

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Teraźniejszość i przyszłość w badaniach immunologii transfuzjologicznej krwinek czerwonych

Pretransfusion red blood cell immunology testing; the present and the future

Bogumiła Michalewska*, Monika Pelc-Kłopotowska

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, Polska



INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 31.05.2013

Zaakceptowano: 02.07.2013

Dostępne online: 18.07.2013

Słowa kluczowe:

- grupy krwi
- próby zgodności
- antygeny
- alloprzeciwciała
- rekombinowane białka grup krwi

Keywords:

- Blood groups
- Crossmatch
- Antigen
- Alloantibody
- Recombinant blood group proteins

ABSTRACT

Over 100 years ago, shortly after the discovery of the ABO blood groups (Landsteiner, 1901) serological testing of blood compatibility between recipient and donor were introduced to the regular practice. The scope of pretransfusion testing expanded after the discovery of further blood groups. Apart from ABO and RhD conformity between recipient and blood donor a significant part of compatibility testing is the search for clinically relevant alloantibodies in recipient plasma and determination of their specificity if the patient is to receive relevant antigen negative blood. These studies are performed using a panel of human red blood cells specially selected for this purpose. The knowledge of the molecular basis of all DNA polymorphisms underlying the differentiation of red blood cell antigen allows to predict the blood group phenotype on the basis of DNA testing. This knowledge may also be used in the production of recombinant proteins of blood group antigens. In the cell cultures of prokaryotic and eukaryotic organisms multiple group antigens with protein structure have been obtained. In the future they could be used as reagents for tests based on the inhibition of the activity of antibodies to solid phase assays such as ELISA techniques, or protein-based microchips. Promising results have also been obtained using the recombinant proteins to identify antibodies against high frequency antigens. The increasing technological capabilities will allow in the future use of a single recombinant proteins of blood for a single step and direct identification of antibodies, the introduction of a test based on the technique of "one antigen per well". Such procedure would simplify and accelerate the determination of alloantibody specificity which at the moment is quite a time-consuming process. This would shorten the time for compatibility testing in the recipient in whom alloantibodies were found.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, ul. Chocimska 5, 00-796 Warszawa, Polska. Tel.: +48 22 3496 600 wew. 224.

Adres email: bmichalewska@ihit.waw.pl (B. Michalewska).

Kilka lat po odkryciu grup krwi ABO przez Landsteinerja w 1901 r. Ottenberg opisał wprowadzenie badania zgodności krwi polegające na oznaczeniu grupy ABO u biorcy i u dawcy oraz na inkubacji surowicy biorcy z krwinkami dawcy w temperaturze pokojowej [1]. Odczyt wyniku testu polegał na obserwacji wystąpienia aglutynacji lub hemolizy, które odczytywano jako reakcje dodatnie, oznaczające niezgodność krwi. Od tego czasu próby zgodności były stale modyfikowane, rozszerzano zakres badań lub, przeciwnie, upraszczano, eliminując zbędne postępowania, ale zasada zgodności w układzie ABO została zachowana [2-4].

W następnych latach odkrywano na powierzchni krwinek czerwonych kolejne antygeny grupowe, których obecnie wykryto ponad 300, oraz poznawano kliniczne znaczenie alloprzeciwciał do nich skierowanych. Okazało się, że u biorców pomimo przetoczenia krwi zgodnej w układzie ABO występowały powikłania hemolityczne, czasem nawet śmiertelne [5]. Za hemolizę odpowiedzialne były najczęściej przeciwciała z układów grupowych Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, rzadziej z innych układów grupowych. Przeciwciała te, klasy IgG, mogły być wykazane w reakcji *in vitro* dopiero po opisaniu testu antyglobulinowego w 1945 r. i przeprowadzeniu badań w 37°C [6]. Jego zasada oparta na wprowadzeniu do reakcji przeciwciał skierowanych przeciw ludzkim globulinom, a szczególnie przeciw IgG, pozwala na ujawnienie tych znaczących klinicznie alloprzeciwciał w postaci aglutynatów. Wykonywanie tego testu do poszukiwania przeciwciał IgG, nazywanych w serologii transfuzjologicznej „przeciwciałami niekompletnymi”, dotychczas nie zostało zastąpione żadnym innym testem. Ogromny postęp w technologii od tamtego czasu sprawił, że wykonanie testu antyglobulinowego jest dużo łatwiejsze, często zautomatyzowane, a jego czułość znacznie wyższa niż technika szkiełkowa, którą stosowano na początku. Do znanych nowoczesnych technik przeprowadzenia tego testu należą m.in.: techniki mikrokolumnowe (z żelom poliakrylamidowym lub z mini kulkami szklanymi), technika *capture* na mikropłytkach z antygenami krwinek unieruchomionymi w podłożu stałym czy technika z wykorzystaniem uprzednio namagnetyzowanych krwinek. Większość z nich jest stosowana również w pracowniach immunologii/serologii transfuzjologicznej w naszym kraju.

