

Федеральное медико-биологическое агентство  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и  
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»  
(ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)

**АЛГОРИТМЫ  
ИНДИВИДУАЛЬНОГО  
ПОДБОРА ГЕМОКОМПОНЕНТОВ  
И ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ  
АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ  
И АНТИЭРИТРОЦИТАРНЫХ АНТИТЕЛ  
В СЛОЖНО ДИАГНОСТИРУЕМЫХ СЛУЧАЯХ**

*Методическое пособие*

*МП ФМБА России  
1-2017*

Санкт-Петербург  
2018

**Алгоритмы индивидуального подбора гемокомпонентов и проведения исследования антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител в сложно диагностируемых случаях.** Методическое пособие, 2018. — СПб., Агентство «ВиТ-принт», 2018. — 24 с.

Методическое пособие посвящено вопросам проведения исследований антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител в сложно диагностируемых случаях, а также при затруднениях выявления антител у доноров и реципиентов при наличии сопутствующих аутоантител. Представлены схемы определения резус-принадлежности, а также выявления аллоантител при наличии IgM антител и положительного аутоконтроля, обусловленного присутствием аутоантител.

*Предназначены для врачей  
клинической лабораторной диагностики  
и трансфузиологов медицинских учреждений.*

**Авторы:** Н. В. Минеева, И. И. Кробинец, Н. Н. Бодрова,  
Е. А. Сысоева, С. В. Гавровская, И. В. Поединенко,  
И. О. Богданова, А. В. Четкин, С. С. Бессмельцев

**Рецензенты:** Доктор медицинских наук, профессор Б. Б. Баховадинов  
Доктор медицинских наук А. А. Ганапиев

**Организация-разработчик:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства». 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16.

*Утверждены заместителем руководителя  
Федерального медико-биологического агентства  
М. В. Забелиным 16.01.2018, МП ФМБА России 1-2017*

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из причин посттрансфузионных осложнений гемолитического типа являются ошибки при определении группы крови, резус-принадлежности, а также при проведении скрининга и идентификации аллоантител. Ошибки при иммуногематологических исследованиях могут быть обусловлены как техническими погрешностями и недостаточно высоким качеством применяемых реактивов, так и индивидуальными особенностями исследуемых образцов крови [1]. Ослабление выраженности антигенов на эритроцитах больных затрудняет определение группы крови и резус-принадлежности, а присутствие перекрестно реагирующих аутоантител искажает результаты исследования специфических аллоантител [2]. Низкая активность аллоантител в сыворотке также может быть одной из причин получения ложноотрицательного результата при скрининге аллоантител и проведении проб на совместимость крови донора и реципиента [3-5].

В данном пособии представлены алгоритмы исследований сложно диагностируемых случаев типирования антигенов эритроцитов системы ABO и Rh, выявления аллоантител, имеющих клиническое значение, а также подбора эритроцитсодержащих гемокомпонентов доноров для трансфузий реципиентам.

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий документ может быть применен:

1. Для типирования антигенов эритроцитов доноров и реципиентов в сложных случаях при определении группы крови по системам ABO/Rh.
2. Для проведения скрининга аллоантител к антигенам эритроцитов и их идентификации в сложных случаях при наличии у реципиентов аутоантител.
3. Для проведения проб на совместимость по антигенам эритроцитов пациентам, нуждающимся в гемотрансфузионной терапии, с целью подбора совместимых пар донор-реципиент и обеспечения иммунологической безопасности трансфузий.

**Область применения:** клиническая лабораторная диагностика, трансфузиология.

**Уровень внедрения:** медицинские учреждения.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- ДТТ** — дитиотреитол  
**НАГТ** — непрямой антиглобулиновый тест  
**ПАГТ** — прямой антиглобулиновый тест  
**Ig** — иммуноглобулины  
**PBS** — phosphate buffered saline (фосфатно буферный раствор)

## **1. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ПОДБОРА ЭРИТРОЦИТОСодЕРЖАЩИХ ГЕМОКОМПОНЕНТОВ**

Подбор совместимых пар донор-реципиент при трансфузиях эритроцитосодержащих компонентов крови включает в себя комплекс исследований:

1. Определение группы крови по системе АВО и резус принадлежности по наличию или отсутствию антигена D.
2. Исследование антигенов эритроцитов (фенотипирование) по системе Rh (C, E, c, e) и Kell (K).
3. Скрининг антиэритроцитарных аллоантител. Определение специфичности аллоантител при условии положительного результата скрининга.
4. Проведение проб на совместимость между эритроцитами донора и сывороткой (плазмой) реципиента.

Подбор совместимых пар донор-реципиент может быть затруднен на любом этапе исследований, что может быть обусловлено индивидуальными особенностями реципиента.

