb	+/-	+
Jka- Jkb+	Анти-Jkb	+/-	—(+)**
Jka- Jkb+	Анти-Jkb	+/-	—(+)
Jka+ Jkb+	Анти-Jka	+/-	—(+)
Jka+ Jkb+	Анти-Jka	+/-	—(+)
Jka+ Jkb-	Анти-Jka	+/-	—(+)
Lea+ Leb-	Анти-Lea	+	+
Lea+ Leb-	Анти-Lea	+	+
S+ s+	Анти-s	+	—(+)
S- s+	Анти-s	+	—(+)

* Оценка результатов: отрицательный (-); слабоположительный (+/-); положительный (+).

** В скобках показан результат реакции при использовании гель-АГТ.

Чувствительность метода. Для выявления чувствительности определения АИА было проведено титрование сывороток, содержащих анти-D, анти-C и анти-K (Kell) АИА, при применении разных методов (набора РПТ-ИК, гель-АГТ, желатинового и полиглюкинового тестов). Результаты представлены в табл. 3 и 4. Как видно из таблиц, по анти-D АИА набор РПТ-ИК обладает чувствительностью, близкой к гель-АГТ, и значительно большей, чем чувствительность желатинового и полиглюкинового тестов. Несколько более низкая чувствительность набора РПТ-ИК выявлена в отношении анти-C и анти-K АИА, однако даже в этих случаях желатиновый и полиглюкиновый тесты существенно ему уступали.

Таблица 3

Определение порога чувствительности выявления аллоиммунных антител с помощью набора РПТ-ИК, гель-АГТ и АГТ

Антигенная специфичность аллоиммунных антител	Фенотип эритроцитов	Определяемый титр аллоиммунных антител в методах (кратность разведения сывороток)		
		Иммуно-Контроль	гель-АГТ	антиглобулиновый тест
Анти-D	CCDee	32	32	
Анти-D	ccDEE	256		128
Анти-D	CcDee	1024		1024
Анти-D Моно	CcDee	2048		512
Анти-C	CCDee	8	64	
Анти-C	CCDee	32		16
Анти-с Моно	ccDEe	512	128	32
Анти-K	CcDEeK+	4	32	
Анти-K	ccddeeK+	—*		2
Анти-E	ccDEE	128		128

* Отрицательный результат; незаполненные ячейки – не тестировано.

Таблица 4

Определение порога чувствительности выявления аллоиммунных антител с помощью набора РПТ-ИК, гель-АГТ, желатинового и полиглюкинового тестов

Антигенная специфичность аллоиммунных антител	Фенотип эритроцитов	Определяемый титр аллоиммунных антител в методах (кратность разведения сывороток):			
		Иммуно-Контроль	гель-АГТ	желатиновый	полиглюкиновый
Анти-D	CCDee	32	32	2	4
Анти-C	CCDee	8	64	4	2
Анти-K	CcDEeK+	4	32	—*	1**

* Отрицательный результат.

** Неразведенная сыворотка.

Специфичность метода. Для изучения специфичности метода выявления АИА с помощью набора РПТ-ИК, 9 образцов донорской сыворотки, не содержащих АИА, были протестированы с донорскими эритроцитами параллельно с помощью набора РПТ-ИК, при использовании гель-АГТ и АГТ. Ни в одном случае не было зафиксировано положительных результатов. Также образцы анти-D, анти-K, анти-E сывороток с АИА и образцы моноклональных анти-D и анти-c антител были протестированы с образцами эритроцитов, не содержащих соответствующих антигенов, при применении набора РПТ-ИК и АГТ. Ни в одном случае не было зафиксировано положительных результатов. Таким образом, тестирование АИА с помощью набора РПТ-ИК не дает ложноположительных реакций.

