



# Верификация в сложных случаях группового типирования крови по системе АВ0 у реципиентов

**Р.Г. Гильмутдинов**

канд. мед. наук, главный врач,

**А.А. Епифанова**

канд. мед. наук, зав. отделом лабораторной диагностики

«ГБУЗ Оренбургская областная клиническая станция переливания крови»,

**В.Е. Колупаев**

канд. мед. наук, советник по методологии и регулированию

ООО «Био-Рад Лаборатории», г. Москва

*Правильность определения групповой принадлежности по системе АВ0 крови донора и реципиента имеет большое клиническое значение для предотвращения посттрансфузионных осложнений [2]. К факторам риска относятся в первую очередь ошибки учета образцов и записи результатов, технические ошибки выполнения процедуры (в том числе и технические ошибки лаборатории), однако биологические факторы также имеют значительное влияние на правильность определения АВ0. Снижение рисков причинения вреда при переливании несовместимой по АВ0 крови – одно из ведущих направлений в разработке международных и национальных стандартов [4, 7, 10]. Широкое внедрение стандартизации операционных процедур, автоматизации и непрерывной документальной прослеживаемости результатов позволили сократить количество технических и документальных лабораторных ошибок. Влияние факторов риска также можно уменьшить путем проведения процедуры верификации сомнительных результатов по АВ0. Настоящая статья содержит пошаговый алгоритм, позволяющий выявить технические ошибки и/или биологические факторы, которые влияют на правильность определения групповой принадлежности крови реципиентов. Использование в алгоритме гелевой технологии дает возможность выполнить в рамках*

*рутинной практики набор тестов, ранее доступный только референсным лабораториям.*

---

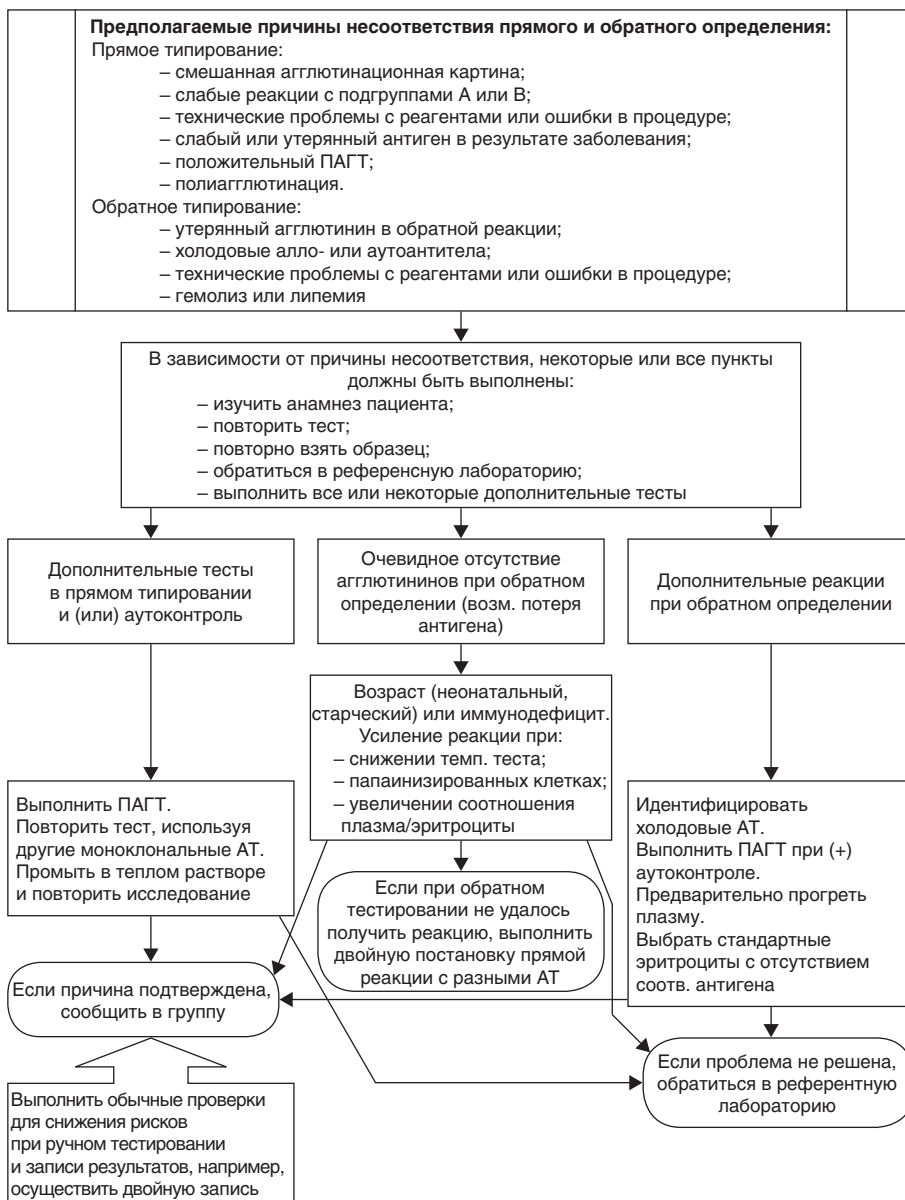
Выполненные в Великобритании кумулятивные исследования в рамках программы SHOT (Снижение риска гемотрансфузий) в 1996–2003 годах показали, что из 2087 подтвержденных случаев неправильного использования крови и ее компонентов (на 16 млн переливаний за указанный период времени) ошибки в 31% случаев произошли в госпитальных лабораториях. При этом около 10% – это ошибки в определении группы крови АВ0 реципиента [6]. Современные исследования, которые являются продолжением программы SHOT, показали, что внедрение систем менеджмента риска и управления качеством позволили сократить количество технических и документальных лабораторных ошибок более чем в три раза. Но риск причинения вреда реципиенту в случаях «трудно определяемых групп крови» остается [9]. Этот факт заставляет непрерывно улучшать алгоритмы верификации результатов группового типирования по АВ0 [7, 10] в лаборатории. Если в 2002 году типичной дополнительной процедурой было «повторное тестирование с использованием другой серии реагентов», то в настоящее время верификация сомнительного результата АВ0 – это сложный комплекс процедур, которые должны учитывать технические и биологические факторы риска [7]. Такие схемы, размещенные в национальных руководствах, например Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. BCSH, 2014 (Великобритания) (рис. 1), носят скорее концептуальный характер, предоставляя лабораториям конкретизировать их в соответствии с собственными аналитическими целями и используемыми методами.