## **2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУППЫ КРОВИ ПО СИСТЕМЕ АВО В СЛОЖНЫХ СЛУЧАЯХ**

При исследовании групповой принадлежности крови у реципиентов с гематологическими, онкологическими или инфекционными заболеваниями могут наблюдаться отклонения от обычной картины агглютинации. Это выражается в отсутствии специфической или наличии неспецифической агглютинации и, как следствие, в несовпадении результатов исследований с моноклональными антителами (изогемагглютинирующими сыворотками) и тест-эритроцитами. Порядок проведения исследования групповой принадлежности крови, методические приемы, а также причины расхождений результатов исследований анти-А, анти-В антител в сыворотке с тест-эритроцитами и антигенов А и В эритроцитов с моноклональными антителами (изогемагглютинирующими сыворотками) приведены ниже.

1. В случае расхождения результатов перекрестного определения по причине выявления экстраагглютинина анти-А1, а также при ослаблении силы реакции агглютинации при выявлении антиге-

на А, целесообразно использовать дополнительно реактивы другого производителя и реактив анти-А<sub>1</sub>, что позволит исключить ошибочное заключение о групповой принадлежности исследуемого образца.

2. При невыявлении антител анти-А и анти-В все исследования следует проводить при +4°С (время экспозиции реагентов и исследуемого образца крови — 10–30 мин). В случае повторного получения нечеткого результата на плоскости при +4°С, исследование проводят в пробирках:
  - в две пробирки поместить исследуемый образец сыворотки и добавить в одну пробирку тест-эритроциты А, в другую тест-эритроциты В. Взболтать содержимое пробирок, инкубировать 10 мин при +4°С, затем центрифугировать (1000 g) в течение 1 мин и оценить результат визуально после встряхивания пробирки или под микроскопом при необходимости.
3. При наличии агглютинации со всеми образцами тест-эритроцитов (А, В, О) можно предположить наличие холодových антител.
  - Для устранения панагглютинации сыворотку необходимо инкубировать при +37°С в течение 30 мин на водяной бане (в термостате), а эритроциты пациента отмыть физиологическим раствором, прогретым до +37°С. Повторить определение группы крови перекрестным методом еще раз. В случае не устранения панагглютинации, анализ следует повторить на свежесвятом образце крови, заготовленном в теплую пробирку. Образец доставить в лабораторию, не допуская охлаждения, и все исследования проводить с предварительно согретыми до +37°С реактивами.
  - При повторном получении агглютинации тест-эритроцитов группы О сывороткой пациента можно предположить наличие аллоантител класса IgM (анти-Р, анти-М, анти-Н, анти-И). Специфичность антител устанавливается при комнатной температуре с использованием расширенной панели тест-эритроцитов.

Отрицательный результат исследования сыворотки реципиента со стандартными эритроцитами группы О свидетельствует об отсутствии аллоантител и правильном определении группы крови.

### 3. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕНА D СИСТЕМЫ RH В СЛОЖНЫХ СЛУЧАЯХ

Антиген D в большинстве случаев хорошо выявляется в любом методе. Однако у некоторых людей экспрессия антигена D снижена, и эритроциты не агглютинируются реагентом анти-D IgM. Наиболее надежным серологическим методом определения антигена D является непрямой антиглобулиновый тест (НАГТ), предполагающий инкубацию исследуемых эритроцитов с реагентом анти-D IgG. Алгоритм исследования представлен на *рисунке 1*.



Рисунок 1. Алгоритм исследования резус-принадлежности крови в сложных случаях (с реагентом анти-D класса IgM и/или IgG)

\* *Исследование антигена D проводят любой технологией с применением реактива анти-IgG (реактив IgG+C3d не применяют из-за возможности возникновения неспецифической реакции).*

\*\* *В качестве контроля используют результат ПАГТ*

\*\*\* *Целесообразно использовать НАГТ в общепринятой постановке.*

При расхождении результатов определения антигена D в различных учреждениях исследование необходимо провести со специальным реактивом «анти-D слабый», выявляющим слабые варианты антигена D. Исследования антигена D проводят с использованием НАГТ с анти-IgG. Одновременно ставят контроль прямым антиглобулиновым тестом (ПАГТ) на наличие аутоантител на эритроцитах: исследуемые эритроциты + анти-IgG реактив. При использовании гелевых методик целесообразно эритроциты предварительно отмыть.

Результаты исследования оцениваются следующим образом:

- Наличие агглютинации в исследуемом образце с реагентом анти-D IgG независимо от ее характера и силы реакции и ее отсутствие в контрольной пробе (отрицательный контроль на аутоантитела) оценивается как положительный результат. Rh принадлежность — положительная.
- Отсутствие агглютинации в исследуемой и контрольной пробах свидетельствует об отсутствии экспрессии антигена D, Rh принадлежность образца расценивается как отрицательная.
- Наличие агглютинации в исследуемой и контрольной пробах свидетельствует о присутствии аутоантител на эритроцитах. Сделать достоверное заключение о Rh принадлежности на этом этапе невозможно. Для дальнейшего определения антигена D образца целесообразно проведение генотипирования.