Представленные данные убедительно демонстрируют, что выявление АИА в сыворотке крови с помощью набора РПТ-ИК является эффективным, высокочувствительным и специфичным. Как показано, этим методом выявлены иммунные антитела к основным клинически значимым групповым антигенам систем Rh (D, C, c, E), Kell (K, k), Kidd (Jka, Jkb), MNS (s), Lewis (Lea), Duffy (Fya, Fyb), причем чувствительность набора РПТ-ИК для большинства протестированных образцов оказалась не ниже чувствительности АГТ, а для анти-D АИА – не ниже чувствительности гель-АГТ, что соответствует мировому опыту использования полибреннового теста [9]. Только в случае анти-Duffy АИА тест оказался хотя и положительным, но проявлялся в виде мелкозернистой агглютинации. Наши результаты вполне сопоставимы с выводами других авторов, изучавших выявление АИА с помощью полибреннового теста на значительном количестве образцов сывороток с АИА против групповых антигенов разных систем [5, 7]. Высокие эффективность и чувствительность полибреннового теста сделали в последнее время возможным его широкое применение в практической иммуногематологии в ряде стран Западной Европы [6], Тихоокеанского региона [10] и Юго-Восточной Азии [8].

Взяв за основу принцип реакции с полибренном, компания «Гематолог» разработала тест-систему, куда включены все необходимые для ее проведения реагенты, а также отрицательный и положительный контроли. Положительный контроль содержит антитела, реагирующие со всеми эритроцитами. Этот компонент позволяет не только контролировать работоспособность набора, но и указывает на его высокую чувствительность, поскольку титр антител не высок. Необходимо, однако, отметить, что с помощью набора РПТ-ИК выявляется лишь факт наличия в тестируемой сыворотке АИА, но не их антигенная специфичность. Положительный результат теста приводит к необходимости специального подбора донорских эритроцитов для реципиента.

С помощью набора РПТ-ИК определяется не только совместимость сыворотки реципиента и донорских эритроцитов по АИА, но и контролируется совместимость по системе АВО: в случае АВО-несовместимости на это указывает прямая реакция агглютинации на начальном этапе постановки теста (см. приложение – Инструкция по применению). Таким образом, тестирование с помощью набора РПТ-ИК является эффектив-

ным «фильтром», способным предотвратить любую групповую несовместимость, прямую – по изоагглютининам и другим полным групповым антителам, и иммунную – по нерегулярным (неполным) иммунным антителам.

Хотя тестирование с помощью набора РПТ-ИК является быстрым, простым, удобным на практике и почти не требует дополнительного оборудования (необходима лишь лабораторная центрифуга для предварительной отмывки эритроцитов), этот тест может быть использован только в условиях стационарной лаборатории, но не в форме «point of care». Совершенствование теста будет, по-видимому, направлено на дальнейшее его упрощение и превращение в ручной вариант для использования в форме «point of care», с одной стороны, и адаптацию к автоматическим системам, с другой стороны. Последняя тенденция уже отчетливо наблюдается в мировой иммуногематологической практике [9].

Список использованной литературы

1. Донсков С.И., Васильев Н.И., Михайлова Н.М. и др. Сравнительная оценка методов выявления антиэритроцитарных антител. Сообщение III. Полиморфизм серологических реакций // Вестник Службы крови России. 2008. № 1. С. 5–9.
2. Донсков С.И., Мороков В.А. Группы крови человека. Руководство по иммуносерологии. М., 2011. С. 983–984.
3. Приказ Минздрава России от 25.11.2002 № 363 «Об утверждении инструкции по применению компонентов крови».
4. Иммуносерология (нормативные документы): сборник инструкций. М., 1998. Приложение 1. С. 18–21.
5. Fisher G.A. Use of the manual Polybrene test in the routine hospital laboratory // Transfusion. 1983. Vol. 23. P. 152–154.
6. Heim M.U., Alraun K., Hansen E. et al. Antibody detection in emergency transfusions. A comparison of 3 different methods // Anaesthetist. 1988. Vol. 37. P. 680–683.
7. Lalezari P., Jiang A.F. The manual polybrene test: a simple and rapid procedure for detection of red cell antibodies // Transfusion. 1980. Vol. 20. P. 206–211.
8. Lin M. Compatibility testing without a centrifuge: the slide Polybrene method // Transfusion. 2004. Vol. 44. P. 410–413.
9. Lin M., Chan Y.-S., Chang F.-J. et al. Microplate polybrene method for blood bank automation // На сайте: www.mmh.org.tw/taitam/mmhbbr/LIN.pdf
10. Lown J.A., Johnson W., Ivey J.G. Eighteen months' experience with a manual polybrene crossmatch in a large hospital transfusion laboratory // Vox Sang. 1988. Vol. 55. P. 229–232.
11. Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects / eds. Hillyer C.D. et al. 2009. Elsevier. P. 103–110.

