

612.1  
499

UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"NICOLAE TESTEMIȚANU"  
CENTRUL NAȚIONAL DE TRANSFUZIE A SÂNGELUI

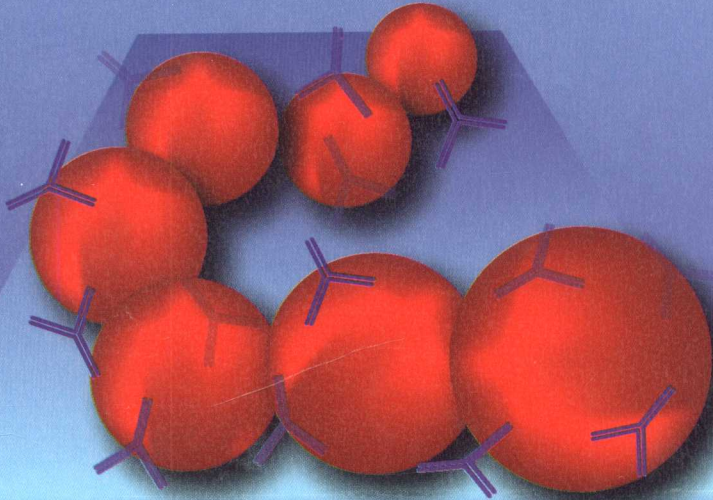
LUCIA ANDRIEȘ

SVETLANA CEBOTARI

OLGA CERNEȚCHI

LARISA CATRINICI

# IZOIMUNOLOGIA ÎN TEORIA ȘI PRACTICA CONTEMPORANĂ (COMPENDIU)



Chișinău • 2007

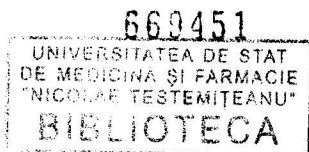
647  
100

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA  
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
NICOLAE TESTEMIȚANU  
CENTRUL NAȚIONAL DE TRANSFUZIE A SÂNGELUI

LUCIA ANDRIEȘ  
OLGA CERNEȚCHI

SVETLANA CEBOTARI  
LARISA CATRINICI

**IZOIMUNOLOGIA ÎN TEORIA ȘI  
PRACTICA CONTEMPORANĂ**  
(compendiu)



Centrul Editorial-Poligrafic *Medicina*  
Chișinău • 2007

**CZU: 612.017:616-097(075.8)**

**Aprobat de Consiliul de Experți Metodic Central al USMF  
Nicolae Testemițanu  
Proces-verbal nr. 3 din 19.04.2007**

**Autori:** Lucia ANDRIEȘ, Olga CERNEȚCHI, Svetlana CEBOTARI,  
Larisa CATRINICI

**Redactor:** Valentina SĂRBU

**Referenți:** V. Niguleanu, șeful Catedrei Diagnostic de Laborator Clinic al USMF  
"Nicolae Testemițanu", d.h.ș.m., profesor universitar;  
S. Ghinda, șeful Laboratorului Imunologie și Imunochimie al Institutului  
de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, d.h.ș.m, profesor cercetător,

*Prezenta ediție este consacrată unor aspecte mai puțin mediatizate, dar absolut necesare specialiștilor laboratoarelor clinico-diagnostice, care se confruntă cu necesitatea de a realiza teste din ce în ce mai subtile nu doar asupra mostrelor de sânge, ci și asupra diferitor secreții umane. Aceste exigențe impun ca medicii să se afile în posesia unor cunoștințe exhaustive despre grupele sanguine, despre rolul izoantigenelor și izoanticorpilor în normă și în substratul cauzativ al diferitor patologii. Compendiul prezentat opiniei medicale a înglobat un vast material de cercetare și definire a specificităților antigenice de grup în diferite celule și țesuturi atât în substratele normale, cât și în diverse maladii, când variațiile și aberațiile acestor caractere sanguine devin sugestive pentru diagnosticul și tratamentul adecvat al alterărilor produse.*

**Descrierea CIP a camerei Naționale a Cărții**

Izoimunologia în teoria și practica contemporană: (compendiu) /  
Lucia Andrieș, Olga Cernetechi, Svetlana Cebotari, Larisa Catrinici;  
Univ. de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Centrul  
Naț. de Transfuzie a Sîngelui. - Ch. : CEP "Medicina",

Bibliogr. p. 179 (12 tit.)

ISBN 978 - 9975-918-79-4

100 ex.

612.017:616-097(075.8)

© L. Andrieș, O. Cernetechi ș. a., 2007  
© CEP Medicina, 2007

**ISBN 978-9975-918-79-4**

## S U M A R

<b>CAPITOLUL I.</b>	Caracteristica generală a izoantigenelor și izoanticorpilor.....	6
<b>CAPITOLUL II.</b>	Genetica grupelor sanguine.....	17
<b>CAPITOLUL III.</b>	Interacțiunea antigenelor eritrocitare cu anticorpilor. Metodele de testare (principii).....	30
<b>CAPITOLUL IV.</b>	Antigenele eritrocitare ale sistemului AB0 și caracteristica anticorpilor acestui sistem .....	45
<b>CAPITOLUL V.</b>	Sistemul antigenic eritrocitar Rhesus.....	68
<b>CAPITOLUL VI.</b>	Alte sisteme antigenice eritrocitare .....	83
<b>CAPITOLUL VII.</b>	Sistemul antigenic leucotisular.....	112
<b>CAPITOLUL VIII.</b>	Sistemul antigenic granulocitar și trombocitar ..	131
<b>CAPITOLUL IX.</b>	Algoritme pentru diagnosticul de laborator al complicațiilor posttransfuzionale și al bolii hemolitice a nou-născutului .....	134
<b>Anexe:</b>		
•	Instrucțiune pentru determinarea grupului sanguin AB0 .....	150
•	Instrucțiune pentru determinarea factorului Rhesus .....	163
•	Instrucțiune pentru determinarea anticorpilor imuni după sistemul AB0 .....	171
•	Instrucțiune pentru determinarea anticorpilor anti-Rhesus în serul uman.....	175
<b>Bibliografie</b> .....		179

## SIMBOLURI ȘI ABREVIERI

- AAIH** – anemia autoimună hemolitică
- Ac** – anticorpi
- Ag** – antigene
- C** – complementul
- C 3** – componentul 3 al complementului
- C 3d** – fragment al componentei 3 a complementului
- C 3dg** – fragment al componentei 3 a complementului
- C 4** – componentul 4 al complementului
- CPT** – complicații posttransfuzionale
- DTT** – ditiotreitol
- Fab** – fragmentul Ig care interacționează cu epitopii Ag  
(fragment antigen binding)
- Fc** – fragmentul imunoglobulinic cristalizabil
- Ig** – imunoglobuline
- IgA** – imunoglobulină de clasa A
- IgG** – imunoglobulină de clasa G
- IgM** – imunoglobulină de clasa M
- ISBT** – Internationale Society Blood Transfusion
- MHNN** – maladia hemolitică a nou-născutului
- MM** – masă moleculară
- RPT** – reacții posttransfuzionale
- SAG** – ser antiglobulinic
- TAG** – testul antiglobulinic
- TAD** – testul antiglobulinic direct
- TAI** – testul antiglobulinic indirect