#### 4. СКРИНИНГ АНТИЭРИТРОЦИТАРНЫХ АЛЛОАНТИТЕЛ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АЛЛОАНТИТЕЛ

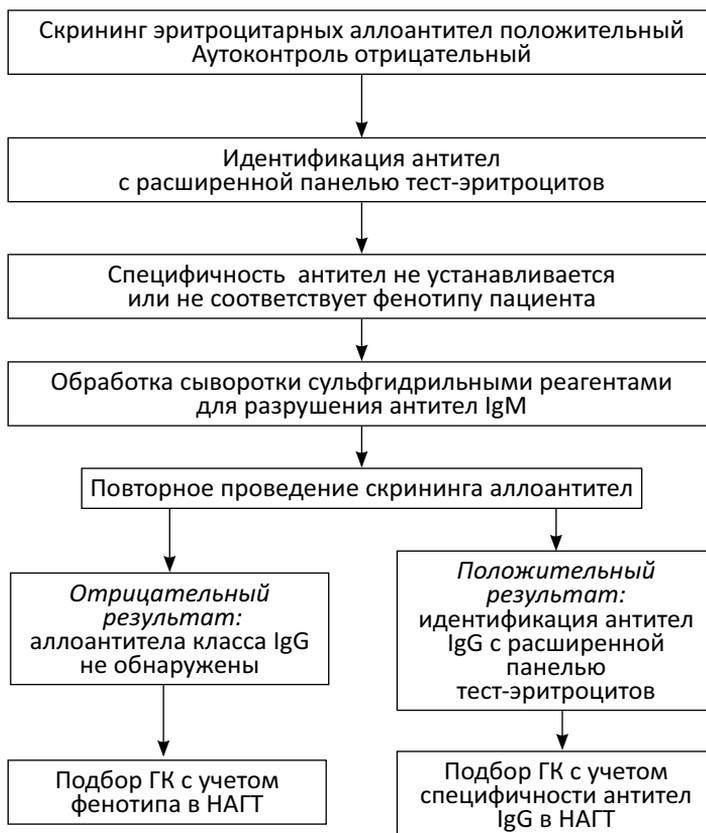
В настоящее время в лабораториях применяют следующие методы: непрямой антиглобулиновый тест, либо его модификации аналогичной чувствительности, реакцию конглотинации с 10% желатином и реакцию конглотинации с 33% полиглюкином. Следует отметить, что низкая чувствительность реакции конглотинации с полиглюкином или желатином значительно снижает достоверность этих исследований.

Присутствие в сыворотке аллоантител, аутоантител или перекрестно-реагирующих антител, наличие в анамнезе гемотрансфузий, проведенных в предыдущие 3 месяца, может приводить к положительным результатам скрининга антител и проб на совместимость и, как следствие, к неправильной идентификации антител. Алгоритм определения антиэритроцитарных аллоантител представлен на *рисунке 2*.



**Рисунок 2.** Алгоритм определения антиэритроцитарных аллоантител в сложных случаях.

\* **Аутоконтроль:** эритроциты пациента+ сыворотка пациента.



*Рисунок 3. Алгоритм определения эритроцитарных аллоантител при положительном результате скрининга и отрицательном аутоконтроле.*

Алгоритмы определения эритроцитарных аллоантител при положительном и отрицательном результатах аутоконтроля представлены на рисунках 3 и 4.

Для доказательства правильности установления специфичности антител целесообразно провести типирование антигенов реципиента (антиген к выявленным антителам должен отсутствовать).

Если специфичность антител установить не удается, или у пациента присутствует антиген, к которому выявлены антитела (при отсутствии аутоантител — ПАГТ отрицательный), можно предположить наличие у больного антител к бактериальным антигенам, сходным по структуре с антигенами эритроцитов, или антител после проведения профилактических прививок (например, против гриппа).



**Рисунок 4.** Идентификация аллоантител в присутствии аутоантител.

\* Больным, имеющим аутоантитела не только в сыворотке, но и на эритроцитах (ПАГТ положительный), аутоадсорбция проводится после элюции аутоантител с эритроцитов.

При отсутствии агглютинации при скрининге антител (отрицательный результат) — делается заключение что аллоантитела IgG не обнаружены.

Во всех сложных случаях выявления антител к антигенам эритроцитов постановка аутоконтроля (сыворотка пациента + собственные

эритроциты) является обязательной! Положительный аутоконтроль свидетельствует о том, что у пациента присутствуют аутоантитела. Отрицательный аутоконтроль подтверждает отсутствие аутоантител в исследуемом образце сыворотки.