Традиции российской лабораторной медицины предпочитают использование готовых схем с высокой степенью стандартизации, поэтому в настоящей статье мы ставили перед собой задачу, опираясь на международный опыт, создать пошаговый алгоритм, разделенный на этапы с акцентами на критические области и точки принятия решения. Гелевая технология благодаря своей высокой разрешающей способности при выявлении слабых реакций и двойной по-

## Повышение квалификации

пуляции, а также простоте использования и интерпретации результатов, служила «методом выбора» при верификации неопределенных результатов типирования по АВ0.

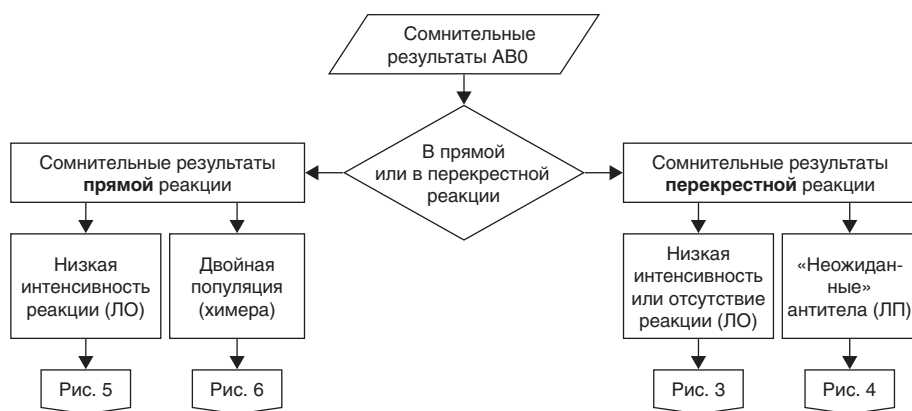
**1. Признаки сомнительного результата определения АВ0.** К сомнительным результатам при определении



**Рис. 1.** Алгоритм разрешения противоречивых результатов АВ0 типирования [7]

групповой принадлежности относятся слабые реакции с анти-А и анти-В антисыворотками, выявление двойной популяции при определении антигенов в прямой реакции, а также появление противоречивых результатов, когда реакции в прямом определении АВ0 не совпадают с ожидаемыми результатами перекрестных реакций [9] (рис. 2).

