



Прямой антиглобулиновый тест

70-я годовщина (2015)

Paul Aerts
Scientific Affairs Manager



Robert Royston Amos (Robin) Coombs



Robin Coombs

9 Января 1921 — 25 Января 2006

1945 with A. E. Mourant & R. R. Race
Новый тест для обнаружения слабых и
неполных агглютининов системы Rh.
Br. J. Exp. Pathol. 26, 255–266.

Coombs et al. Lancet 1946; Feb 23:264-266

Case 14 proved to be by far the most interesting family in the series. The baby was 3 weeks old and was anemic but not jaundiced; it was being treated with sulphaguanidine for *Staphylococcus aureus* enteritis. There had been three previous children in this family; the first died after 12 hours, the second is alive, and the third "died suddenly soon after birth"—a history, as far as it goes, suggestive by sepsis. The baby's cells were found to be sensitised. With the indirect method the mother's serum was tested against the cells of 12 persons representing all the known Rh antigens and found to sensitise none of them, but it did sensitise strongly the father's cells. Here, therefore, is clear evidence of the immunisation of a mother by a foetal antigen, not Rh, inherited from the father.

The child, mother, and father all had the same blood groups: O, MN, Rh, rh, "Willis" negative, "Lutheran" negative, and "Levay" negative. The last three groups are "new" ones recently described by Callender, Race, and Gaykoç (1945). The Willis group is within the Rh complex, the other two are unconnected with any known group. If the mother in this family was really Rh, Rh₀ (which cannot yet be distinguished serologically from Rh, rh), and the father and child were Rh, rh, then Fisher's hypothetical Rh antibody (Race 1944) would have to be considered; however, the antibody was absent. The antibody does not correspond to anti-P. It is hoped that it will be possible to investigate the family more fully.

Вопрос справедливости



Tatsachen über die Bluktörperchen-
Agglutination. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd
Inefktr 1 Originale 1908;46:49-51.

Med Lav. 2011 Nov-Dec;102(6):467-72.

Carlo Moreschi (1876-1921): соучредитель журнала "La
Medicina del Lavoro" пионер современной медицины о
котором часто забывают.



Типичный клинический случай

- Пациент, возраст – 76 лет; ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, хронические дегеративные изменения позвоночника; терапия фуросемидом, нитраты, нестероидные противовоспалительные средства
- Госпитализация по причине ухудшения общего состояния, бледности, повышенной утомляемости в течение последних нескольких дней
- Общее состояние непрерывно ухудшалось, почечная недостаточность, тяжелая анемия
- Интенсивная терапия, трансфузия эритроцитсодержащих гемокомпонентов, общее состояние непрерывно ухудшалось, нарастала желтуха
- Смерть спустя 3 дня после госпитализации



Иммуногематологические исследования

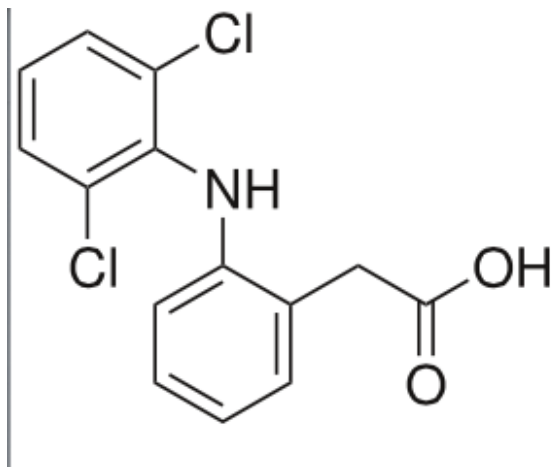
- Сыворотка гемолизирована
- Прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ): Анти-C3d
положительный (сильная реакция)
- Непрямой антиглобулиновый тест (НАГТ):
отрицательный