## DIN PARTEA AUTORILOR

*Izoimunologia, supranumită adesea știința despre grupele sanguine, este un compartiment al imunologiei generale ce are drept obiect de studiu izoantigenele și izoanticorpii în normă și patologie. Cunoscuta și uzuala ei apreciere, însă, nu reflectă plenar fenomenele vitale pe care le înglobează acest compartiment, deoarece diferențierea antigenică a organismului nu se limitează nici pe departe doar la elementele sanguine propriu-zise, acest proces complex interesează integral organismul, toate țesuturile, diferitele umori și secrete ale acestuia: saliva, sucii gastrici, lichidul amniotic etc.*

*Studiul izoantigenelor și izoanticorpilor are o importanță primordială în hematologie și transfuziologie, precum este indiscutabilă valoarea acestui compartiment în obstetrică, pediatrie, chirurgie, medicina primară și legală, oncologie, transplantologie etc.*

*Progresele impetuoase în acest domeniu de cunoaștere au fost marcate de acumularea rapidă a datelor despre caracterul chimic al antigenelor eritrocitare, leucocitare, trombocitare, despre structura genelor care le codifică producția, despre modificarea acestora în contextul diverselor patologii, iar acestea au sugerat elaborarea de noi metode performante în testarea grupelor sanguine și noi viziuni de interpretare clinică a rezultatelor cercetărilor izoimunologice.*

*Elaborarea clasamentului internațional al izoantigenelor cu specificarea variantelor antigenice argumentează necesitatea unificării principiilor de specificare nominală și funcțională a acestora, deoarece este tot mai evident că antigenele celulelor sanguine dețin și prestează o gamă extrem de diversă de funcții care se prezintă de interes pentru medicii clinicieni și specialiștii din laboratoarele clinico – diagnostice și de referință.*

*Prin prezenta lucrare am dorit să oferim medicilor, studenților, rezidenților și tuturor celor ce doresc să cunoască acest domeniu un bloc valoros de cunoștințe indispensabile funcțiilor și menirii profesionale a acestora.*

## CARACTERISTICA GENERALĂ A IZOANTIGENELOR ȘI IZOANTICORPILOR

Termenul *antigen* a fost folosit primar de către L. Deutsch în anul 1899, prin el fiind concepută orice substanță recunoscută a fi străină pentru organism și deci capabilă să declanșeze reacții imune specifice și să reacționeze cu produsele acestor reacții, respectiv cu anticorpul. Antigenele (Ag) care posedă aceste atribute majore au fost denumite „*antigene complete*”. Toate antigenele de grup se pot încadra în această categorie, deoarece celulele sistemului limfoid secretă anticorpi (Ac) față de acești Ag. Alte antigene nu induc sinteza de Ac *in vivo*, dar pot reacționa *in vitro* cu anticorpii secretați la antigenele cu grupări specifice comune. Aceste Ag au fost denumite „*antigene incomplete*” sau *haptene*.

Molecula antigenică constă din partea „*purtătoare*” și din grupări antigenice (epitopi) – arii mici situate obligatoriu la suprafața ei și care conferă specificitate antigenică moleculei. Funcția de epitop este realizată de diverse combinații aminoacide (Ag proteice), glucidice (Ag complexe) etc. O moleculă antigenică poate conține una sau câteva determinante antigenice. Proprietatea antigenelor de a interacționa cu anticorpii specifici este datorată epitopilor, care asigură reacția antigenelor și a anticorpilor *in vivo* și *in vitro*.

Proteinele organismului în unele împrejurări pot obține epitopi artificiali (substanțe chimice, medicamentoase etc), care le conferă o specificitate antigenică nouă. În cadrul afecțiunilor imunohepatologice se constituie hipersensibilitatea de tipul II (după Gell și Coombs), care semnifică apariția autoanticorpilor citotoxici, activarea complementului, dirijată asupra proprioelementelor sanguine ale organismului – eritrocite, leucocite, trombocite.

Antigenele elementelor sanguine dețin o serie de funcții vitale: mențin integritatea structurilor membranei celulare, participă la transportul substanțelor în celulă, sunt receptori pentru liganzii exogeni, virioni, bacterii, helminți, realizează adeziunea diferitor molecule etc.

Stroma eritrocitelor conține un număr major de Ag, cum ar fi cele prezentate de:

- *Ag heterofile* – comune mamiferilor, reptilelor, peștilor, bacteriilor și chiar, unor plante (de exemplu, antigenul Forssmann identificat în hematiile de oaie, rinichii cobailor, la shigele, salmonele etc);
- *Ag cu specificitate de specie* (eritrocitare, leucocitare, imunoglobulinice etc. care se diferă de cele existente la nivelul organelor, celulelor sau moleculelor analogice ale altor specii), comună tuturor membrilor speciei respective;
- *Ag cu specificitate de grup*, caracteristică numai unor grupe de indivizi și nu tuturor membrilor speciei. Analizând de exemplu antigenele eritrocitare, acestea ar fi prezentate de substanțe specifice de grup A, B, RH etc.

Grupele sanguine sunt divizate în sisteme. Un sistem de grup sanguin constituie mai mulți factori antigenici eritrocitari, caracterizând fenotipul individului, fiecare fiind expresia biochimică a unui caracter ereditar, reprezentat de o genă din cele 23 perechi de cromozomi. Un factor de grup este obligativ guvernat genetic, fiind o caracteristică constituțională și inerentă unui anume individ, care în condiții de normă nu se modifică pe tot parcursul vieții. Expresia imunologică a unor Ag de grup nu se finisează decât după naștere, ceea ce condiționează mai multe dificultăți în testarea Ag la nou-născuți, în special la cei prematuri. Diminuarea caracterelor antigenice se poate remarca și la persoanele vârstnice. Pe fondul diferitor maladii (infecții virale sau bacteriene, tumori maligne etc.) s-a observat dispariția unor antigene de grup (A, I) și apariția altor noi Ag adoptive (T- și B-analogice).

Expresivitatea antigenică a aglutinogenelor A și B se poate modifica la administrarea remediilor hormonale și la gravide.

Diferențierea antigenică biochimică în cadrul speciei este caracteristică nu numai organismului uman. Fiind un fenomen de caracter biologic, el se înregistrează și la alte specii, ceea ce sugerează dezvoltarea lor continuă și crearea de multiple specificități antigenice. Cauza apariției și dezvoltării criteriilor antigenice ale speciei sunt factorii mediului ambiant. Sub influența lor apar diferite structuri antigenice, care prin moștenire se transmit descendenților.

Amplasarea Ag de grup pe suprafața eritrocitului este neuniformă. Unele antigene sunt situate în stroma eritrocitară, altele se poziționează mai superficial. Imunogenitatea Ag este diversă și depinde de natura lui, de apar-



nența de specie, gradul de non-propriu și de reactivitatea individului, căruia i se inoculează acest Ag. Organismul poate să producă Ac numai la Ag care au specificități antigenice absente lui. Ag proprii nu sunt capabile să inducă sinteza de anticorpi, acest fenomen fiind posibil doar la modificarea lor.