Obecnie w Polsce obowiązują przed przetoczeniem krwi następujące badania, których zadaniem jest zapewnienie zgodności serologicznej między biorcą i dawcą krwi: określenie grup krwi ABO i RhD u biorcy i dawców, przeglądowe badanie (*skrining*) na obecność przeciwciał odpornościowych w pośrednim teście antyglobulinowym (PTA) oraz próba krzyżowa (badanie surowicy biorcy z krwinkami dawcy) w PTA [7]. *Skrining* przeciwciał wykonuje się przy użyciu panelu ludzkich krwinek czerwonych specjalnie w tym celu dobranych.

Wiele krajów, np. Stany Zjednoczone, Wielka Brytania, Francja, Niemcy, Hiszpania dopuszcza wykonywanie skróconej próby zgodności i eliminuje z badań próbę krzyżową, jeśli u pacjenta w obecnej próbce i w przeszłości nie wykrywano odpornościowych przeciwciał. Taki sposób postępowania określa się jako *type and screen*. Należy jednak podkreślić, że większość laboratoriów wykonuje próby zgodności w systemach automatycznych. Ryzyko, że nie zostaną wykryte przeciwciała do antygenów występujących na

krwinkach przetoczonych, a których brak na krwinkach użytych do *skringu* jest bardzo małe, ok. 0,06%. Oceniono również, że przeciwciała te rzadko mają znaczenie kliniczne [8-10].

Dalszym udoskonaleniem postępowania w badaniach przedtransfuzyjnych dla pacjentów bez nieregularnych przeciwciał jest wprowadzenie w 90. latach ubiegłego wieku komputerowej próby zgodności. Zabezpieczenie przed wydaniem niezgodnej krwi w ABO do przetoczenia zawarte jest w oprogramowaniu komputera, w którym znajduje się historia oznaczeń ABO i RhD biorców i dawców. Próbkę pacjenta jest badana tylko w kierunku obecności przeciwciał i jeśli wynik jest ujemny, wówczas komputer wybiera krwinki odpowiedniego dawcy [11-13].

W USA taką procedurę dopuszcza FDA (*Food and Drug Administration*), jednak na początku XXI wieku <20% laboratoriów dużych szpitali wprowadziło komputerową próbę zgodności, ponieważ wymaga ona bardzo rozszerzonego, ściśle określonego procesu walidacji [14].

Spośród krajów Europy model komputerowej próby zgodności został zaakceptowany i zastosowany głównie w krajach skandynawskich, a szczególnie w Szwecji.

Dla około 1-3% biorców krwi wymienione procedury skróconej próby zgodności nie mogą być zastosowane z powodu obecności alloprzeciwciał lub autoprzeciwciał w osoczu. W przypadku ich wykrycia konieczne jest ustalenie swoistości alloprzeciwciał, aby chory otrzymał krew niezawierającą niezgodnego antygeny. Dla tej grupy pacjentów, a szczególnie jeśli alloprzeciwciała są skierowane do kilku antygenów (przeciwciała wieloswoiste) lub do antygeny występującego z wysoką częstością (>99%), tzw. antygeny powszechnego, rozważane jest lub już wprowadzono genotypowanie dawców. Użycie tej metody jest podyktowane brakiem lub ograniczoną dostępnością serologicznych odczynników do fenotypowania dawców, głównie antygenów powszechnych, ponieważ są to najczęściej surowice pozyskiwane od zimmunizowanych pacjentów (kobiet zimmunizowanych ciążą lub od osób, które wytworzyły ten typ przeciwciał po transfuzji).

Transfusion Medicine and Hemotherapy przedstawiło opinie kilku ośrodków w związku z pytaniem: „czy genotypowanie zastąpi serologię w rutynowych badaniach grup krwi w przyszłości?” Między innymi Van der Schoot z Holandii wypowiedziała się za genotypowym określeniem zgodności między biorcą i dawcą krwi, zastrzegając jednak, że aby uniknąć ciężkich hemolitycznych powikłań oznaczenie grupy ABO powinno być wykonywane metodą serologiczną ze względu na złożoność genów i ryzyko nierozpoznania u pacjentów alleli *null* w tym układzie. Wszyscy uczestnicy byli zgodni, że genotypowanie na pewno będzie bardzo przydatne w typowaniu dawców na obecność antygenów powszechnych, w celu poszerzenia bazy dawców z rzadkim fenotypem [15-18].