- Наличие агглютинации с одной, двумя или тремя линиями панели тест-эритроцитов при отрицательном аутоконтроле свидетельствует о присутствии в сыворотке аллоантител. Специфичность антител необходимо установить с расширенной панелью тест-эритроцитов. Если специфичность антител представлена антителами к антигену, присутствующему на эритроцитах пациента (например, анти-D антител у D положительного больного), вероятно выявленные антитела являются антибактериальными и принадлежат к иммуноглобулинам класса M и не имеют клинического значения. Для определения класса выявленных антител исследуемую сыворотку необходимо инкубировать с сульфидрильным реагентом (5% раствор унитиола) (*Приложение А*). Для лучшего результата сыворотку лучше оставить на сутки в термостате (+37°C), после чего повторить скрининг и идентификацию антител. Подбор для таких пациентов необходимо проводить в НАГТ с учетом специфичности выявленных аллоантител.
- Наличие агглютинации со всеми образцами тест-эритроцитов при положительном аутоконтроле может свидетельствовать о присутствии антител IgM и IgG. Если такие антитела являются IgM, то они часто не имеют клинического значения. Для разрушения IgM антител исследуемую сыворотку также обрабатывают унитиолом, после чего повторяют скрининг антител и аутоконтроль. Если аутоконтроль отрицательный, а скрининг антител реципиента с тест-эритроцитами положительный, необходимо определить специфичность антител с расширенной панелью тест-эритроцитов. Подбор эритроцитов доноров для таких пациентов проводят в НАГТ с учетом специфичности выявленных аллоантител.
- Наличие агглютинации тест-эритроцитов с исследуемой сывороткой при положительном аутоконтроле может свидетельствовать и о наличии в сыворотке аутоантител, принадлежащих к IgG. Аутоантитела могут маскировать одновременно присутствующие аллоантитела.

Аутоантитела могут выработаться и к лекарственным препаратам.

**Для удаления аутоантител используют:**

**1. Аутоадсорбцию (Приложение Б)**

Адсорбция аутоантител из сыворотки собственными эритроцитами больного наиболее оптимальна, так как не приводит к удалению аллоантител. Перед проведением аутоадсорбции необходимо убедиться в отсутствии аутоантител на эритроцитах больного для чего проводят ПАГТ. При положительном ПАГТ, сначала проводят тепловую элюцию аутоантител с эритроцитов больного, и только после этого используют эритроциты для сорбции аутоантител из собственной сыворотки. Собственные эритроциты не сорбируют аллоантитела, поэтому сыворотка может использоваться для исследования аллоантител.

У пациентов с анемией аутоадсорбция используется редко из-за невозможности заготовить необходимый объем эритроцитов.

После элюции обязательна постановка аутоконтроля. Если аутоконтроль положительный и аутоантитела не сорбировались полностью, то при проведении пробы на индивидуальную совместимость в НАГТ сравнивают силу реакции в микропробирке «сыворотка реципиента + эритроциты донора» с силой реакции в аутоконтроле. Если характер агглютинации в обеих пробирках одинаковый на 1+, то, вероятно, что аллоантитела отсутствуют и донорские эритроциты совместимы с сывороткой реципиента. Если агглютинация в пробирке «сыворотка реципиента + эритроциты донора» более выражена (от 2+ до 4+) чем в аутоконтроле — это свидетельствует о присутствии у реципиента аллоантител и несовместимости пробы.

Данную методику целесообразно применять для подбора совместимого донора больным онкологическими и гематологическими заболеваниями (по жизненным показаниям) и нельзя использовать для беременных женщин и детей.

**2. Аллоадсорбцию аутоантител из сыворотки больного эритроцитами доноров**

Данный метод предполагает проведение расширенного фенотипирования донора и реципиента. Фенотипы донора и реципиента должны быть идентичны по антигенам систем ABO, Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS.

При проведении аллоадсорбции существует вероятность адсорбции из сыворотки больного аллоантител к антигенам высокой частоты встречаемости.

**3. Разведение аутоантител в сыворотке**

Данный метод является ненадежным из-за разведения не только аутоантител, но и аллоантител. Аллоантитела в сыворотке могут присут-

ствовать в низком титре, и высока вероятность их разведения до уровня невыявляемости.

#### **4. Обработку тест-эритроцитов дитиотреитолом (ДТТ) (Приложение В)**

Лекарственные препараты на основе моноклональных антител (например, анти-CD38) могут связываться с рецепторами на эритроцитах, вызывая панреактивность *in vitro*. Плазма пациентов, которым проводили лечение с помощью таких лекарственных препаратов, может давать положительные реакции агглютинации с тест-эритроцитами при скрининге и идентификации аллоантител, а также с эритроцитами доноров в пробах на совместимость перед гемотрансфузией. Положительные результаты в НАГТ могут быть получены в течение 6 месяцев после прекращения лечения данными препаратами. Устранить подобное влияние позволяет обработка дитиотреитолом тест-эритроцитов, используемых для скрининга и идентификации антител, а также эритроцитов доноров.