Antigenele eritrocitare sunt de 3 categorii: de sistem, de colecție și din serii antigenice. Conform Nomenclatorului de Antigene Eritrocitare (tab.1), elaborat de Societatea Internațională de Transfuzie a Sângelui (ISBT, 1980), sistemele antigenice au fost codificate cu 3 cifre în ordinea descoperirii acestora (001-029), iar fiecare antigen se consemnează cu 6 cifre: primele 3 indică numărul sistemului antigenic, iar celelalte 3 cifre specifică numărul de ordine în sistemul corespunzător (de exemplu, antigenul D-004001; antigenul E-004005, etc). Specificarea antigenelor prin cifre nu anulează utilizarea simbolurilor cu litere. Conform clasificăției ISBT antigenul H nu mai aparține sistemului AB0, ci prezintă un sistem separat (018).

Antigenele sistemului Auberger au fost unificate cu cele încadrate de sistemul Lutheran. Specificațiile antigenice Wright sunt incluse în sistemul Diego. Sistemul antigenic P este prezentat de un singur antigen P<sub>1</sub>.

Tabelul 1

**Sistemele de antigene eritrocitare (ISBT, 1980)**

<b>Codul sistemului</b>	<b>Denumirea sistemului</b>	<b>ISBT, simbolul sistemului</b>	<b>Denumirea genei și ancorarea ei pe cromozom</b>	<b>Numărul de antigene în sistem</b>
1	2	3	4	5
001	AB0	AB0	<i>AB0</i> 9q34.1-q34.2	4
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i> 4q28-q31	43
003	P	P1	<i>P1</i> 22q11.2-qter	1
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i> 1p36.2-p34	48
005	Lutheran	LU	<i>LU</i> 19q12-q13	19
006	Kell	KEL	<i>KEL</i> 7q33	24
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i> 19p33	6
008	Duffy	FY	<i>FY</i> 1q22-q23	6

1	2	3	4	5
009	Kidd	JK	JK 18q11-q12	3
010	Diego	DI	AE1 17q12-q21	21
011	Yt (Cartwright)	YT	ACHE 7q22	2
012	Xg	XG	XG Xp22.32	1
013	Scianna	SC	SC 1p36.2-p22	4
014	Dombrock	DO	DO Nu se cunoaște	5
015	Colton	CO	AQP1 7p14	3
016	Landsteiner-Wiener	LW	LW 19p13.2- cen	3
017	Chido-Rodgers	CH/RG	C4A, C4B 6p21.3	7
018	Hh	H	FUT1 19q13	1
019	Kx	XK	XK Xp21.1	1
020	Gerbich	GE	GYPC 2q14-q21	7
021	Cromer	CROM	DAF 1q32	11
022	Knops	KN	CR1 1q32	8
023	Indian	IN	CD44 11p13	2
024	Ok	OK		1
025	Raph	RAPH		1
026	JMH (John Milton Hagen)	JMH		1
027	I	I		1
028	Globoside	GLOB		1
029	GIL	GIL		1

Aceste permutări în clasificarea antigenică au fost efectuate în baza studiului genelor ce codifică producția de antigene datorită comunității genelor care controlează sinteza antigenelor – criteriul de principiu ce unește antige-

nele în sisteme. La permutarea antigenului dintr-un sistem în altul numărul de ordine precedent rămâne liber și se completează cu datele altui antigen. De aceea la numerotarea antigenelor în sistem pot fi și locuri necompletate.

Colecția antigenică (*tab. 2*) conține antigene care biochimic și serologic aparțin fenotipului, dar nu corespund cerințelor de comunitate a genelor ce codifică sinteza lor. Colecțiile sunt specificate prin simboluri literale sau numere (205–210).

*Tabelul 2*

**Colecțiile de antigene eritrocitare (ISBT, 1980) și  
frecvența de înregistrare**

Colecția			Antigenele		
nr.	denumirea	simbolul	nr.	simbolul	frecvența, %
205	Cost	COST	205001	Cs <sup>a</sup>	95
			205002	Cs <sup>b</sup>	34
207	li	I	207002	I	Rar
208	Er	ER	208001	Er <sup>a</sup>	>99
			208002	Er <sup>b</sup>	<1
209		CLOB	209002	p <sup>t</sup>	Rar
			209003	Luke	98
210	n-are denumire		210001	Le <sup>c</sup>	1
			210002	Le <sup>d</sup>	6

Seriile antigenice (*tab. 3–4*) includ antigene, pentru care n-au fost studiate genele ce le codifică și sunt prezentate de 2 grupe după frecvența lor de înregistrare: minoră (700) și majoră (901).

*Tabelul 3*

**Seriile de antigene eritrocitare cu frecvență minoră  
de înregistrare (700)**

Numărul antigenului	Simbolul	Numărul antigenului	Simbolul	Numărul antigenului	Simbolul
700002	By	700021	Je <sup>a</sup>	700047	JONES
700003	Chr <sup>a</sup>	700028	Li <sup>a</sup>	700049	HJK
700005	Bi	700039	Milne	700050	HOFM
700006	Bx <sup>a</sup>	700040	RASM	700052	SARA
700017	To <sup>a</sup>	700043	OI <sup>a</sup>	700054	REIT
700018	Pt <sup>a</sup>	700044	JFV		
700019	Re <sup>a</sup>	700045	Kg		

**Seriile de antigene eritrocitare cu frecvență majoră  
de înregistrare (901)**

Numărul antigenului	Simbolul	Numărul antigenului	Simbolul	Numărul antigenului	Simbolul
901001	Vel	901008	Emm	901014	PEL
901002	Lan	901009	AnWj	901015	ABTI
901003	At*	901012	Sd*	901016	MAM
901005	Jr*	901013	Duclos		

ISBT a stabilit și regulile de semnificare a fenotipului (antigenii prezenți sau absenți la un anumit individ). La descrierea fenotipului antigenii sunt semnificați cu semnul "+" sau "-", care se înscrie după abrevierea cu litera antigenului testat la acest individ. De exemplu: C+; E- (antigenul C este prezent, iar antigenul E este absent). Pentru antigenii cu varietăți specifice prezența sau absența lor se va nota în paranteze după semnificarea antigenului: Fy (a-); Fy (b+), Jk (a-) etc.

În cazul când fenotipul este semnat prin număr, la un rezultat pozitiv semnul "+" nu se indică (K:1), iar în cazul testării negative semnul "-" se va înscrie înainte de numărul antigenului (K:-1). Dacă se utilizează serii de seruri cu diferită specificitate, rezultatul testării se va indica prin virgulă (Le:-1, 2). Eritrocitele testate numai cu un ser se vor semnifica, de exemplu, K+ sau K-. Cele cercetate cu două seruri anti-K și anti-k pot fi semnificate ca: K+k+; K+k-; sau K-k-. Nu se admit notificări după rezultatele negative ale testării cu un ser anti-K, de exemplu, hematiile sunt "kk". Exemplele de semnificare corectă și incorectă sunt elucidate în tab. 5.