Очевидно, что для выявления сомнительных и особенно противоречивых результатов необходима одновременная постановка прямой и перекрестной реакции. Прямое определение должно быть выполнено с использованием моноклональных анти-А и анти-В реагентов, а обратное типирование – с помощью эритроцитарных реагентов А1 и В. Согласно цитируемому ранее британскому «Руководству...» [7], для того чтобы понять, можно ли отказаться от перекрестного определения, необходимо оценить следующее: 1) не должно выполняться ручное вмешательство в методику или редакция результатов; 2) результаты текущего прямого определения должны совпадать с предыдущими записями; 3) хотя бы одна из предыдущих записей должна включать в себя подтверждение с проведением перекрестной реакции. Предыдущие определения группы должны быть выполнены на полностью автоматизированной системе под контролем ЛИС или анализатора, без ручной редакции; дополнительные требования и аспекты валидации необходимо определить для конкретных условий с учетом, где



**Рис. 2.** Проявления сомнительных результатов типирования по АВ0, нуждающихся в проведении верификации

и когда были выполнены исследования и зафиксированы результаты.

**2. Устранение ошибок в проведении исследования при выявлении сомнительных результатов АВО.** Большинство недостоверных результатов типирования связаны как с техническими ошибками, включая проблемы идентификации образцов, так и с методологическими. Решение проблемы учета образцов и прослеживаемости результатов возможно при автоматизации исследований и внедрении лабораторной информационной системы.

Чтобы избежать технических ошибок при повторном выполнении теста, результат которого выглядит как недостоверный, необходимо проверить следующее:

- ~ соответствие условий взятия и хранения образца рекомендациям производителя реагентов и требованиям системы качества лаборатории;
- ~ правильность маркировки образца;
- ~ режим центрифугирования плазмы (наличие фибрина приводит к интерференции);
- ~ соответствие используемой методики инструкции для применения выбранных реагентов;
- ~ правильность выбора дилуэнта;
- ~ соответствие набора реагентов поставленной задаче (например, использование двух флаконов со стандартными эритроцитами А1 вместо одного с эритроцитарным реагентом А1 и другого с эритроцитами группы В);
- ~ срок годности реагентов;
- ~ правильность работы реагентов, связанную с соблюдением условий хранения, возможностью бактериальной контаминации;
- ~ соответствие оборудования рекомендациям производителя (например, использование центрифуги другого производителя может привести к сомнительным результатам);
- ~ сроки обслуживания оборудования, проведения метрологического контроля;
- ~ результаты контроля качества (внутрилабораторный контроль реагентов).

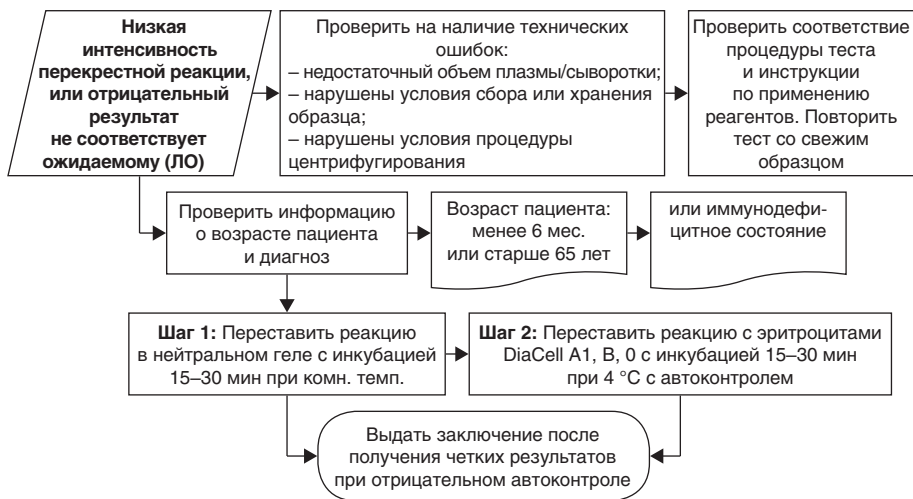
После того как проверка на наличие технических ошибок завершена постановкой контроля качества реагентов, необходимо повторить тестирование. Повторное выявление

несоответствия результатов может быть следствием систематической ошибки дозирования образцов и реагентов, тогда как несоответствие режима центрифугирования ID-карт чаще, наоборот, проявляется в снижении воспроизводимости результатов.