Препараты анти-CD38 не влияют на результаты типирования ABO/RhD принадлежности реактивами, приготовленными на основе IgM антител [7].

#### **Больным до терапии препаратами моноклональных антител анти-CD38 рекомендуется определить любыми методами и реактивами:**

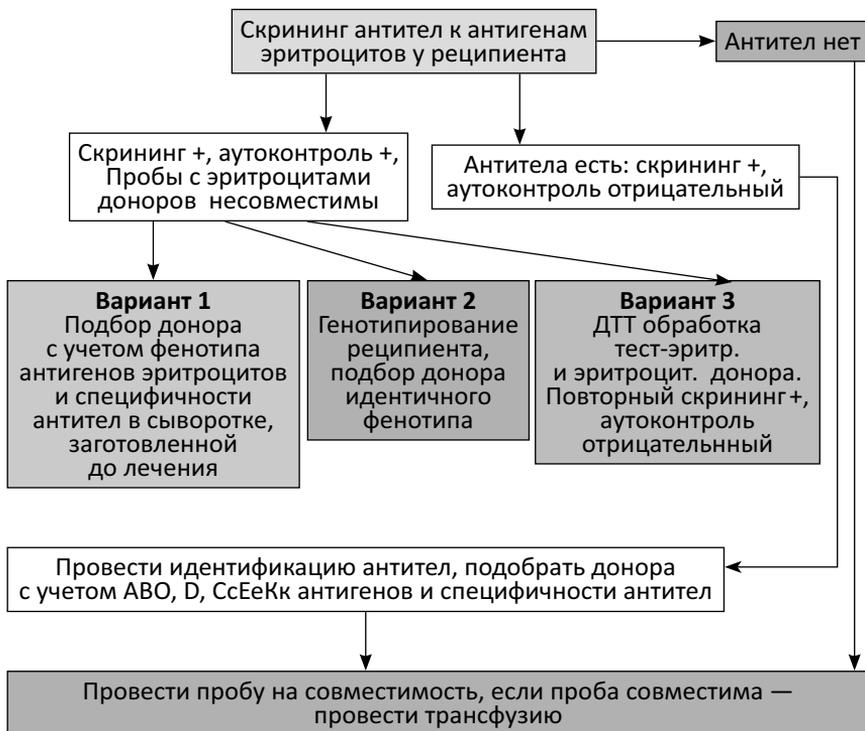
- ABO, резус-принадлежность
- фенотип антигенов CcEeK (при выявлении антигена K, исследовать наличие антигена k (пациент с фенотипом KK может выработать анти-k антитела)
- скрининг антиэритроцитарных антител. При выявлении аллоантител, установить их специфичность, заготовить образцы сыворотки, заморозить и хранить для постановки проб на совместимость при необходимости проведения гемотрансфузионной терапии.

#### **После введения препаратов анти-CD38 при необходимости трансфузий исследовать:**

- ABO, резус-принадлежность, фенотип антигенов эритроцитов CcEeK реактивами, содержащими моноклональные антитела IgM.
- Провести скрининг антител к антигенам эритроцитов и поставить аутоконтроль в соответствии со схемой, приведенной на *рисунке 5*.

В случае невозможности установления специфичности аллоантител у пациентов с аутоантителами, трансфузии осуществляются с учетом антигенов эритроцитов по результатам расширенного фенотипирования или генотипирования.

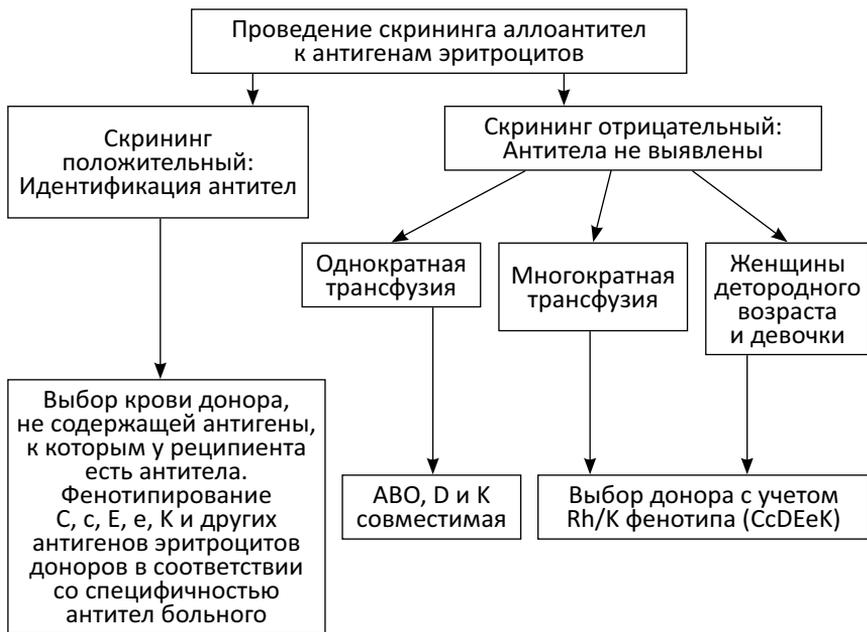
- При первой трансфузии подбор донора можно провести с сывороткой, заготовленной до лечения.