Последующие результаты

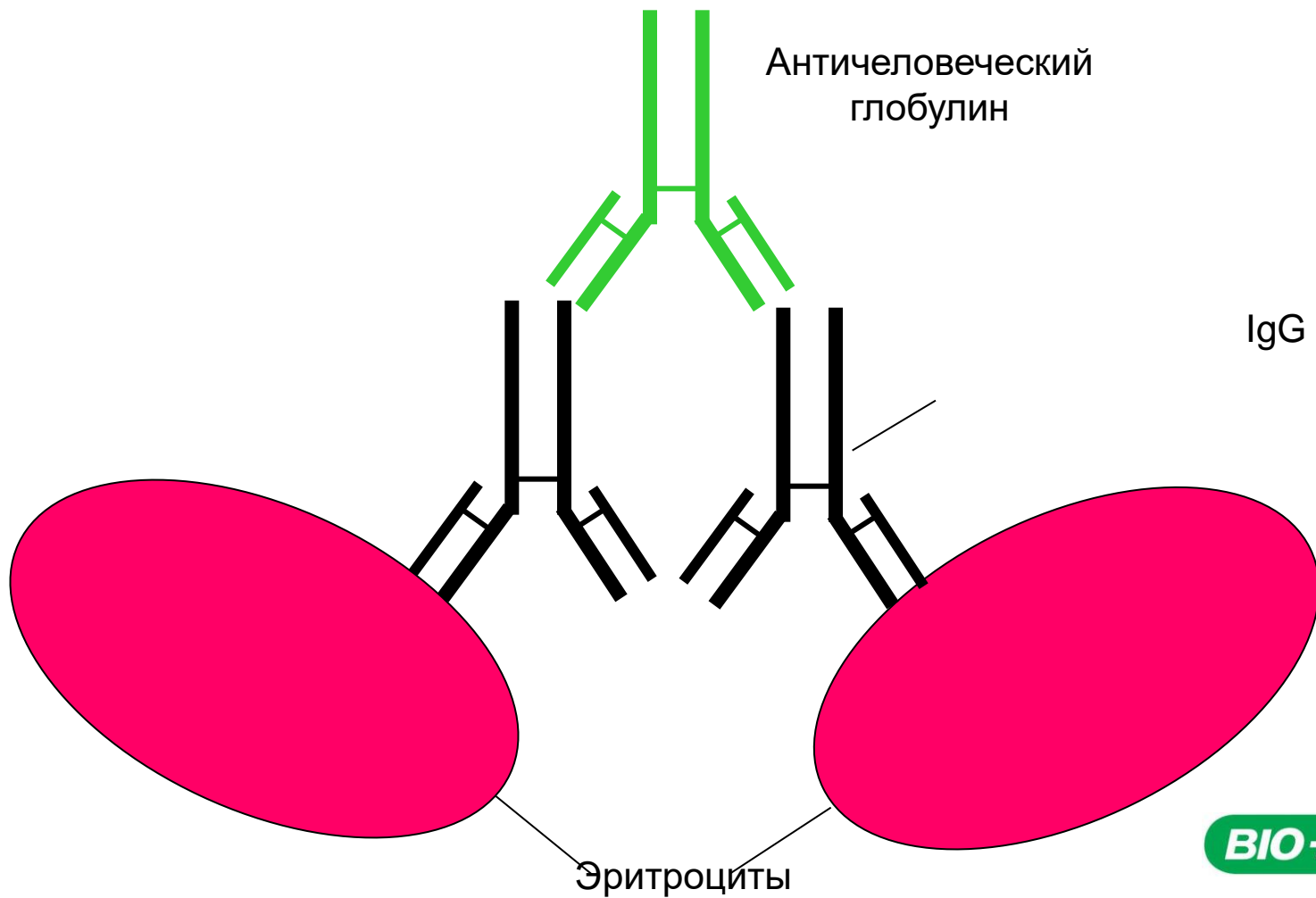
- ⇒ Подозрение на иммунный гемолиз
- ⇒ НАГТ положительный после приема препарата Диклофенак
- ⇒ Лекарственная (Диклофенак – индуцированная)

иммуногемолитическая анемия



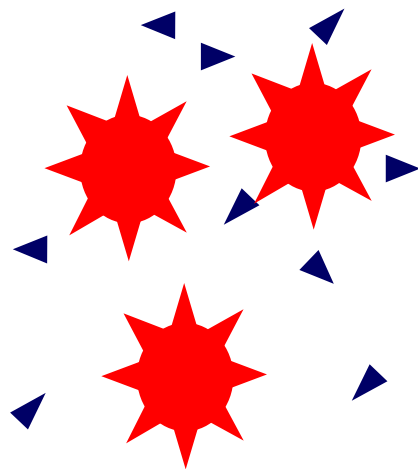
Нестероидное
противовоспалительное средство
(NSAID) обладающее
противовоспалительным и
обезболивающим эффектом

Реагент Кумбс

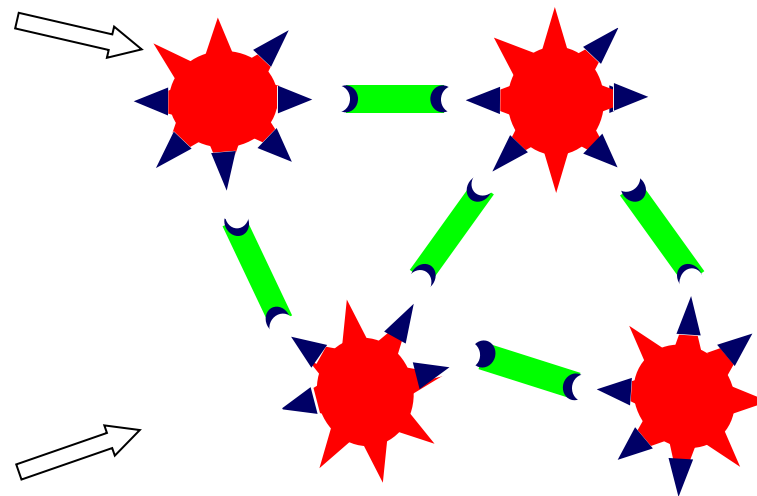
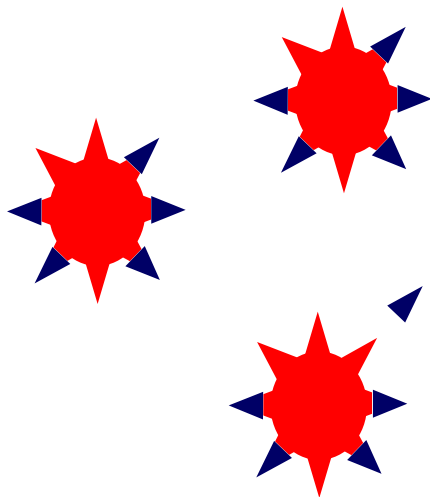


