



IMMUNOHEMATOLOGY Knowledge Articles

Чувствительность и специфичность в непрямом антиглобулиновом тесте (НПАГТ)

**Какой порог установить и какой метод использовать?
Это вопрос с одним ответом или может быть несколько
вариантов?**

“Я хочу выявить как можно больше антител с потенциальной клинической значимостью, не обнаруживая при этом антител, которые практически не имеют клинического значения”.

Поиск наиболее подходящего НПАГТ среди всех существующих предложений может быть сложной задачей, поскольку различия между методами (в пробирке, гель и твердая фаза) и даже в рамках одного и того же метода могут наблюдаться в некоторых случаях. Существующие технологии соответствуют требованиям различных руководств (например обнаружение анти-D при 0,05 МЕ/мл ...) но достаточно ли этого, чтобы соответствовать приведенной выше цитате?


Даже если могут наблюдаться некоторые различия, в целом методы имеют схожие характеристики. Это подтверждается регулярно с помощью различных программ внешнего контроля качества (EQAS), в рамках которых слабые антитела в целом надежно обнаруживаются.

В этом контексте можно подчеркнуть, что при сравнении реагентов от разных поставщиков рекомендуется проводить прямое сравнительное исследование. Действительно, на результат такого исследования может повлиять выбранный метод обнаружения (предикат).

Как производитель, различные факторы, такие как раствор с низкой ионной силой (LISS), античеловеческий глобулин (AHG) ... могут быть выбраны и отрегулированы для достижения окончательного баланса между чувствительностью и специфичностью. Но как определить порог между чувствительностью и специфичностью “чтобы выявить как можно больше антител с потенциальной клинической значимостью, не обнаруживая при этом антител, которые практически не имеют клинического значения”..

Есть ли однозначный ответ на этот вопрос? Ответ, скорее всего, будет НЕТ, поскольку он зависит от различных факторов, которые могут быть индивидуальными (опыт, образование, рекомендации по переливанию крови или даже культура) и, что наиболее важно, факторов, связанных с пациентом.





Некоторые выберут метод обнаружения как можно большего количества антител, в том числе принадлежащих к категории “неспецифический фон” поскольку они могут представлять развивающиеся антитела, имеющие клиническое значение– ссылаясь на вебинар Shane Grimsley “*Антитела к эритроцитам. Клиническое значение или просто “Неспецифический фон”?*”

Эта ситуация может иметь серьезные последствия, такие как отказ от крови, что может быть более высоким риском, чем гемолитическая трансфузионная реакция (ГТР). Кроме того, такой подход часто может приводить к обнаружению антител от нулевой до низкой клинической значимости, что требует дополнительных исследовательских работ, исключая этого пациента из электронного выпуска и откладывая переливание крови.

Другие выберут метод, ориентированный на клинически значимые антитела с остаточным риском пропуска некоторых очень слабых форм антител и антител, не имеющих клинического значения или с незначительным клиническим значением (1).

Таким образом, на этот вопрос нет однозначного ответа, но при хорошем знании популяции пациентов, подлежащих тестированию, и правильном понимании используемых методов тестирования можно оптимизировать для обеспечения безопасного скрининга антител перед переливанием крови и антенатального периода.

В этом конкретном контексте мы настоящим делимся результатами расследования, которое мы провели на основе отчетов клиентов из Австралии.

¹ https://info.bio-rad.com/Antibody-Noise-Webinar-2020.html?WT.mc_id=200721028632

Мы получили несколько отчетов, в которых упоминалось, что у ID-DiaPanel наблюдалась более слабая реактивность (Id-n°: 45161) по сравнению с панелью эритроцитов локального производства (в отчете называется LPRP) для использования с LISS/Coombs ID-картами (Id-n°: 50531).

30 известных образцов использовалось в исследовании (см цифры с исходными данными для получения более подробной информации). Эта панель из 30 образцов представляет широкий спектр специфичности антител с диапазоном клинической значимости от низкой до высокой. Образцы были протестированы на ID-картах LISS/Coombs той же серии с использованием стандартного протокола непрямого антиглобулинового теста. Результаты выделенные **Зеленым** - согласующиеся (положительные реакции с антиген положительными эритроцитами), результаты **Красные** - не согласующиеся (отрицательные реакции с антигенположительными эритроцитами и **Синие** результаты - неожиданные реакции (положительные реакции с антиген отрицательными эритроцитами также называются “неспецифический фон”). Все испытания проводились ручным методом.