Tabelul 5

**Exemple de consemnare corectă și incorectă a fenotipurilor**

Notificarea exactă	Consemnare incorectă
Fy (a+) sau FY:1	Fy <sup>a+</sup> ; Fy <sup>(a+)</sup> ; Fy <sup>a+</sup> ; Duffy <sup>a+</sup> ; Duffy-pozitiv
RH:-1; 2; -3; 4; 5 sau D-, C+, E-, c+, e+	RH:1-, 2+, 3-, 4+, 5+;

Genotipul grupei sanguine reprezintă interpretarea fenotipului eritrocitelor individului dat, iar tiparea genetică necesită investigații familiale.

Izoantigenele hematiilor sunt de diferită frecvență de înregistrare, proprietate care condiționează apariția Ac specifici și posibilitatea reacțiilor și complicațiilor posttransfuzionale. Ag cu frecvență majoră de înregistrare (de exemplu Lu<sup>b</sup>, Kp<sup>b</sup> etc.) se întâlnesc practic la toți indivizii (>99%) și astfel secreția de Ac anti-aceste Ag este un fenomen rar, dar care complică selecția sângelui compatibil pentru hemotransfuzii în cazul prezenței Ac.

Antigenele rar înregistrate constituie circa 1%, iar alosensibilizarea către aceștia generează dificultăți esențiale în testarea acestor anticorpi cu panelul ce conține un număr major de mostre test-eritrocitare.

*Izoanticorpii* (anticorpii de grup sanguin) sunt proteine serice sau plasmactice și au drept suport proteic cele trei clase de imunoglobuline – IgM, IgG și IgA. Structura primară a acestor imunoglobuline constituie 2 lanțuri polipeptidice: unul cu MM mai mare (numit greu) de tipul  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ , care conferă moleculei specificitate antigenică și unul cu MM mică – L (numit ușor) de tipul k sau  $\lambda$ . Situsul combinativ al moleculei este format din fragmente variabile ale lanțurilor grele și ușoare care interacționează cu epitopii moleculelor antigenice atât *in vivo*, cât și *in vitro* în diverse reacții imunologice.

După mecanismul de apariție Ac de grup se divid în 2 categorii: *naturali* cu aparența spontană în ser, care reprezintă o caracteristică importantă a grupelor sanguine (anti-A, anti-B) și anticorpi *dobândiți*, care se produc în rezultatul unui stimul antigenic. Specificitatea Ac naturali de grup este mult mai expresivă decât cea a Ac imuni.

Anticorpii de grup ABO se atestă în formă liberă în plasmă sau ser și se cunosc sub denumirea de aglutinine naturale anti-A și anti-B, reprezentând Ac *regolari*, pe când cei din celelalte sisteme sanguine nu apar în mod spontan, ci numai după un stimul antigenic la izoimunizare și se numesc Ac *iregulari* (cu unele mici excepții).

Anticorpii de grup pot fi de tip complet, incomplet și așa-numitele crip-taglutinoide.

Anticorpii de tip *complet* sunt cei care produc aglutinarea Ag atât în mediul salin (soluție fiziologică), cât și în mediu albuminos (ser uman sau albumină bovină). Ei sunt termolabili, se neutralizează de respectivele Ag solubile, pot fi de origine naturală (anti-A, anti-B) sau dobândiți după o imunizare recentă.

Anticorpii de tip *incomplet* produc aglutinarea în mediul albuminos și nu în cel salin, sunt termostabili și nu neutralizează Ag solubile. Ei se fixează pe

suprafața eritrocitelor, asigurând fenomenul de blocare ce stă la bază testului antiglobulinic (Coombs). Asemenea Ac apar după imunizări repetate.

Anticorprii de tip criptaglutinoid reprezintă o categorie de Ac incompleți care nu induc aglutinarea nici în mediul salin și nici în cel albuminos. Pot fi apreciați cu ajutorul testului antiglobulinic Coombs, fiind fixați pe suprafața eritrocitelor; sunt termostabili, nu se neutralizează de Ag solubile, apar la hiperimunizare.

*Amplitudinea termică a anticorpilor.* Anticorprii de tip complet și naturali (aglutininele anti-A și anti-B) acționează atât la cald, cât și la rece. Produc aglutinări în intervalul termic  $+4^{\circ}\text{C}$  -  $+37^{\circ}\text{C}$ , adică au o amplitudine termică mare.

*Anticorprii la cald* sunt prezentați de Ac incompleți și criptaglutinoide, au temperatura optimă de acțiune între  $20^{\circ}\text{C}$  și  $37^{\circ}\text{C}$  și sunt denumiți Ac cu amplitudine termică mică.

*Anticorprii la rece* sunt reprezentați de imunoglobulinele anti-M și anti-N, active la  $+4^{\circ}\text{C}$  și testate la rece (incubare la frigider).

Unii anticorpi din sistemul Lewis acționează numai sub temperatura de  $+20^{\circ}\text{C}$ , de vreme ce anticorprii anti-P sunt activi exclusiv la  $0^{\circ}\text{C}$ , de unde și modalitatea de testare a lor în tuburi ținute în apă cu gheață și au o amplitudine termică nulă.

Aglutininele naturale anti-A și anti-B nu sunt prezente la naștere, ele apar la copil într-un titru slab și ating concentrații maxime între 5 și 10 ani. Geneza acestor Ac ar fi fie o imunizare neobservată, repetată multiplu cu Ag care conțin o structură chimică identică cu a factorilor de grup A sau B, fie produse ale genelor respective. Anticorprii de tip IgM asigură suportul proteic al Ac de grup anti-A și anti-B, se găsesc în serul indivizilor la care lipsește Ag respectiv, fiind o caracteristică serică de grup în sistemul AB0, au caracter natural și regulat grație prezenței lor constante. La unii indivizi în ser se întâlnesc în procentaje minime Ac naturali anti-M, -N, -Lewis etc. Circa 5% din persoanele Le (a-) comportă Ac anti-Le (a), numiți iregulari. Anticorprii de tip IgM nu traversează bariera placentară având MM mare și în consecință ei nu prezintă un pericol în evoluția unei sarcini fetο-materne incompatibile. Aceștia din urmă sunt Ac de tip complet, termolabili, se neutralizează de substanța specifică de grup și acționează în mediul salin.

Grație structurii pentamere cu 10 situsuri combinate Ac naturali anti-A și anti-B sunt capabili să lege o cantitate majoră de hematii și induc

aglutinarea directă în mediul salin. Această particularitate a anticorpilor naturali este utilizată la prepararea serurilor standard pentru testarea Ag eritrocitare ale sistemului AB0.

Cele mai reprezentative caractere ale diferitor tipuri de Ac sunt elucideate în tab. 6.