В отсутствие технических ошибок проблемы несоответствия между реакциями прямого и обратного определения могут быть связаны с биологическими факторами и чаще проявляются при тестировании сыворотки, чем при АВ0 типировании клеточной суспензии; чаще характеризуются проявлением ложноположительных результатов (неожиданных антител), чем ложноотрицательных.

**3. Ложноотрицательные результаты при тестировании антител в перекрестной реакции.** Ложноотрицательные результаты в перекрестной реакции наблюдаются в виде отсутствия антител, когда они должны четко определяться, исходя из результатов прямого теста или снижения их реактивности. Схема верификационных процедур для этого случая представлена на рис. 3.

На первом этапе необходимо исключить технические ошибки, как это описано в разделе 2 данной статьи. В случае слабых реакций или их отсутствия при выявлении антител



**Рис. 3.** Схема верификационных процедур в случае получения противоречивых результатов типирования по АВ0, которые проявляются в виде слабой или ложноотрицательной реакции в перекрестном тесте

наиболее характерными техническими ошибками будут нарушения условий сбора и хранения образца, а также недостаточный объем дозирования плазмы или сыворотки.

Необходимо собрать информацию о возрасте пациента, а также о наличии клинического диагноза и/или терапии, связанных с развитием иммунодефицитных состояний. Антитела отсутствуют у новорожденных в возрасте до 6 мес., у пожилых людей старше 65 лет; в пожилом возрасте способность к синтезу необходимого уровня антител утрачивается. Это также происходит при иммунодефицитах, химио- и лучевой противоопухолевой терапии, иммуносупрессии при пересадке костного мозга.

В целях верификации ложноотрицательных результатов перекрестной реакции необходимо предпринять следующие шаги:

- ~ повторить тест, добавив 1–2 капли сыворотки/плазмы исследуемого образца сверх количества, указанного в методике, и включив в протокол тестирования этап инкубации 15–30 мин при комнатной температуре. Если интенсивность реакции со стандартными эритроцитами соответствует ожидаемой, можно выдать заключение о групповой принадлежности крови пациента;
- ~ если повторно был получен слабый или отрицательный результат, необходимо еще раз повторить перекрестную реакцию, используя гелевую карту с нейтральным гелем; инкубацию (15–30 мин) проводить на холоде (4 °С). Агглютинины анти-А и анти-В – в основном IgM антитела, которые лучше реагируют при низких температурах. Однако в этом температурном интервале может проявляться активность холодных аутоиммунных антител, например анти-І. Для выявления неспецифических реакций, связанных с ними, необходимо обязательно включить в тестирование стандартные эритроциты группы 0, чтобы убедиться в отсутствии ложноположительных результатов. Также важно использовать автоконтроль (эритроциты пациента, смешанные с плазмой или сывороткой пациента), так как в некоторых случаях неспецифические антитела способны реагировать даже с собственными эритроцитами. Результаты можно выдать только в случае отрицательной реакции со стандартными эритроцитами группы 0 и в автоконтроле.

**4. Выявление «неожиданных» антител в перекрестной реакции.** Подозрение на ложноположительные результаты перекрестной реакции возникают в том случае, когда выявляются антитела, несмотря на то, что прямая реакция указывает на их отсутствие. Эта ситуация может быть связана с наличием подгрупп у групповых антигенов А: агглютинины анти- $A_1$  нередко встречаются в сыворотке  $A_2$  и  $A_2B$  пациентов. Другой распространенной причиной неожиданных положительных реакций могут являться холодовые агглютинины. Поэтому важно, чтобы эритроцитарные реагенты перед использованием нагрелись до комнатной температуры, чтобы предотвратить ложный результат из-за холодовых агглютининов.

Эффекты неожиданного выявления антител имеют различное клиническое значение, зависящее от их природы, поэтому причина ложноположительных результатов должна быть верифицирована в дополнительных тестах (рис. 4).