ПАГТ и НАГТ

НАГТ



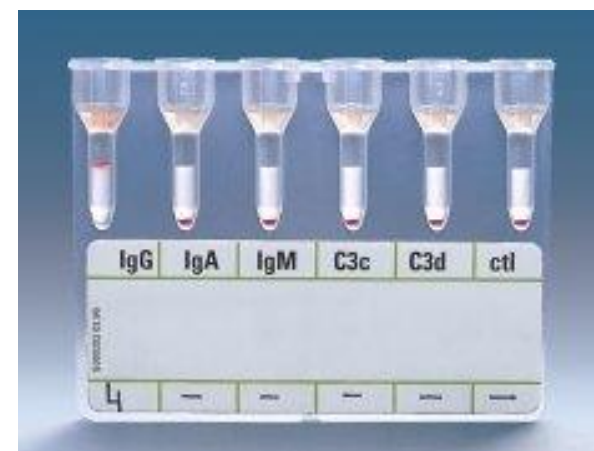
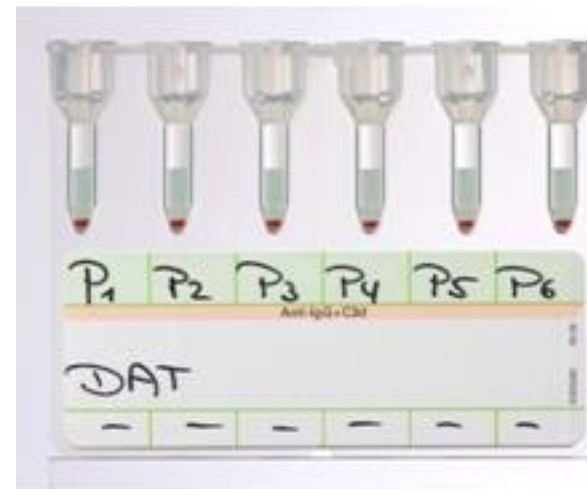
ПАГТ