Tabelul 6

**Specificitățile caracteristice diferitor tipuri de anticorpi**

Tipul de Ac Specificități	Compleți	Incompleți	Criptaglutinoide
Afișarea în timp	Răspuns primar, apariție recentă	Răspuns secundar, stimulențe repetate	Stimulențe multiple, caracter hiperimun
Comportarea în mediul salin	Aglutinare	Absența aglutinării	Absența aglutinării
Comportarea în mediul albuminos	Aglutinare	Aglutinare	Absența aglutinării
Testele cu enzime proteolitice (papaină)	Aglutinare	Aglutinare	Aglutinare
Testul Coombs	Nu se aplică	Aglutinare	Aglutinare
Rezistența termică	Termolabili	Termostabili	Termostabili
Neutralizarea cu antigenul solubil	Neutralizare	Nu se neutralizează	Nu se neutralizează
Optima termică	+4°C	+37°C	+37°C
Greutatea moleculară	900 000 D	150 000 D	150 000 D
Suportul proteic	IgM	IgG	IgG
Traversarea transplacentară	Nu trec	Trec	Trec

Anticorpii de tip IgM apar la un răspuns imun primar după stimularea antigenică. La repetarea stimulului antigenic IgM dispar, fiind substituie rapid de Ac IgG. Astfel apar izoanticorpi de tip hiperimun care manifestă caracterele unor Ac incompleți ce acționează în mediul albuminos, ei sunt termostabili și nu se neutralizează de către substanța solubilă specifică de grup. Aceștia traversează ușor placenta, provocând boală hemolitică a nou-născutului, dar sunt Ac de caracter iregular. Sunt produse ale acțiunii poligenice a substanțelor grupospecifice asupra organismului uman: mala-

diile infecțioase, vaccinările profilactice, utilizarea produselor animaliere și fitogene, graviditatea heterospecifică, hemotransfuziile sanguine incompatibile după sistemul AB0.

Anticorpilor anti- A și anti- B a serului sanguin la majoritatea indivizilor prezintă un amestec de anticorpi naturali și imuni (asociații de imunoglobuline M și G).

Anticorpilor de tip IgA ai grupelor sanguine se pot întâlni în sistemele AB0 și Rh. Ei nu traversează bariera placentară.

Nou-născutul are o concentrație de IgG practic aproape egală cu cea a mamei și sunt de proveniența maternă. Frațiunile IgM și IgA se găsesc în cantități minore (urme) sau sunt absente în sângele nou-născutului. Traversarea transplacentară a IgG este condiționată de prezența în placentă a proteinelor anti-Fab-fragmente, care asigură transportul moleculelor de la mamă la făt. Activitatea majoră a anticorpilor anti-A și anti-B apreciază importanța lor clinică în apariția reacțiilor posttransfuzionale incompatibile după antigenele sistemului sanguin AB0.

Actualmente sunt bine cunoscuți și Ac monoclonali – produse ale hibridoamelor respective, care posedă specificitate unică față de un singur epitop.

Lectinele sunt extrase fitogene cu acțiune specifică pentru anumite specificități sanguine. Se cunosc lectine anti- $A_1$  preparate din semințe de *Dolichos biflorus* și *Phaseolus lunatus*, utilizate la determinările subgrupelor  $A_1$  și  $A_1B$ . Lectinele anti-H preparate din semințe de *Ulex europeus* sunt folosite pentru diferențierea subgrupelor A și evaluarea statutului secretor. Lectinele anti-N preparate din semințe de *Vicia graminea* și anti-M din semințele de *Iberis amara* sunt utilizate pentru determinarea grupelor MN.

Serurile de origine animală (iepure, ovine, câine, porcine etc.) pot conține Ac anti-H.

Titul Ac este considerat diluția maximă ce manifestă capacitatea de aglutinare cu Ag respectiv.

Aviditatea este viteza de reacție dintre Ac și Ag. Aviditatea pentru Ac grupelor sanguine se exprimă în secunde, adică timpul necesar de a se afișa aglutinarea distinsă cu ochiul liber în testările pe planșă.

Fenomenul de zonă sau prozonă constă în absența aglutinării atunci când Ac sau Ag sunt într-o concentrație excesivă. La titrarea serială în primele tuburi nu se observă aglutinare, ea fiind aparentă la diluții mai mari.



Acest fenomen apare de regulă cu serurile care conțin o cantitate mare de Ac. Când un astfel de ser este diluat, apare o anumită concentrație de Ac care acționează maxim cu cantitatea respectivă de Ag.

Așadar, anticorpii anti-Ag celulelor sanguine prezintă molecule cu diverse varietăți specifice care asigură o gamă din cele mai diverse fenomene imune cu importanță clinică majoră atât în condiții de normă, cât și în diverse stări imunopatologice.

# CAPITOLUL II

---

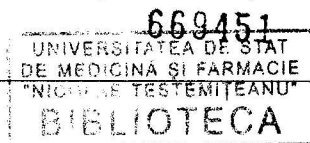
## GENETICA GRUPELOR SANGUINE

*Principii generale.* Definierea biologică a unui individ este determinată de ansamblul unor caractere morfologice, fiziologice, biochimice, psihice și comportamentale – *fenotipul*, controlate de acțiunea, în diferite proporții, a factorilor ereditari și a celor de mediu. Sistemul de gene din setul diploid de cromozomi al unui individ, care determină formarea unui anumit fenotip se numește *genotip*. Caracterele, la formarea cărora genotipul participă într-o proporție mai mare de 50% poartă denumirea de *caractere ereditare*.

Nucleul celulelor este sediul cromozomilor - suportul eredității și variabilității organismului uman. Celulele somatice umane conțin un set diploid de cromozomi – 46 de cromozomi. În celulele sexuale mature – ovulul și spermatozoidul, există 23 de cromozomi (set haploid). În cursul fertilizării prin unirea ovulului cu spermatozoidul se formează 23 de perechi de cromozomi. Astfel, fiecare individ moștenește un cromozom dintr-o pereche de la tată și celălalt cromozom al perechii respective de la mamă. Printre cele 23 perechi de cromozomi, 22 de perechi se numesc *autozomi*, iar o pereche reprezintă cromozomi *sexuali*, care la femeie sunt identici „XX”, iar la bărbați sunt diferiți și reprezentați prin simbolul XY. Pe cromozomi sunt localizate gene, care reprezintă suportul caracterelor ereditare. O genă codifică sinteza unei proteine specifice și formarea unui caracter specific.

Fiecare genă ocupă o poziție fixă pe cromozom, denumit locus cromozomic. Genele care ocupă loci identici pe o pereche de cromozomi omologi se numesc gene alele și determină ereditatea unui anumit caracter, iar genele ce ocupă loci diferiți se numesc gene nealele și determină caractere diferite.