При выявлении «неожиданных антител» необходимо в первую очередь проверить состояние реагентов. Нарушение срока годности и условий хранения реагентов и повреждения упаковки могут приводить к ложноположительному результату. Проверить, что выбор и используемый объем эритроцитарных реагентов соответствует Инструкции. Повторно выполнить внутрилабораторный контроль (раздел 2 статьи). После исключения технических ошибок и сбора информации о пациенте выполняется верификационный алгоритм, основанный на сравнении активности антител после инкубации при комнатной температуре и при 37 °С [8] (на рис. 4 шаги 1 и 2 соответственно). В зависимости от полученных результатов строится алгоритм дальнейших исследований:

- ~ если положительная реакция наблюдается только с эритроцитами  $A_1$  при комнатной температуре, а при 37 °С «неожиданная» активность антител исчезает, следует предположить наличие подгруппы антигена А. Требуется дополнительные исследования, которые будут включать в себя повтор перекрестной реакции при комнатной температуре с клетками  $A_2$ . Если образец не реагирует, провести исследование эритроцитов пациента с реагентами анти- $A_1$  и анти-Н с помощью ID-карт Anti- $A_1$  Absorbed и DiaClonAnti-Н;



~ положительная реакция со всеми эритроцитами только при комнатной температуре с исчезновением реактивности при 37 °С может свидетельствовать либо о наличии холодных антител против антигенов, не относящихся к системе АВ0, либо о полиагглютинации сыворотки. Дифференцировать наличие анти-І от явления полиагглютинабельности сыворотки можно, собрав информацию о клиническом диагнозе пациента и применив специальный тест с эритроцитами новорожденного, которые не несут І антиген, и автоконтролем. Отрицательный результат будет свидетельствовать о наличии анти-І холодowych аутоантител в образце пациен-

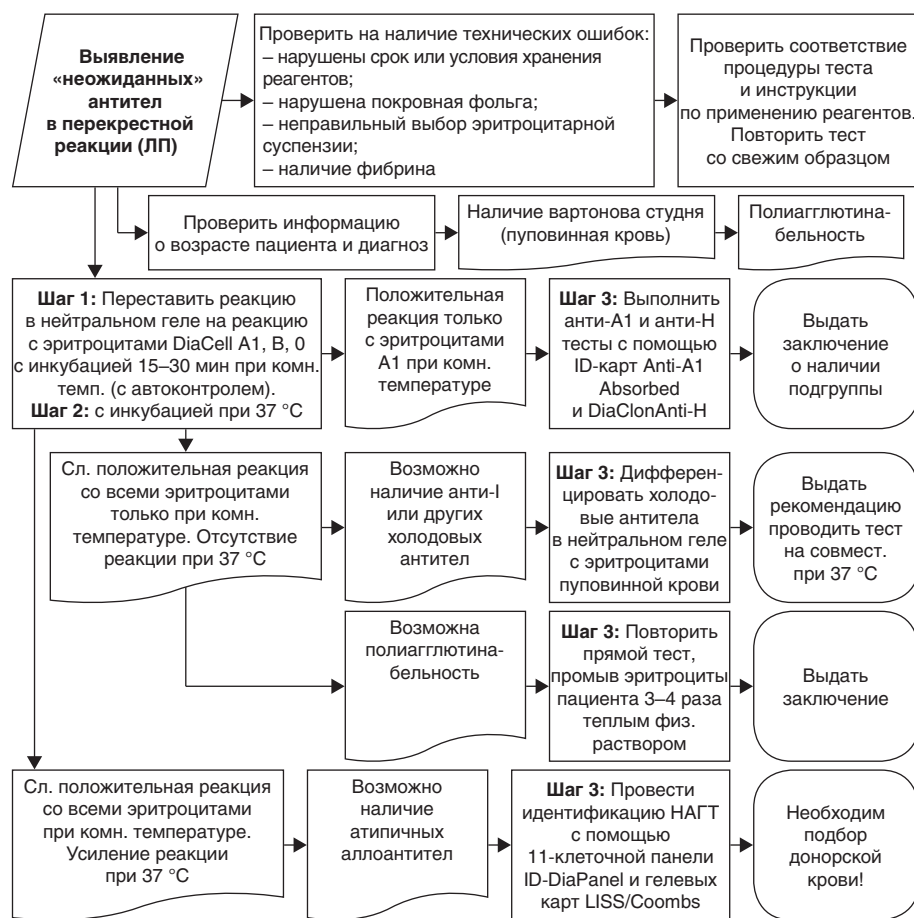


Рис. 4. Алгоритм верификации определения АВ0 при выявлении антител, несоответствующих результатам прямой реакции. Ложноположительный результат