Агглютинация после внесения антиглобулинового реагента

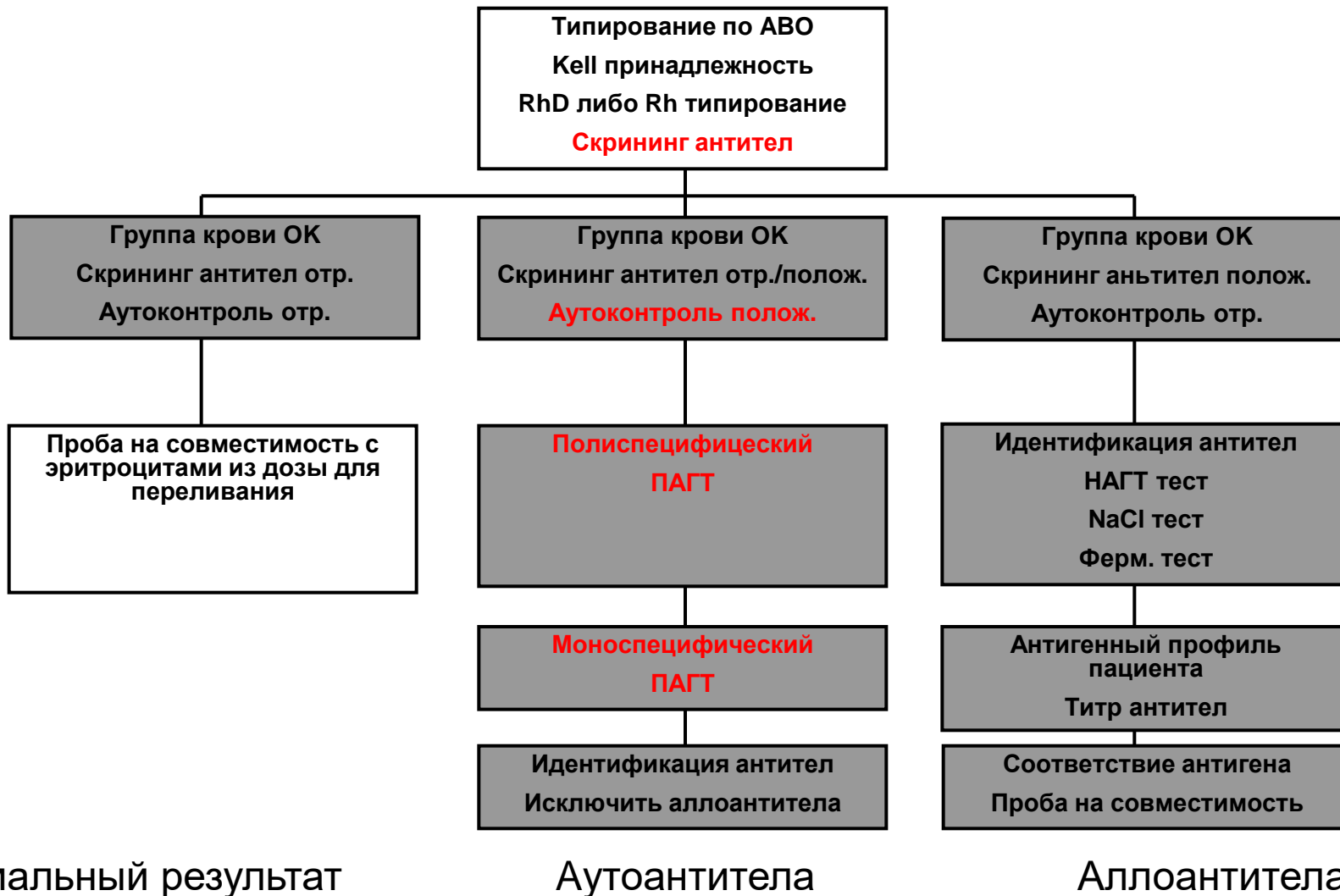
Античеловеческий глобулин

- Полиспецифический:
Анти-IgG + Анти-C3d
- Моноспецифический:
Анти-IgG
Анти-IgA
Анти-IgM
Анти-C3c
Анти-C3d