*Рисунок 5. Варианты подбора совместимого донора для реципиента, получающего терапию препаратами анти-CD38.*

## 5. Индивидуальный подбор крови доноров для реципиентов

Индивидуальный подбор эритроцитов проводят с учетом ABO и резус-принадлежности донора и реципиента, наличия и специфичности антител реципиента, фенотипа антигенов эритроцитов, а также половой принадлежности реципиента и количества предполагаемых трансфузий [8, 9]. Алгоритм подбора донора в зависимости от результатов скрининга антител приведен на *рисунке 6*.



*Рисунок 6. Алгоритм подбора эритроцитсодержащих гемокомпонентов для трансфузий с учетом результатов скрининга антител.*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На результаты предтрансфузионных иммуногематологических исследований влияет большое количество факторов, таких как индивидуальные особенности реципиентов, организация преаналитического этапа, выбор метода исследования, используемые для анализа реактивы, интерпретация полученных данных и порядок их документирования. Подбор эритроцитсодержащих гемокомпонентов реципиентам представляет собой комплекс исследований, и трудности могут возникнуть на любом этапе исследования. Чаще всего проблемы возникают при проведении скрининга и идентификации аллоантител у пациентов в сложно диагностируемых случаях при наличии аутоантител.

Предложенные в данном пособии методы и алгоритмы исследований позволят определить группу крови по системе ABO и Rh в сложных случаях, дифференцировать перекрестно реагирующие антитела, не имеющие клинического значения, и ауто- и/или аллоантитела, имеющие клиническое значение, а также идентифицировать специфичность аллоантител у пациентов с аутоантителами. Использование предлагаемых алгоритмов позволит осуществить подбор реципиентам совместимых эритроцитов доноров.

Применение разработанных методических приемов в медицинских учреждениях будет способствовать повышению безопасности и эффективности гемотрансфузионной терапии за счет предупреждения посттрансфузионных осложнений гемолитического типа.

## Приложение А

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАССА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ 5 % РАСТВОРА УНИТИОЛА

Определение антител класса IgG проводится при иммунологическом обследовании доноров, пациентов стационара, беременных, новорожденных с признаками гемолитической болезни, а также при расследовании причин посттрансфузионных осложнений гемолитического типа.

Выявление IgG антител может быть затруднено из-за одновременного присутствия специфических и/или неспецифических антител класса IgM. В данной методике обработка сыворотки, содержащей антитела класса IgM, 5 % раствором унитиола устраняет как агглютинирующую, так и комплементсвязывающую активность молекул IgM за счет разрушения дисульфидных связей, что позволяет выявить наличие у пациента антител класса IgG.

Метод пригоден для дифференциальной диагностики IgG и IgM антител к антигенам эритроцитов любой специфичности в сыворотке (плазме) крови человека.

Процедура проведения исследования

1. В сухой чистой пробирке смешать равные объемы исследуемой сыворотки (плазмы) и 5 % раствора унитиола — опыт.
2. Во второй пробирке смешать равные объемы моноклональных антител анти-D супер IgM и 5 % раствора унитиола — контроль разрушения антител унитиолом.
3. Все пробы инкубировать в термостате в течение 1 часа при +37°C. Для лучшего результата сыворотку лучше оставить на сутки в термостате (+37°C).
4. После обработки 5 % раствором унитиола исследуемые сыворотки (опыт) исследуют в НАГТ, а контроль — моноклональные антитела анти-D супер IgM исследуют на плоскости без подогрева или в гелевой карте NaCl с эритроцитами D+ группы крови O.

Интерпретация результатов

1. Результат в контрольной пробе должен быть всегда отрицательным.
2. Сыворотки, сохранившие способность агглютинировать тест-эритроциты в НАГТ после инкубации с раствором унитиола, содержат антитела класса IgG — положительный результат.
3. Сыворотки, утратившие способность агглютинировать тест-эритроциты в НАГТ после инкубации с раствором унитиола, не содержат антитела класса IgG — отрицательный результат.

## Приложение Б

### ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ АУТОАДСОРБЦИИ

Тепловые аутоантитела в сыворотке пациента могут маскировать присутствие клинически значимых аллоантител. Проведение аутоадсорбции позволяет удалить аутоантитела из сыворотки и определить наличие аллоантител. При наличии аутоантител на эритроцитах больных (положительный прямой антиглобулиновый тест) аутоадсорбцию проводят после удаления аутоантител с мембраны эритроцитов элюцией. Посредством этого открываются антигенные детерминанты, которые могут связывать аутоантитела, присутствующие в сыворотке.