Рис. 1 Первичные данные с ID-DiaPanel

Sample	Specificity	ID-DiaPanel										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	anti-K	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-
2	anti-C	+	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
3	anti-E	-	-	+++	-	++	-	-	-	-	-	-
4	anti-M	-	-	++	+++	+++	+	++	+++	-	+	-
5	anti-Lea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	anti-Lea, anti-Leb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	anti-Leb	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-
8	anti-M	-	-	++	+++	+++	++	++	+	-	+	-
9	anti-M	-	-	+++	+++	+++	++	+++	++	-	++	-
10	anti-K	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
11	anti-M	-	-	++	+++	+++	+	++	+++	-	+	-
12	anti-M	-	-	++	++	++	-	++	+	-	+/-	-
13	anti-P1	+/-	-	++	++	+/-	-	-	+++	++	-	+
14	anti-E	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-
15	anti-E	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
16	anti-E	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
17	anti-Jka	+/-	+/-	+	-	-	-	+	+/-	+	-	+/-
18	anti-Jka	+	+	+	-	-	-	+	+/-	+	-	+
19	anti-Jka	+/-	-	++	-	-	-	++	-	+	-	-
20	anti-Fya	+/-	-	+	-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-
21	anti-Fya	++	-	++	-	++	++	-	-	++	-	-
22	anti-Fya	++	-	++	-	++	++	-	-	++	-	-
23	anti-D	-	+/-	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-
24	anti-D	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25	anti-D	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
26	anti-M	-	-	++	++	++	+	++	+/-	-	+/-	-
27	anti-K	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
28	anti-K	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
29	anti-K	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
30	anti-Lea, anti-Leb	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-

Из рис. 1, мы можем видеть, что антитела с отсутствующим или низким клиническим значением (anti-Le^a, anti-Le^b, anti-P₁) плохо обнаруживаются ID-DiaPanel что соответствует второй части цитаты “...не обнаруживая при этом антител, которые практически не имеют клинического значения”. Все клинически значимые антитела хорошо обнаруживаются и идентифицируются даже если слабые анти-Jk^a реагируют лучше с гомозиготными эритроцитами а 2 анти-D реагируют лучше с R0r и R₂R₂ эритроцитами по сравнению с R1R1

(вероятно, из-за ослабленной экспрессии D комплексом Ce, также называемом эффектом Цеппеллини).

Итак, наборы эритроцитов разработаны таким образом (количество эритроцитов с гомозиготной экспрессией антигенов к клинически значимым антителам, таким как общие антигены систем групп крови Rh, Duffy, Kidd, MNS), чтобы позволять обнаруживать и идентифицировать клинически значимые антитела, соответствующие первой части цитаты “...Я хочу выявлять как можно больше антител с потенциальным клиническим значением”

Кроме того, можно заметить, что не было никаких неспецифических реакций (также называемой «неспецифическим фоном») с ID-DiaPanel, что позволило избежать дополнительных работ и задержек в результате.

Рис. 2 Первичные данные с LPRP

Sample	Specificity	LPRP										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	anti-K	+/-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-
2	anti-C	++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
3	anti-E	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-
4	anti-M	++	+++	-	++	+/-	-	+++	+++	+/-	-	++
5	anti-Lea	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
6	anti-Lea, anti-Leb	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+/-
7	anti-Leb	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+/-
8	anti-M	+++	++	-	+++	-	-	+++	++	-	-	++
9	anti-M	+++	+++	-	+++	+/-	-	+++	+++	-	-	+++
10	anti-K	+/-	+++	+/-	-	+/-	-	-	++	-	-	-
11	anti-M	++	+++	-	+++	+/-	-	++	++	-	-	++
12	anti-M	++	++	+/-	++	-	-	++	++	-	-	++
13	anti-P1	+++	+++	++	+++	+	+	+/-	+	++	+/-	+
14	anti-E	-	-	-	+++	++	-	+++	-	-	-	-
15	anti-E	-	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-	-
16	anti-E	-	-	+/-	++	++	-	+	-	-	-	-
17	anti-Jka	++	-	-	+	+	+	-	++	++	++	-
18	anti-Jka	+	-	-	+	+	+	-	++	++	++	-
19	anti-Jka	++	-	-	++	++	+/-	-	+	+	+	+/-
20	anti-Fya	+/-	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	+
21	anti-Fya	+/-	++	++	++	+/-	++	-	-	-	-	++
22	anti-Fya	-	++	++	++	-	++	-	-	-	-	++
23	anti-D	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
24	anti-D	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
25	anti-D	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
26	anti-M	++	++	-	++	-	-	++	++	-	-	++
27	anti-K	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
28	anti-K	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
29	anti-K	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
30	anti-Lea, anti-Leb	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Из этих первичных данных мы можем заметить, что в целом сила реакции действительно немного выше по сравнению с ID-DiaPanel, но это сопровождается довольно многими неспецифическими реакциями (“неспецифический фон” **синий**).