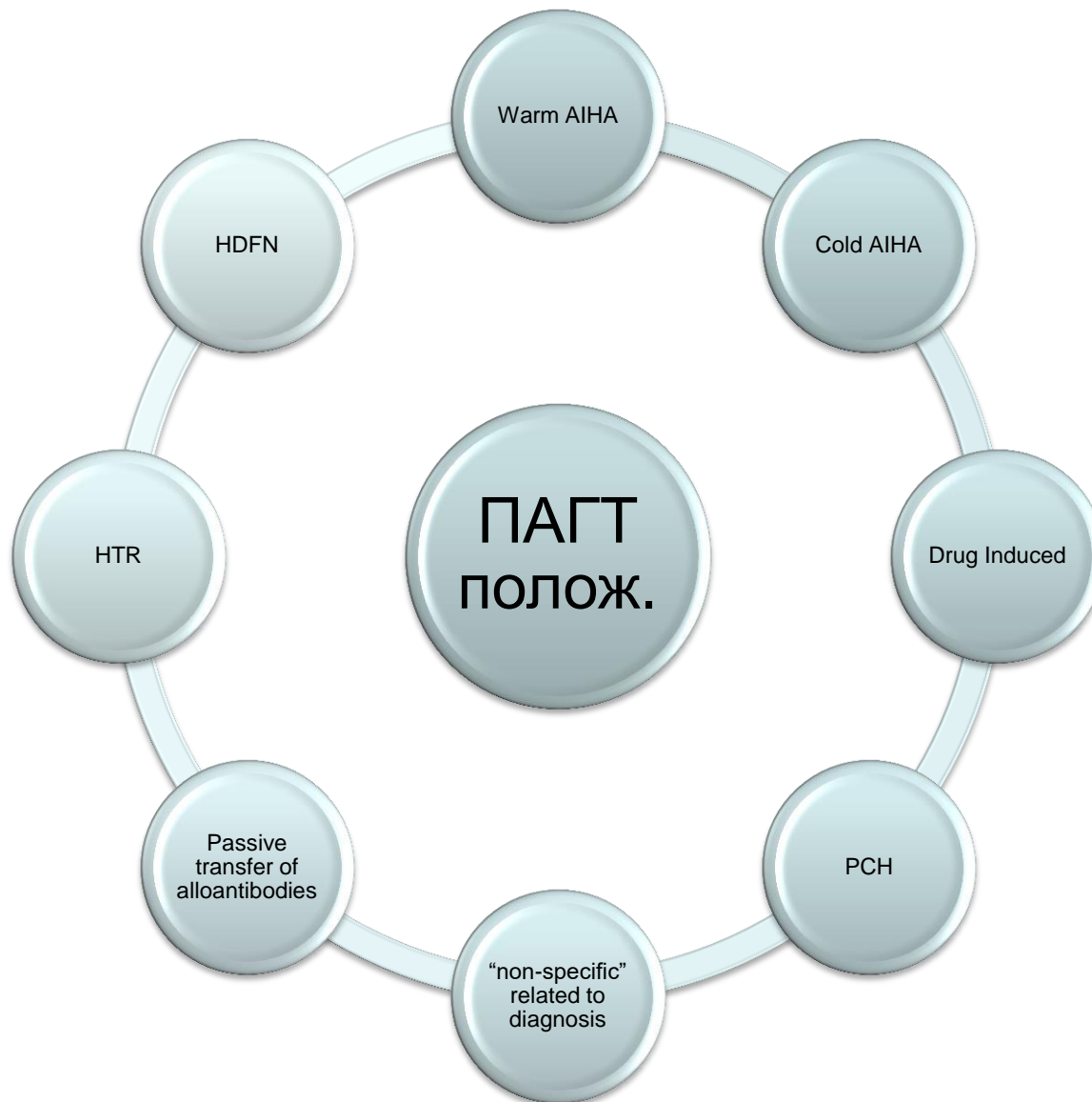
BIO-RAD

Блок - схема





Дифференциальная диагностика положительного ПАГТ





ИММУННАЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АНЕМИЯ (ИНА)



Классификация АИГА

- 1) АИГА с неполными тепловыми антителами (WAIHA)
- 2) АИГА с полными холодовыми антителами (CAHA)
- 3) Лекарственная иммунная гемолитическая анемия (DIHA)
- 4) Пароксизмальная холодовая гемоглобинурия (PCN)