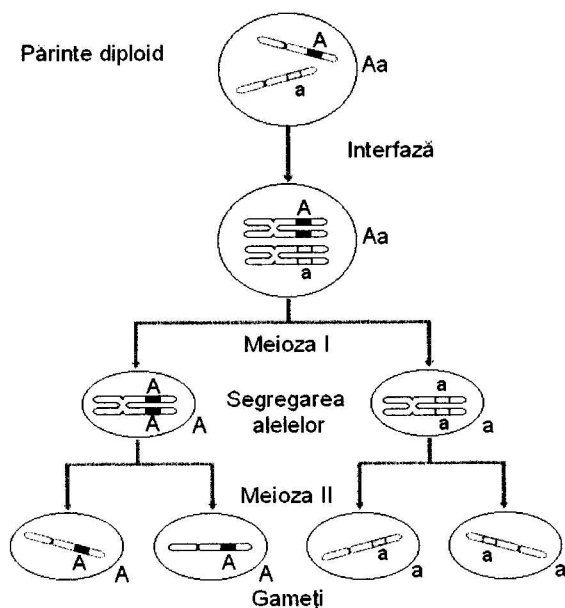
*Genele alele* sunt localizate în loci identici pe cromozomi omologi și controlează același caracter sau forme alternative ale aceluiași caracter. Genele alele se pot prezenta în mai multe forme moleculare diferite – polialelism, dar în genotip, la o persoană, sunt prezente numai două alele – o pereche (excepție - pe cromozomii X și Y la bărbați este prezentă doar o alelă pentru fiecare genă).



Fiecare individ poartă circa 30 mii perechi de gene alele, după unele este *homozigot* - purtător de gene alele identice, după altele este *heterozigot* - purtător de gene alele diferite și *hemizigot* după genele înlănțuite cu cromozomul X la bărbați. În cazul heterozigoției se manifestă alela cu o activitate mai mare (*gena dominantă*) față de a doua (*gena recesivă*).

În timpul transmiterii: în meioză, genele alele se separă în gameți (celele sexuale) diferiți – segregă, iar la fecundare se combină întâmplător formând diferite genotipuri, determinând segregarea caracterelor ce reprezintă baza legilor eredității mendeliene (fig. 1). Alelele unui individ – una este de origine maternă și alta de origine paternă. Individul homozigot produce gameți identici după alela dată, iar individul heterozigot produce gameți diferiți – 50% vor conține o alelă și 50% vor conține cealaltă alelă.

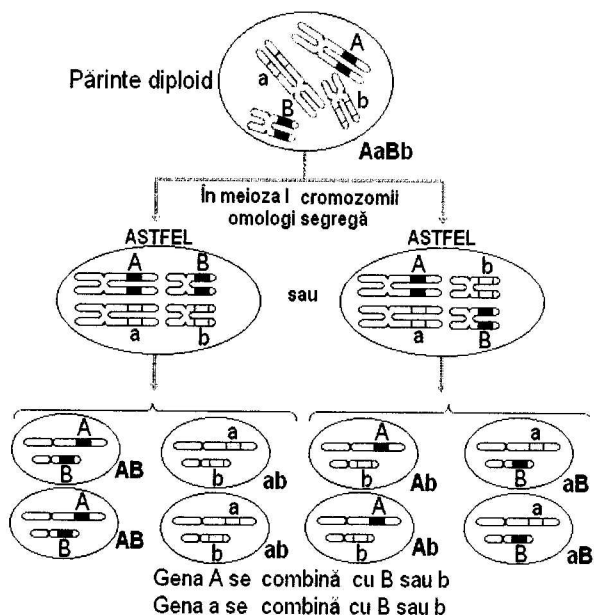
**Figura 1. Combinarea genelor nealele din cromozomi omologi**



*Gene nealele* sunt localizate în loci diferiți ai cromozomilor și, de regulă, controlează caractere diferite sau cooperează pentru formarea unui

caracter complex. Se manifestă fenotipic independent una față de alta sau interacționează (fig. 2).

**Figura 2. Combinarea independentă a genelor nealele din cromozomi neomologi**



Genele nealele se transmit:

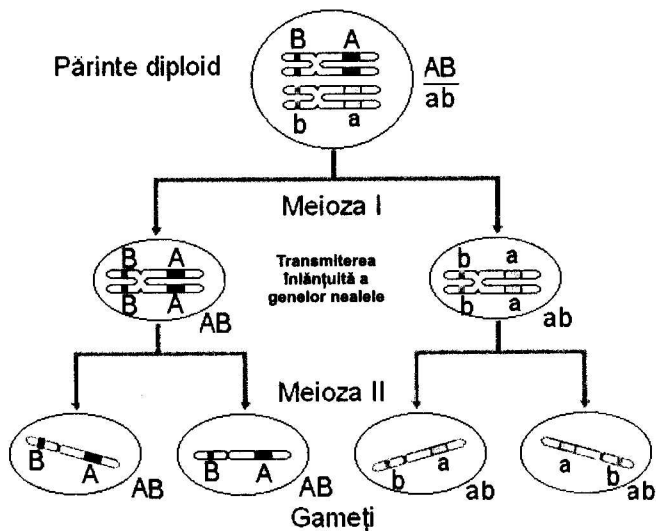
- în bloc – înlănțuit, dacă se află pe același cromozom și formează grup de înlănțuire, haplotipuri (fig. 3);
- independent, dacă se află pe cromozomi diferiți.

Grupele de antigene eritrocitare (AB0, RH, MN, Xg, etc.) reprezintă produsul interacțiunii a două alele, între care pot exista relații de dominanță/recesivitate sau codominanță; se transmit mendelian și respectă legile monohibridării.

Exprimarea fenotipică în populație a grupeleor sanguine este de regulă *bimodală*. Unele grupe sanguine prezintă *polimorfisme*, determinate de variantele antigenice sanguine după sistemul ABO ( $A_2$ ,  $A_3$ ,  $B_3$ ,  $B_x$  etc.).

În dependență de capacitatea de manifestare fenotipică caracterele pot fi: *dominante*, *intermediare* și *recesive*. Gena ce se manifestă atât la homoziгоți cât și la heterozigoți se numește *alelă dominantă* (A), iar cea care se manifestă doar în stare homoziгоtă – *alelă recesivă* (a). Fiecare individ este heterozigot pentru unii loci și este homoziгоt pentru alții. Între genele alele pot exista mai multe tipuri de relații – *interacțiuni alelice*: dominare completă, dominare incompletă și codominare.

**Figura 3. Transmiterea înlănțuită a genelor localizate pe același cromozom**



Antigenele de grup sanguin se manifestă de regulă ca niște caractere codominante, la indivizii heterozigoți fiind exprimate produsele ambelor alele. Descrierea caracterelor dominante și recesive depinde de metoda utilizată pentru detecția expresiei produsului genetic. Caracterele testate asigură evidențierea fenotipului.