Все методики элюции основаны на разрыве нековалентных связей комплексов «антиген-антитело» на поверхности эритроцитов. Данный эффект может быть достигнут путем нагревания, замораживания-оттаивания, использования детергентов или органических растворителей. В сочетании с методом адсорбции элюция может использоваться для дифференциации ауто- и аллоантител IgG, направленных против АГ эритроцитов. В лабораторной практике чаще всего используется метод тепловой элюции.

#### **Методика проведения тепловой элюции**

Для элюции необходимо 15–20 мл крови реципиента, заготовленной на растворе ЭДТА.

#### **Процедура элюции:**

1. Отмыть исследуемые эритроциты 3–4 раза стерильным раствором NaCl 0,9%, центрифугирование проводить в течение 3 мин.
2. Смешать равные объемы эритроцитов и физраствора.
3. Инкубировать пробирки со смесью при 56°C в течение 10 мин.
4. Центрифугировать пробирки при 3000g в течение 2 мин.
5. Быстро перенести элюат в чистую пробирку.
6. Провести контрольный ПАГТ с эритроцитами после элюции.
7. В элюате при необходимости определить специфичность антител.
8. С освобожденными от антител эритроцитами провести аутоадсорбцию антител из сыворотки.

**Примечание.** В некоторых случаях метод тепловой элюции не обеспечивает снятие аутоантител с эритроцитов. Положительный результат ПАГТ после элюции является противопоказанием к использованию метода адсорбции.

### **Метод проведения аутоадсорбции**

Для аутоадсорбции необходимо не менее 5 мл сыворотки больного и 6–8 мл его эритроцитов, освобожденных от аутоантител методом элюции.

Процедура аутоадсорбции с эритроцитами, освобожденными от аутоантител:

1. В две чистые пробирки добавить равные объемы (например, 2 мл) эритроцитов пациента.
2. В пробирку с эритроцитами пациента добавить равный объем сыворотки пациента и инкубировать при +37°С в течение 30 мин.
3. Центрифугировать, тщательно отобрать сыворотку и перенести быстро в пустую пробирку.
4. Этапы 2 и 3 могут быть повторены с использованием однократно адсорбированной сыворотки пациента и еще одного объема эритроцитов после элюции.
5. После аутоадсорбции исследовать сыворотку в НАГТ с тест-эритроцитами для скрининга. В случае положительного результата необходимо определить специфичность аллоантител.

**Примечание.** Процедура аутоадсорбции может быть затруднена у пациентов с анемией.

## Приложение В

### ОБРАБОТКА ТЕСТ-ЭРИТРОЦИТОВ ДТТ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СКРИНИНГА И ИДЕНТИФИКАЦИИ АЛЛОАНТИТЕЛ

ДТТ — химическое вещество, способное разрушать третичную структуру белков, необратимо трансформируя дисульфидные связи в свободные сульфгидрильные группы, что препятствует связыванию лекарственных препаратов анти-CD38. Так как обработка ДТТ вызывает денатурацию антигенов Kell, пациентам рекомендуется до введения анти-CD38 моноклональных антител проводить фенотипирование антигенов эритроцитов и переливать эритроциты доноров с учетом фенотипа антигенов Kk.

#### Оборудование и реактивы

- ДТТ
- Фосфатно-буферный раствор (PBS) pH 8,0
- PBS pH 7,4
- Стерильный раствор NaCl 0,9 %
- Водяная баня 37°C
- Центрифуги для гелевых карт
- Настольная центрифуга
- Наборы тест-эритроцитов для скрининга и идентификации анти-эритроцитарных антител

#### Описание методики

1. Приготовление ДТТ.
2. Контрольные образцы.
3. Обработка эритроцитов.
4. Интерпретация результатов.

#### 1. Приготовление базового 1М раствора ДТТ

154 мг ДТТ развести в 10 мл PBS pH 8,0. Для лучшего растворения емкость с раствором необходимо поместить в термостат или на водяную баню (37°C) до полного растворения ДТТ. Получившийся раствор необходимо разлить в пробирки по 1 мл и хранить при температуре –18°C и ниже.

**(!)** Замораживать можно только 1М базовый раствор ДТТ.

Для обработки тест-эритроцитов необходим 0,2М раствор ДТТ. Его можно получить из базового 1М раствора ДТТ или сделать свежеприготовленный.

#### А. Приготовление ДТТ из базового 1М раствора ДТТ

Разморозить базовый раствор при комнатной температуре, хорошо перемешать путем встряхивания. Затем развести в 5 раз PBS pH 8,0.