та. Полиагглютинабельные свойства сыворотки могут влиять на результаты прямого теста, поэтому при подозрении на это явление (положительный автоконтроль) следует с целью верификации повторить прямой тест, промыв эритроциты пациента 3–4 раза теплым физиологическим раствором;

- ~ если наблюдается слабopоложительная реакция со всеми эритроцитами при комнатной температуре и усиление реакции при 37 °С, следует предположить наличие аллоиммунных антиэритроцитарных антител с аномальной холодовой активностью. Необходимо попытаться выявить факт сенсibilизации в анамнезе пациента (беременности, переливания крови, трансплантации). Эти антитела могут иметь важное клиническое значение, зависящее от природы антигена-мишени, поэтому их необходимо идентифицировать в непрямом антиглобулиновом тесте с помощью 10- или 11-клеточной идентификационной панели, например ID-DiaPanel, а в заключении указать на необходимость подбора донорской крови и обязательную постановку реакции совместимости.

Таким образом, при выявлении «неожиданных» антител установление группы крови по первичному результату без последующей верификации в геле может привести к ошибкам в подборе донорской крови и тяжелым последствиям для реципиента.

**5. Процедура верификации слабых результатов прямой реакции АВ0.** Слабые или отрицательные реакции могут проявляться в прямой реакции при наличии очень слабых подгрупп А или В, потере трансферазной активности при острой лейкемии, а также при массивной трансфузии крови группы 0 или пересадке костного мозга.

Для выявления слабого или утерянного антигена следует в первую очередь рассмотреть возможность технической ошибки, особенно ошибки дозирования и центрифугирования, детально изучить трансфузиологический анамнез или историю болезни на предмет трансплантации костного мозга (рис. 5).

После исключения технических ошибок и сбора анамнеза повторить реакцию прямого типирования и исследовать полученный результат под большим увеличением (для этого

## Повышение квалификации

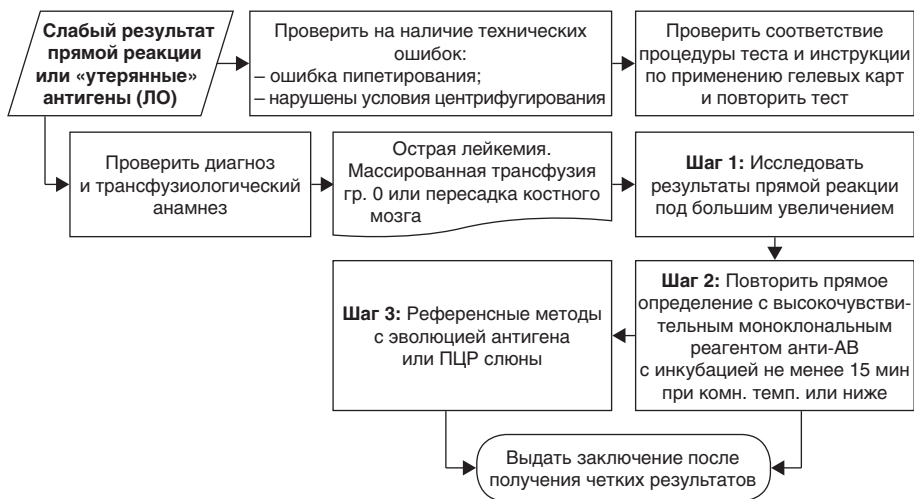


Рис. 5. Верификация слабого или утерянного антигена в прямой реакции АВ0

на современных иммуногематологических анализаторах существует специальный режим просмотра).

Второй шаг исследования необходимо проводить с использованием гелевой карты для прямого определения группы крови, например ID-карта DiaClon ABO/Rh for Patients, в которую входит очень чувствительный моноклональный анти-АВ реагент, или использовать поликлональные реагенты. Включить в постановку стадию инкубации в течение как минимум 15 мин при комнатной или более низкой температуре.