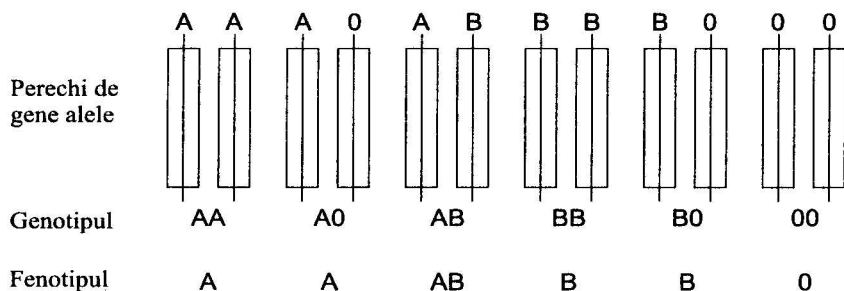
## Relația genotip-fenotip în sistemul ABO

Homozigot	<i>Genotip</i>	Heterozigot	<i>Fenotip</i>
00		-	0
$A_1A_1$		$A_1A_2, A_10$	$A_1$
$A_2A_2$		$A_20$	$A_2$
BB		B0	B
-		$A_1B$	$A_1B$
-		$A_2B$	$A_2B$

La persoanele cu  $A_1$  și  $A_2$  în baza testării hematiilor cu anti- $A_1$  nu se poate conchide despre prezența (sau absența) alelei  $A_2$ . Se consideră, că produsele alelei  $A_1$  sunt dominante față de produsele alelei  $A_2$ . Persoanele heterozigote  $A_1A_2$  posedă fenotipul  $A_1$ . Dar la indivizii cu  $A_20$  produsul alelei  $A_2$  este exprimat, deoarece produsul alelei 0 nu sunt Ag eritrocitare. În aceste exemple formula genetică  $A_1, A_2$  și  $A_20$  reprezintă genotipul individului. Existența acestor gene poate fi decelată cu ajutorul metodelor moleculare. Prin utilizarea metodelor de testare a transferazelor, produse specifice de expresie a genelor  $A$  și  $B$ , s-a constatat, că la heterozigoții  $A_1A_2$  se formează produsele ambelor alele, adică ambele transferaze  $A_1$  și  $A_2$ . Alela 0 este amorfă și nu influențează Ag membranare, dar poate fi identificată cu ajutorul metodelor imunologice în serul heterozigoților  $A_20$ . Din punctul de vedere al sintezei de molecule proteice și nu din considerentele apartenenței de grup sanguin, genele  $A_1, A_2$  și 0 sunt codominante.

Pentru a înțelege ereditatea grupelor sanguine este necesar de rezumat că genotipul controlează fenotipul. *Genotipul* unui individ este formula genetică de pe perechea de cromozomi moșteniți de la tată și mamă, reprezentată prin cele două gene alele. Fenotipul unui individ este tipul sau grupa sanguină determinată pe eritrocite prin metode imunologice, cu identificarea prezenței sau absenței factorilor de grup sau a aglutinogenelor pe eritrocite (fig. 4).

**Figura 4. Combinațiile posibile pentru cele trei alele ale grupului sanguin AB0**



Determinarea fenotipului pe eritrocite poate să dea indicii și despre formula genotipului. Pentru grupele AB0, un individ cu grupa 0 are genotipul 00, iar un individ de grup AB are genotipul AB. Pentru grupele A și B nu se poate determina direct genotipul, deoarece nu există un antiser care să deceleze pe eritrocite caracterul 0 la genotipurile A0 și B0. Precizarea genotipului în aceste cazuri se poate realiza prin testările de grup ale membrilor familiei (părinți și copii). Astfel o mamă cu fenotipul A și un tată de fenotip B pot avea copii cu fenotip A, B, AB sau 0. Dacă din acest cuplu rezultă un copil 0, ambii părinți sunt heterozigoți, genotipul lor fiind A0 și B0. Dacă se naște un copil de grup A, aceasta denotă că tatăl de grup B este heterozigot, adică B0 și invers - dacă copilul născut este de grup B, mama este obligatoriu A0. Dacă părinții sunt homozigoți A și B, toți copiii se vor naște cu grupul sanguin AB.

În raport cu sistemul RH, grație existenței antiserurilor pentru toți factorii acestui sistem (exceptând factorul d), determinarea fenotipului reflectă exact apartenența genotipică.

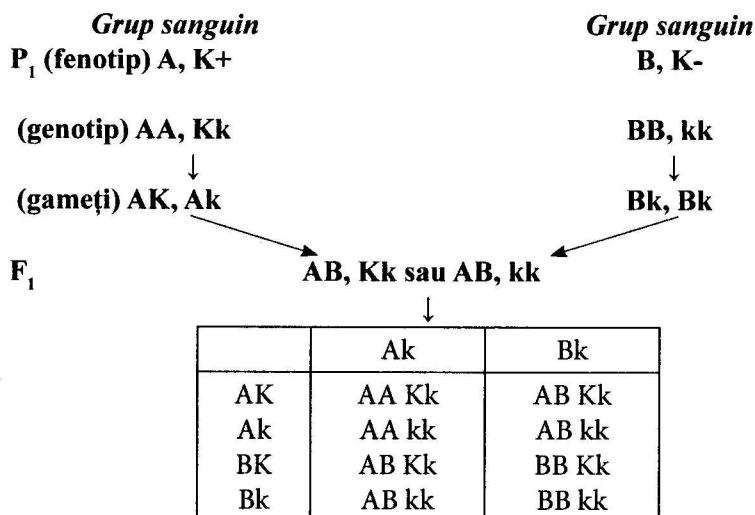
Hematiile umane cu genotipul KK poartă o doză dublă de Ag K, pe când celulele persoanelor cu genotipul Kk au numai o doză de Ag K. Diferențele cantitative ale Ag de pe eritrocitele persoanelor homozigote și heterozigote pot fi identificate serologic, dată fiind expresia diversă a Ag definită de prezența unui număr diferit de alele („efectul dozei”). De exemplu, unele seruri anti-K pot avea următorul tip de reactivitate:

Anticorpul	Genotipul donatorului de eritrocite	
	KK	Kk
anti - K	3+	2+

Efectul dozei nu se observă la toate antigenele de grup sanguin și chiar nu pentru toți Ac de specificitatea dată.

Genele care codifică diferite caractere sunt moștenite independent, cu condiția ca acestea să fie amplasate pe diferiți cromozomi. De exemplu, dacă unul din părinți are grupul sanguin A (homozigot după *A*) și heterozigot după sistemul *Kell*, iar celălalt părinte este homozigot după grupul sanguin B și sistemul *Kell* (homozigot după *k*), copiii din prima generație vor avea grupul sanguin AB, jumătate din ei vor fi *K+k+*, iar cealaltă *K-k+*. În a doua generație de copii se pot manifesta oricare dintre caracterele următoare: *A, K+k+*; *AB, K+k+*; *B, K-k+*; *A, K-k+*; *AB, K-k+*; *B, K-k+* (fig. 5).