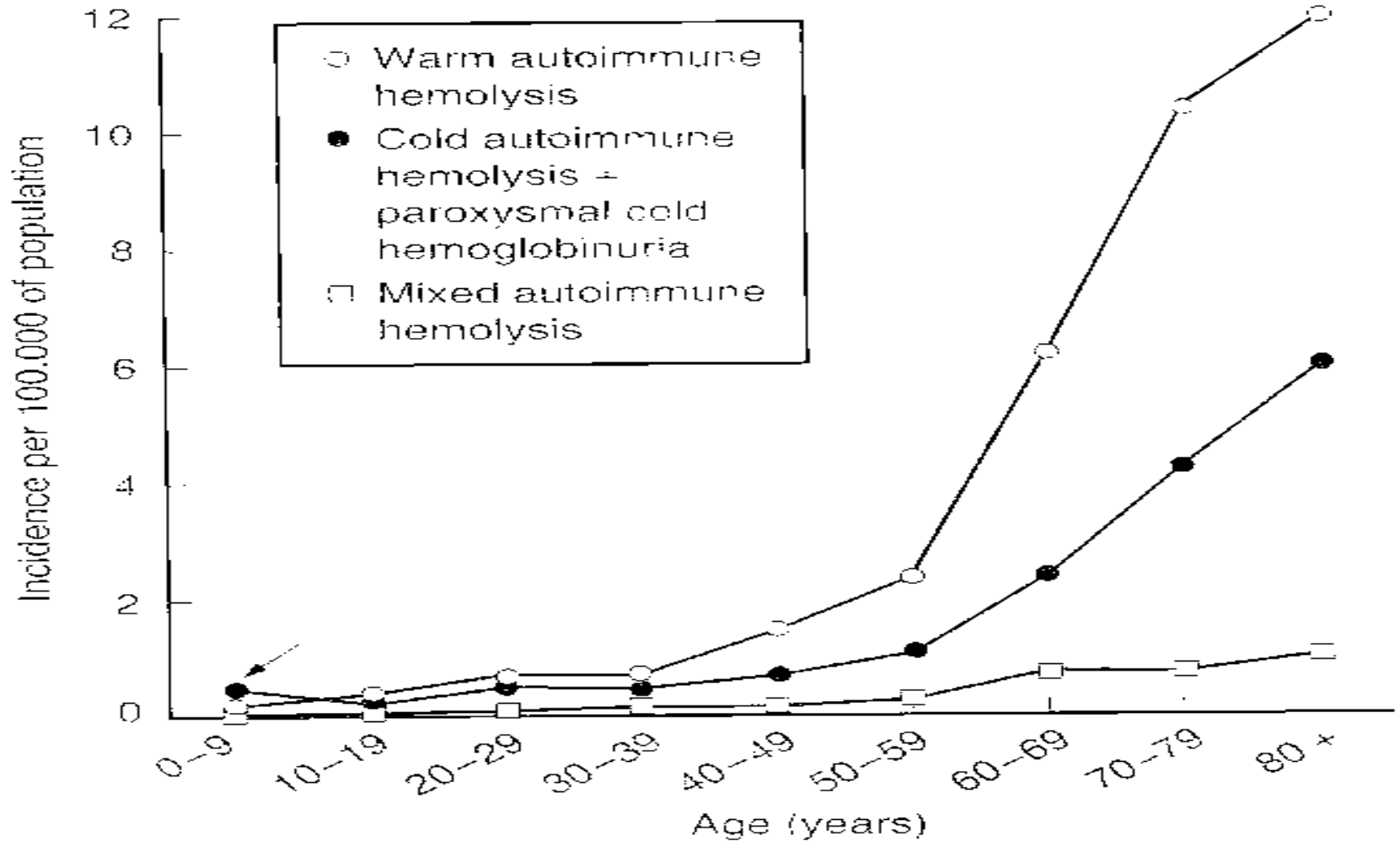


Клиническая значимость аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА)

- 1/4 всех случаев заболеваемости иммунными гемолитическими анемиями имеют аутоиммунную природу
- Частота заболеваемости: 1:30,000 до 1:75,000/в год
- Наиболее распространена WAIHA: 70 %
- Женщины (60 %) > Мужчины (40 %)



Заболеваемость АИГА





Частота распространённости АИГА

WAIHA 70,3 %

CAIHA 15,6 %

DIHA 1,7 %

PCH 12,4 %



Центральная роль ПАГТ в диагностике ИНА

- Специфичность : 92-93 %
- Чувствительность: 96-98 %
(т.е. отрицательный только для 2-4% всех пациентов АИНА)

Минимальный уровень детекции: 100-200 IgG молекул/эритроцит

RBCs Sensitized In Vitro with Anti-RhD	
Antiglobulin Test	IgG Molecules per RBC
Negative	<25-120
1/2+	120
1+	200
2+	300-500
3+, 4+	>500



Причины ложно-отрицательных результатов ПАГТ

- Слишком низкое количество антител связанных с эритроцитами
- IgM- и IgA аутоантитела
- Эритроциты покрыты низкоавидными иммуноглобулинами
- Технические ошибки (метод в пробирке)
 - недостаточная процедура промывки
 - контаминация промывочного раствора и антиглобулинового реагента иммуноглобулинами
 - слишком энергичное ресуспендирование эритроцитов после центрифугирования



Дальнейшие тесты для проведения иммуногематологического обследования

- **ПАГТ с моноспецифическим реагентом:**
Идентификация иммуноглобулинов и связанных с эритроцитами белков системы комплемента.
- **Элюция:**
Определение и идентификация антител связанных с эритроцитами.
- **Тепловая и холодовая проба:**
Идентификация аутоантител вызвавших гемолиз
- **Тест на лекарственную переносимость:**
Идентификация лекарственно-зависимых антител
- **Тест Доната-Ландштейнера:**
Идентификация двухфазных гемолизинов



АУТОИММУННАЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АНЕМИЯ С НЕПОЛНЫМИ ТЕПЛОВЫМИ АНТИТЕЛАМИ (WAIHA)



WAIHA – причины, клинические осложнения, результаты лабораторных тестов

- **Этиология:**
 - идиопатическая (наследственная)
 - приобретенная
(Лимфома – синдром Рихтера, СКВ, ...)
- **Течение заболевания:** острая либо хроническая форма
- **Патология:** бледность, повышенная утомляемость, желтуха, боли в спине, боли в животе, гемоглобинурия.
- **Показатели гемолиза:** Hb ↓, ЛДГ ↑, гаптоглобин ↓, ретикулоцитоз, неконъюгированный билирубин ↑
- **В случае хронического течения:** спленомегалия



WAIHA Серология (1)

- Аутоконтроль: **положительный**
- ПАГТ: **анти-IgG полож и/или анти-C3d положительный**

Обнаруженный белок

Пациенты (%)

Только IgG

40-50

IgG и C3

45-60

Только C3

0-15



WAIHA Серология (2)

- Элюат: **положительный**
без очевидной
специфичности антител:
“неспецифические” либо “
либо специфичные к антигенам системы Резус (Rh)”
- НАГТ: **панагглютинация**,
иногда антитела специфичные к антигенами
системы Резус (например, анти-e)
- Исключения: ПАГТ-отрицательный WAIHA
тепловые IgM аутоантитела

WAIHA – Серология (3)

➤ ПАГТ: титрование анти-IgG





Субклассы иммуноглобулинов IgG (Garratty 1989)

Субкласс	Пациенты		Доноры
	WAIHA	ПАГТ, без WAIHA	
IgG1	50	72.0	81.0
IgG2		6.3	1.3
IgG3		6.3	2.6
IgG4		0	6.5
Только один класс	58.8	84.6	91.4
IgG1 с другим(и)	50.0	12.5	7.9
IgG2 с другим(и)	2.2	9.4	4.5
IgG3 с другим(и)	6.6	6.3	4.5
IgG4 с другим(и)	0	12.5	5.6
Два либо более	41.2	15.4	8.6

Наличие деструкции эритроцитов *in vivo*?