Если описанные шаги не позволяют решить проблему, в мировой практике выполняются специализированные референсные тесты, включая методы абсорбции/элюции антигенов и ПЦР исследования слюны на предмет выявления соответствующих генов.

**6. Сомнительный результат прямой реакции АВ0 в виде двойной популяции.** Двойная популяция выглядит как смешанная агглютинационная картина, состоящая из набора больших и малых агглютинатов с большим количеством неагглютинировавших клеток (рис. 6) [5]. Визуально двойная популяция в большинстве случаев четко выявляется только при использовании гелевой технологии, которая позволяет наблюдать ее, даже если минорная популяция составляет не более 5% общего числа эритроцитов. Частой причиной

## Повышение квалификации

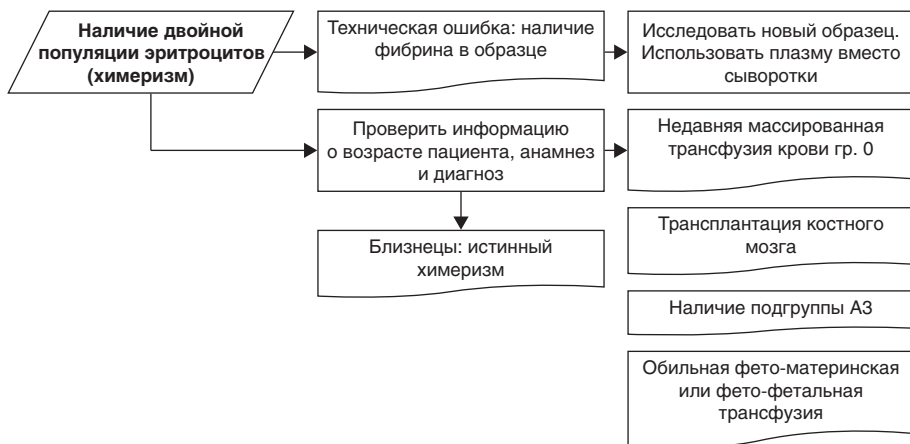


Рис. 6. Поиск причин двойной популяции в анамнезе пациента

появления двойной популяции может быть массивированная трансфузия крови группы 0 у пациентов с группами крови А, В или АВ.

Смешанная популяция может возникать вследствие трансплантации костного мозга и включать в себя эритроциты организма пациента и группы, соответствующей трансплантанту. Слабые подгруппы  $A_3$  традиционно дают смешанную агглютинационную картину, соответствующую двойной популяции.

При лейкозах наблюдается снижение агглютинативности эритроцитов, в результате чего значительное их количество остается не вовлеченным в агглютинацию даже при использовании высокоактивных моноклональных реагентов (ложная кровяная химера) [3].

В виде двойной популяции проявляется обильная фето-материнская трансфузия или (редко) химеризм, связанный с фето-фетальными трансфузиями или внутриутробным обменом эритроцитарных предшественников между близнецами или слияниями двух оплодотворенных яйцеклеток в один плод. До назначения переливания, чтобы выявить риск для пациента, необходимо выявить причину возникновения двойной популяции, изучив трансфузиологический анамнез и историю болезни.

**7. Полиагглютинативность эритроцитов как причина возникновения сомнительных результатов в прямом**

**тесте АВ0.** Синдром полиагглютинабельности эритроцитов характеризуется способностью эритроцитов агглютинироваться многими моноклональными реакционными антисыворотками. Полученная картина напоминает реакции группы крови АВ, однако полиагглютинабельность эритроцитов не связана с их принадлежностью к той или иной группе крови. Эритроциты приобретают полиагглютинабельные свойства под действием бактериальных и вирусных гликозилаз. Подозрение на полиагглютинабельность микробного генеза возникает при септицемии, кишечных, респираторных, раневых инфекциях, опухолях и обструктивных процессах, когда микробные ферменты в избытке попадают в кровоток. Кратковременные эпизоды полиагглютинабельности эритроцитов описаны при бессимптомных инфекциях. При синдроме полиагглютинабельности эритроциты пациента не агглютинируются аутологичной сывороткой – автоконтроль будет отрицательным (в отличие от явления полиагглютинабельности сыворотки) [1].