Grupy naukowców prowadzą również prace nad zastosowaniem metod biologii molekularnej do praktyki badań przedtransfuzyjnych na poziomie rekombinowanych białek antygenów [19, 20].

Ich zastosowanie do wykrywania i identyfikowania przeciwciał zastąpiłoby używanie w tym celu ludzkich krwinek. Wiele białek grup krwi otrzymano już tą metodą w hodowli

komórek organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Rekombinowane antygeny mogą być wykorzystane w przyszłości jako odczynniki do testów opartych na hamowaniu aktywności przeciwciał, do testów w fazie stałej, jak np. ELISA, lub w technikach opartych na mikrochipach białkowych. Trwają prace nad wprowadzeniem testu do wykrywania alloprzeciwciał z zastosowaniem czerwonych polistyrenowych kulek opłaszczonych rekombinowanymi białkami grup krwi. Obiecujące wyniki z zastosowaniem rekombinowanych białek grup krwi otrzymano również do identyfikowania przeciwciał skierowanych do antygenów powszechnych. Coraz większe możliwości technologiczne pozwolą w przyszłości na użycie pojedynczych rekombinowanych białek grup krwi do tzw. jednostopniowej identyfikacji przeciwciał, czyli wprowadzenia testu opartego na technice „jeden dołek – jeden antygen”. Procedura taka znacznie uprości i przyspieszy proces ustalania swoistości alloprzeciwciał, który na razie jest bardzo czasochłonny, a tym samym skróci czas wykonania próby zgodności u biorcy, u którego wykryto alloprzeciwciała. Badacze ci zapowiadają koniec epoki aglutynacji jako „złotego standardu” w badaniu antygenów i przeciwciał, która trwa od ponad 100 lat.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Ottenberg R. Transfusion and arteria anastomosis. *Ann Surg* 1908;47:486.
- [2] Oberman HA. The crossmatch. A brief historical perspective. *Transfusion* 1981;21:645–651.
- [3] Oberman HA. The present and future crossmatch. *Transfusion* 1992;32:794–796.
- [4] Beck ML, Tilzer LL. Red cell compatibility testing: A perspective for the future. *Transfusion Medicine Reviews* 1996;10:118–130.
- [5] De Gowin EI, Baldrige CW. Fatal anuria following blood transfusion. Inadequacy of present tests for compatibility. *Am J Med Sci* 1934;188:555.
- [6] Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and “incomplete” Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol* 1945;26:255.
- [7] Łętowska M, red. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Wydanie II. Warszawa: Instytut Hematologii i Transfuzjologii; 2011.
- [8] Oberman HA, Barnes BA, Friedman BA. The risk of abbreviating the major crossmatch in urgent or massive transfusion. *Transfusion* 1978;18:137–141.
- [9] Walker RH. Is a crossmatch using the indirect antiglobulin test necessary for patients with a negative antibody screen. W: Polesky HF, Walker RH, reds. *Safety in Transfusion Practices*. Skokie, IL: College of American Pathologists; 1982.
- [10] Garraty G. How concerned should we be about missing antibodies to low incidence antigens? *Transfusion* 2003;43:844–847.
- [11] Chapman JF, Milkins C, Voak D. The computer crossmatch: a safe alternative to the serological crossmatch. *Transfus Med* 2000;10:251–256.
- [12] Judd WJ. Commentary: testing for unexpected red cell antibodies- two or three reagent red cell samples? *Immunohematology* 1997;13:90–93.
- [13] Brooks JP, Fletcher CH. ABO rechecking should be performed in the same institution as computer crossmatch. *Transfusion* 2013;53:465–466.
- [14] FDA. Guidance for industry: “Computer Crossmatch”. (computerized analysis of the compatibility between the donor's cell type and the recipient's serum or plasma type).
- [15] Wagner FF. Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? Opinion 1. *Transfus Med Hemother* 2009;36:226–227.
- [16] Hustinx H, Fontana S, Gowland P, Niederhauser C Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? Opinion 2. *Transfus Med Hemother* 2009;36:228–229.
- [17] Storry JR, Olsson ML. Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? Opinion 4. *Transfus Med Hemother* 2009;36:232–233.
- [18] Van der Schoot CE, Veldhuisen B, De Haas M. Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? Opinion 5. *Transfus Med Hemother* 2009;36:234–235.
- [19] Seltsam A, Gröger D, Blasczyk R. Prokaryotic versus eukaryotic recombinant Lutheran blood group protein for antibody identification. *Transfusion* 2007;47:1630–1636.
- [20] Seltsam A, Blasczyk R. Recombinant blood group proteins for use in antibody screening and identification tests. *Curr Opin Hematol* 2009;16:473–479.