**Б. Приготовление свежего 0,2М раствора ДТТ**

К 1г ДТТ добавить 32 мл PBS pH 8,0 до полного растворения.

2. Контрольные образцы

Так как обработка ДТТ вызывает также денатурацию антигенов Kell, для контроля эффективности действия ДТТ необходимо использовать эритроциты доноров, имеющие антиген K или k. Для доказательства отсутствия инактивации других антигенов тест-эритроцитов, выбирают образец с известным фенотипом, например, EE или Ee.

3. Обработка эритроцитов.

По 200 мкл каждого образца тест эритроцитов скрининговой и /или идентификационной панели отмыть 1 раз стерильным физраствором или PBS pH 7,4. К одному объему (100 мкл) осадка отмытых эритроцитов добавить по четыре объема (400 мкл) 0,2М ДТТ, перемешать путем встряхивания и поместить на 30–45 мин на водяную баню 37°C, периодически помешивая. После инкубации отмыть 4 раза PBS pH 7,4. Допускается легкий гемолиз. Провести тестирование с контрольными образцами. При контроле эффективности обработки эритроцитов ДТТ клетки должны сохранить антигены системы Rh, но утратить антигены K и k. В случае некорректного результата типирования контрольных образцов процедуру обработки раствором ДТТ необходимо повторить.

4. Провести повторный скрининг и идентификацию аллоантител с использованием обработанных ДТТ тест-эритроцитов в НАГТ и оценить полученный результат.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Technical Manual American Association of Blood Banks, 16th ed. — Bethesda: AABB, 2008. — 1002 p.
2. Пашкова И. А. Обеспечение качества гемотрансфузионной терапии в многопрофильном стационаре при оказании больным высокотехнологичной хирургической помощи: автореф. дис. ... д-р мед. наук. — СПб., 2014. — 47 с.
3. Руководство по приготвлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови. Европейский комитет по переливанию крови. — 17-е изд. — 2013. — 565 с.
4. Nance S. T. Management of alloimmunized patients // Vox Sang. — 2010. — Vol. 5. — P. 274–278.
5. Schonewille H. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity // Transfusion. — 2006. — Vol. 46, № 2. — P. 250–256.
6. Autoimmune hemolytic anemia: transfusion challenges and solutions / M. Barros, D. Langhi Jr, J. Bordin et al. // International Journal of Clinical Transfusion Medicine. — 2017. — № 5. — С. 9–18.
7. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing / C. I. Chapuy, R. T. Nicholson, M. D. Aguad et al. // Transfusion. — 2015. — Vol. 55. — P. 1545–1554.
8. Оптимизация подбора совместимых пар донор-реципиент: роль скрининга антител и фенотипирования антигенов эритроцитов реципиентов при гемотрансфузиях / Н. В. Минеева, И. А. Пашкова, И. И. Кробинец и др. // Трансфузиология. — 2015. — № 2. — С. 52–59.
9. Иммуногематологическое обследование доноров крови и (или) ее компонентов и реципиентов. Методические указания ФМБА России 11. 61–2017 / Н. В. Минеева, Е. В. Бутина — СПб., 2017. — 2017. — 60 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	3
Область применения .....	4
Обозначения и сокращения .....	4
1. Порядок проведения исследований для подбора эритроцитсодержащих гемокомпонентов .....	5
2. Определение группы крови по системе АВО в сложных случаях .....	5
3. Исследование антигена D системы Rh в сложных случаях .....	7
4. Скрининг антиэритроцитарных аллоантител. Определение специфичности аллоантител .....	9
Заключение .....	17
<i>Приложение А. Определение класса иммуноглобулинов антител с помощью 5 % раствора унитиола .....</i>	18
<i>Приложение Б. Техника проведения аутоадсорбции .....</i>	19
<i>Приложение В. Обработка тест-эритроцитов ДТТ для проведения скрининга и идентификации аллоантител .....</i>	21
Библиография .....	23

Методическое пособие

**АЛГОРИТМЫ  
ИНДИВИДУАЛЬНОГО  
ПОДБОРА ГЕМОКОМПОНЕНТОВ  
И ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ  
АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ  
И АНТИЭРИТРОЦИТАРНЫХ АНТИТЕЛ  
В СЛОЖНО ДИАГНОСТИРУЕМЫХ СЛУЧАЯХ**

Технический редактор: *Кронберг Т. В.*  
Компьютерная верстка: *Дмитриева О. С.*

Бумага офсетная «Светокопи». Печать офсетная.  
Гарнитура «Calibri». Подписано в печать 15.06.2018 г.  
Печ. л. 1,5. Формат 60×90<sup>1/16</sup>.  
Тираж 100 экз. Заказ № 209.

Отпечатано в типографии ООО «Агентство “ВиТ-принт”».  
191167, Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23, лит. «Б».  
Тел.: (812) 612-40-92, 612-40-93  
E-mail: vit-print@mail.ru