ПАГТ

Деструкция

IgG&C3

Максимальная

IgG3

Высокая

IgG1

Низкая

IgG2&4

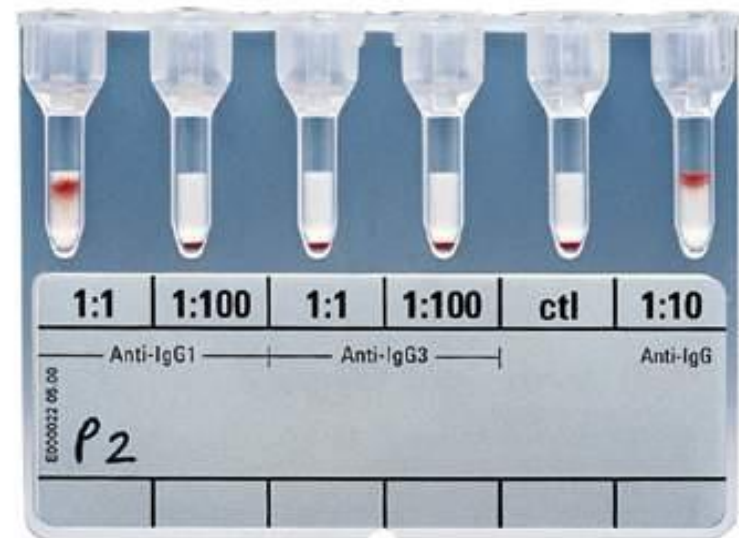
Отсутствует

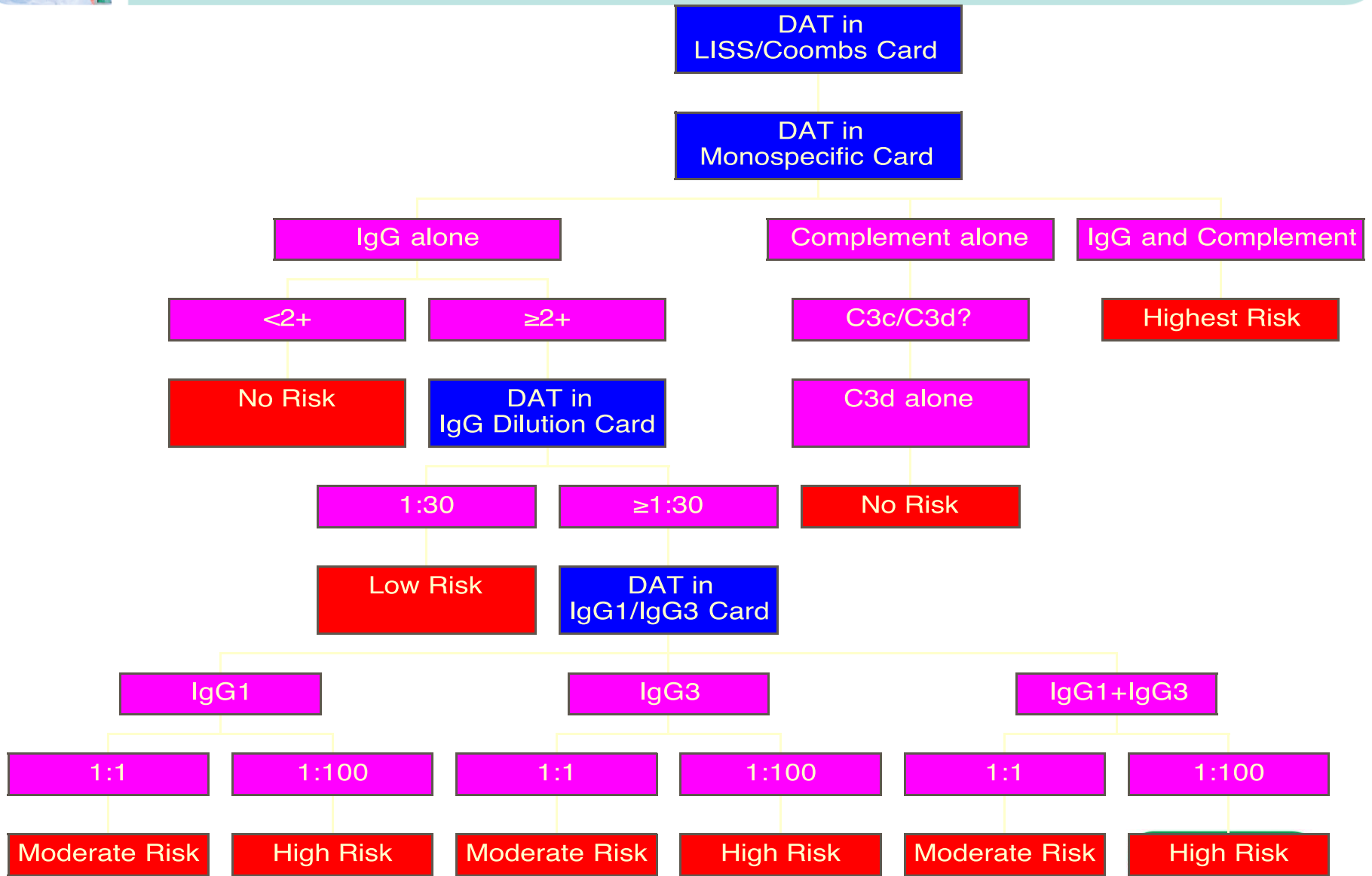
C3c

Ограничена

C3d

Отсутствует







АУТОИММУННАЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АНЕМИЯ С ПОЛНЫМИ ХОЛОДОВЫМИ АНТИТЕЛАМИ (САНА)



САНА - причины, клинические осложнения, результаты лабораторных тестов

- **Этиология:** - идиопатическая (заболевание обусловленное холодowymi агглютинами)
- приобретенная (например: лимфома, микоплазма, пневмония, вакцинация)
- **Течение:** острое либо хроническое
- **Патология:** бледность, повышенная утомляемость, желтуха, боли в спине, боли в животе, гемоглинурия, почечная недостаточность, акроцианоз, болезнь Рейно, rat-bite necrosis, нарастающие под действием холода
- **Показатели гемолиза:** Нв ↓, ЛДГ↑↑, гаптоглобин↓, ретикулоцитоз, неконъюгированный

29 билирубин ↑



САИНА - Серология

- ПАГТ (полиспецифический антиглобулиновый реагент)
Сильно полож.
- ПАГТ (моноспецифический) анти-IgM: от отр. до сильно полож.
анти-C3d: сильно полож.
- Тест на агглютинацию: 4°C до 37°C
Холодовая проба (преимущественно IgM) антитела,
часто анти-I
титр сыворотки (>1:1000 болезнь холодowymi
агглютинами)
- Элюат отр.
- Холодовой гемолизин: полож./отр.



ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА АУТОИММУННОЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ (ДИНА)



Формы лекарственной аутоиммунной гемолитической анемии (ДИНА)

Согласно клинической картине и патофизиологии:

1. Лекарственная АИГА
(лекарство прототип - α -метилдофа)
2. Внесосудистая лекарственная ИГА
(лекарство прототип - пенициллин)
3. Внутрисосудистая лекарственная ИГА
(“форма с образованием иммунных комплексов”)



Острая лекарственная внутрисосудистая ИГА “форма с образованием иммунных комплексов”

- Вызвана комплемент активирующими антителами направленными против неоантигенов