Чтобы лучше понять влияние этих дополнительных реакций на способность каждой панели правильно определять специфичность антител, необработанные данные каждой панели были дополнительно проанализированы с помощью Интегрированного ПО для идентификации антител IH-A[®]ID (каталожный номер 12009844).

Для этого мы использовали следующие стандартные правила интерпретации: *Специфичность антител идентифицируется только в том случае, если плазма реагирует по крайней мере с двумя образцами эритроцитов, экспрессирующих антиген, и неактивна, по крайней мере, с двумя образцами эритроцитов, не содержащими антиген.* (2).

Каждый образец был отнесен к одной из следующих категорий, которым был присвоен балл. Положительная оценка означает, что определена правильная специфичность антитела (с дополнительной специфичностью или без нее), а отрицательная оценка означает, что правильная специфичность антитела не была идентифицирована (не поддается интерпретации или определена неправильная специфичность).

Рис. 3 Используемые классификации и баллы

Классификация	Баллы
Правильно, полное совпадение: определена специфичность AT, все клетки прореагировали	4
Правильно: специфичность антител идентифицирована, не все клетки прореагировали	3
Правильно, доп. AT: специфичность AT, идентифицирована, с возможными доп. AT	2
Частично правильно: Специфичность AT определена, но доп. AT не определены	1
Не правильно доп. AT: Специфичность AT не определена, но возможно доп. специфичность	-1
Не правильно: AT специфичность не правильная	-2
Не интерпретируется: не возможно идентифицировать AT специфичность	-3

* AT: антитела

Используя эту классификацию и баллы, ID-DiaPanel получила 69 баллов после анализа с IH-A[®]ID что значительно больше чем у LPRP - 39.



Обсуждение

Чувствительность и специфичность непрямого антиглобулинового теста (непрямой АГТ, какой порог следует установить и какой метод использовать? Это вопрос с одним ответом или может быть несколько вариантов? Как показывают результаты расследования, действительно нет однозначного ответа на этот вопрос. Более слабая реакция не означает, что продукт не сможет должным образом обнаружить и идентифицировать антитела, имеющие клиническое значение, а затем обеспечить безопасное переливание. С другой стороны, более сильная реакция не означает, что будет обеспечена более безопасная трансфузия, поскольку это может привести к дополнительному обследованию, задержке результатов и, в конечном итоге, к переливанию. Однако вариант дальнейшего повышения вероятности выявления «как можно большего количества антител с потенциальной клинической значимостью, при этом не обнаруживая антител с незначительным клиническим значением или без него» может заключаться в объединении обеих панелей. Начиная с одного, имеющего более высокую способность правильно определять специфичность антитела, который в конечном итоге можно комбинировать, в каждом конкретном случае, с тем, который демонстрирует более сильную реакцию.

В заключение, важно иметь хорошее знание популяции пациентов, подлежащих тестированию, и правильное понимание используемых методов, чтобы можно было оптимизировать тестирование для обеспечения безопасного скрининга и идентификации антител перед переливанием крови и во время беременности.

Arnaud Reggiani
Scientific Affairs Officer
April 22, 2021

1. The clinical significance of blood group antibodies. G. Daniels et al. Transfusion Medicine, 2002, 12, 287-295.
2. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. BCSH. 2012.