Кроме синдрома полиагглютинабельности, существует неспецифическая агглютинация, которая наблюдается при аутоиммунной гемолитической анемии и других аутоиммунных заболеваниях, сопровождающихся адсорбцией аутоантител на эритроцитах, при гемолитической болезни новорожденных, эритроциты которых нагружены аллоантителами матери [1]. В этом случае для верификации необходимо промыть исследуемые эритроциты 3-кратно в теплом физиологическом растворе (37 °С) и тестировать повторно. Повышенная агглютинабельность эритроцитов наблюдается у новорожденных при попадании в пуповинную кровь вартонова студня, который покрывает пуповинные эритроциты новорожденного.

Для верификации группы крови необходимо промыть исследуемую эритроцитарную суспензию как минимум 4–5 раз в физиологическом растворе и перетестировать ее в прямой реакции.

*Внимание!*

Сомнительные результаты, выявляемые в прямой реакции, встречаются значительно реже, чем неожиданное выявление антител. Однако в этих случаях верифицировать групповую принадлежность с помощью лабораторных процедур гораздо

сложнее. Сомнительные и противоречивые результаты прямой реакции, как правило, характерны для определенного списка диагнозов. Поэтому при верификации используют в первую очередь информацию, полученную от лечащих врачей.

Представленный алгоритм позволяет в рутинной практике верифицировать результаты прямого и перекрестного определения АВ0 при их взаимном несоответствии или в других сложных случаях. Согласно законодательству РФ [4], «...во всех случаях нечеткого, сомнительного результата необходимо повторить исследование, используя дополнительно стандартные реагенты другой серии. Если результаты остаются неясными, образец крови направляют на исследование в специализированную лабораторию...». К сожалению, в практике нашей страны референсные функции выполняют лаборатории Станций переливания крови, которые перегружены огромными объемами скрининга донорской крови. С другой стороны, внедрение описанного алгоритма и широкая доступность гелевой технологии позволяют выполнять практически полный объем процедур верификации в клиничко-диагностических лабораториях. Алгоритм по верификации результатов в сложных случаях группового типирования образцов по АВ0 может быть положен в основу соответствующих стандартных операционных процедур лаборатории, производящей иммуногематологические анализы. Обоснованием для приобретения соответствующего комплекта оборудования для трансфузиологических кабинетов может являться раздел 3 приказа Минздравсоцразвития России от 28.03.2012 № 278н [3].

### Список использованной литературы

1. Группы крови человека (Иммуносерология). Полиагглютинативность эритроцитов. [03-ektb.ru/gruppy-krovi-cheloveka-immunoserologiya/179-poliagglyutinabelnost-eritrotsitov/6826-poliagglyutinabelnost-eritrotsitov](http://03-ektb.ru/gruppy-krovi-cheloveka-immunoserologiya/179-poliagglyutinabelnost-eritrotsitov/6826-poliagglyutinabelnost-eritrotsitov) (дата обращения: 30.06.2017).
2. Минеева Н.В. Группы крови человека. Основы иммуногематологии. СПб., 2010. 188 с.
3. Приказ Минздравсоцразвития России от 28.03.2012 № 278н «Об утверждении требований к организациям здравоохранения (структурным подразделениям), осуществляющим заготовку, пе-

- переработку, хранение и обеспечение безопасности донорской крови и ее компонентов, и перечня оборудования для их оснащения».
4. Приказ Минздрава России от 25.11.2002 № 363 «Об утверждении Инструкции по применению компонентов крови».
  5. Рекомендации Совета Европы «Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови» № R (95)15 ЕДКЛС, 2011. С. 185–195.
  6. Cumulative data 1996–2003 in SERIOUS HAZARDS OF TRANSFUSION. Annual report 2003. SHOT Office. 2004. 88 p.
  7. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. BCSH. 2014. 60 p.
  8. MLAB 2461 CLINICAL II. Immunohematology. [austincc.edu/mlt/clin2/abo1.html](http://austincc.edu/mlt/clin2/abo1.html) (дата обращения: 30.06.2017).
  9. Rowley M. Haemovigilance national audit and external quality assesment. Working together to improve transfusion practice. SHOT symposium at ISBT 2015. 25th Regional congress of the ISBT. 27 June 2015 to 01 July 2015 London, UK.
  10. Safe blood and blood products. Module 3: Blood group serology. WHO. 2009. 134 p.