- В короткий период, активные компоненты либо метаболиты препарата вызывают сильную активацию комплемента приводящую к разрушению эритроцитов
- Достаточно низкой дозы препарата
- Самое раннее возникновение, на 6-ой день после первого приема препарата, в дальнейшем, при каждом случае превышения дозы препарата (последующие годы)



ДИНА с формированием иммунных комплексов - причины, клинические осложнения, результаты лабораторных тестов

- **Этиология:** неизвестна
- **Течение заболевания:** молниеносное
- **Патология:** показатели гемолиза ↑ ↑, бледность, желтуха, боли в спине, боли в животе, гемоглобинурия, нарушение функции почек, шок.
- **Прогноз:** плохой, летальность в пределах 20-40%



DIHA - Серология

- **НАГТ:** положительный только при наличии препарата и/или его метаболитов
- **ПАГТ:** анти-C3d положительный., иногда анти-IgG положительный.



ПАРОКСИЗМАЛЬНАЯ ХОЛОДОВАЯ ГЕМОГЛОБИНУРИЯ (РСН) АНТИТЕЛА ДОНАТА-ЛАНДШТЕЙНЕРА



РСН - причины, клинические осложнения, результаты лабораторных тестов

- **Этиология:** неизвестна, преимущественно затрагивает детей в возрасте от 2-х до 5 лет, после перенесенных вирусных инфекций (корь, ветряная оспа, ...)
- **Течение:** острое
- **Патология:** гематурия, серьезная анемия, часто после воздействия холодных температур
- **Прогноз:** очень хороший, обычно патология не прогрессирует

РСН - Патогенез

1. Эритроциты покрыты антителами в ответ на воздействие низких температур.
2. Комплемент - зависимый внутрисосудистый гемолиз при перегревании.

PAROXYSMAL COLD HEMOGLOBINURIA





РСН - Серология

➤ ПАГТ: анти-С3d полож.

➤ Двухфазные гемолизины

(тест Доната-Ландштейнера - антитела) специфичность

➤ анти-Р (\neq -Р1)

Образцы крови в острой фазе практически всегда гемолизированы.

Сыворотка и плазма должны быть отделены от форменных элементов при 37°C во избежание аутоадсорбции..