**Figura 5. Scenariul de moștenire a antigenelor AB0 și Kell**



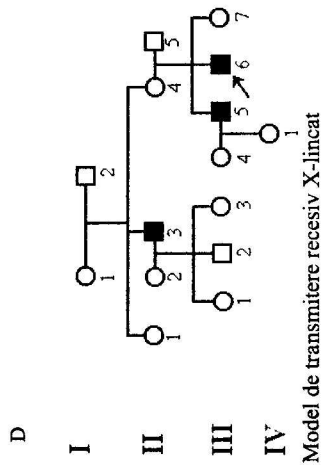
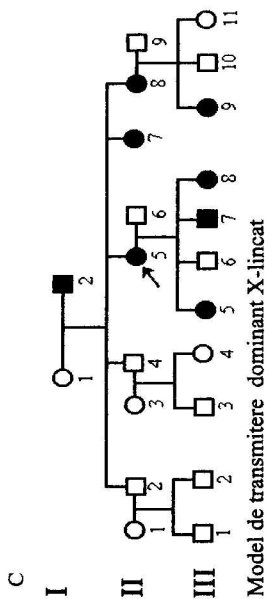
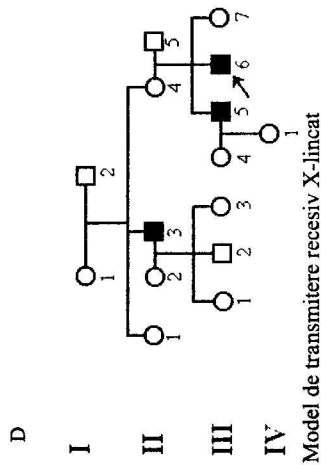
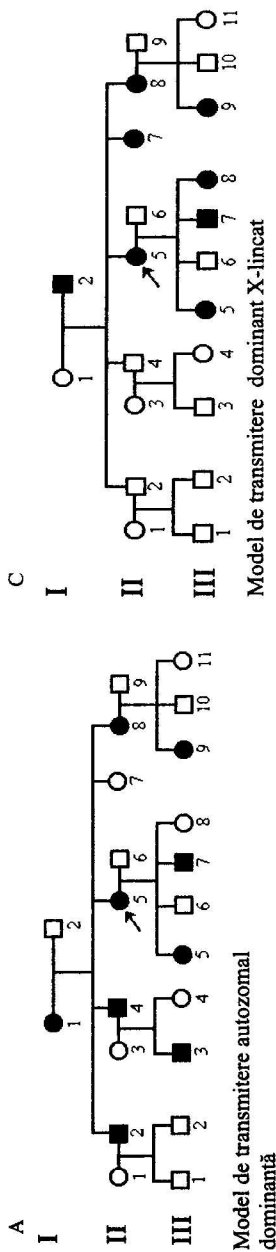
**P<sub>1</sub> – părinții, F<sub>1</sub> – prima generație; F<sub>2</sub> – generația 2**



Excepție de la legea lui Mendel despre repartizarea independentă a caracterelor face situația, când genele determinante ale diferitor caractere se găsesc pe același cromozom și se moștenesc înlănțuit. De exemplu, genele care codifică Ag MN și Ss ale grupului sanguin sunt localizate pe cromozom atât de aproape una de altă, încât se moștenesc în bloc. Excepție constituie procesul de recombinare cromozomială, când în profază meiozei între cromozomii-pereche are loc crossing-overul.

*Transmiterea genealogică.* Caracterele ereditare, inclusiv și grupele sanguine se pot transmite dominant sau recesiv, autozomal sau X-lincat. (fig. 6)

**Figura 6. Tipuri de moștenire genealogică a caracterelor ereditare**



**Notă:**

- - femeie ce nu manifestă caracterul analizat
- - bărbat ce nu manifestă caracterul analizat
- - femeie ce manifestă caracterul analizat

- - bărbat ce manifestă caracterul analizat
- - căsătorie sporadică
- - căsătorie consanguină

Caracterele autozomale recesive sau dominante moștenite se înregistrează cu aceeași frecvență la bărbați și femei. Persoanele la care se manifestă caracterul recesiv sunt homozigote pentru alela codificată (*fig. 3B*). La părinții acestora caracterul dat poate fi exprimat sau absent. Cei ce au absent acest caracter sunt purtători obligativi ai genei răspunzătoare de manifestarea caracterului, adică sunt heterozigoți după alelele, prezența cărora nu este exprimată fenotipic. Dacă în populație frecvența alelei cu manifestare alternativă nu este prea mare, atunci caracterul recesiv este mai rar întâlnit și, de regulă, se înregistrează numai la indivizii unei generații. Excepție fac cuplurile înrudite, care au o mare probabilitate de a se afla în posesia uneia și aceleiași gene comparativ cu indivizii populației randomizate (frecvența  $<1:10000$ ).

O particularitate atât a caracterului dominant, cât și a celui recesiv legat de X este imposibilitatea moștenirii de la tată la fiu. Deoarece acest caracter este legat de cromozomul X, el va fi moștenit și se va manifesta la fiicele lui. Dacă la mama alela determinantă va fi prezentă pe ambii cromozomi X, la toți copiii ei se va manifesta acest caracter. Caracterele dominante legate de cromozomul X, ca regulă, se manifestă în următoarele generații, dar fără moștenire de la tată la fiu (*fig. 6 C*).

Exemplu clasic de moștenire a caracterului recesiv legat de sex (*fig. 6 D*) este hemofilia A. Toți feciorii tatălui bolnav și ai mamei, la care este absentă alela determinantă sunt sănătoși, iar toate fiicele sunt purtătoare. Bărbații moștenesc acest caracter de la mama purtătoare sau, foarte rar, de la mama homozigotă după alela dată, la care, respectiv, se manifestă acest caracter. În cuplul ce include un bărbat sănătos și o femeie purtătoare, jumătate din generația masculină va fi bolnavă, iar jumătate din copiii de sex feminin vor fi purtătorii acestui caracter. Dacă alela recesivă legată de sex se înregistrează rar, caracterul se manifestă exclusiv la bărbați. În cazul când alela legată de cromozomul X se întâlnește în populație cu o frecvență majoră, maladia poate fi constatată și la femei, deoarece în acest caz se majorează probabilitatea ca din cuplul „bărbat bolnav – femeie purtătoare” să rezulte fiice, jumătate dintre care vor fi homozigote pentru alela anormală.

Locii genelor pentru majoritatea grupelor sanguine sunt amplasați pe cele 22 perechi de autozomi și cromosomul X (*tab. 7*).

## Amplasarea locilor grupelor sanguine pe cromozomi (ISBT)

Cromozomul	Locusul	Cromozomul	Locusul
1	RH	9	ABO
	SC	17	DIEGO
	FY	18	JK
	CROMER	19	LE
	KNOPS		LW
2	Gerbich		LU
4	MNS		H
6	CH/RG	22	P <sub>1</sub>
7	CO	X	XG
	YT		XK
	KEL		

Conform datelor prezentate în tab. 7, locii *RH* și *Duffy* sunt amplasate pe cromozomul 1, genele *ABO* – pe cromozomul 9; locusul *H*, *LE*, *Lutheran* și *LW* – pe cromozomul 19. Locii *Xg* și *XK* sunt amplasați pe cromozomul X.

Din interacțiunea alelelor sau a produselor diferitor loci pot rezulta modificări de manifestare a caracterelor. Noțiunea de supresor și de modificator sunt utilizate pentru consemnarea genelor ce influențează expresia altor gene, dar mecanismele concrete de realizare a acestui fenomen sunt necunoscute. Unele fenomene din imunologia grupelor sanguine pot fi explicate prin interacțiunea genelor, de exemplu atenuarea sau inhibarea expresiei Ag de sistem Lutheran de gena dominantă – modificator, In (Lu).

În cazul când produsele a doi loci diferiți joacă un rol important în secvența de formare a produsului biochimic final, interacțiunea genelor se numește epistazie, de exemplu, incapacitatea de formare a Ag A și B în absența sintezei preliminare a substanței H.

*Testarea filiației (rudeniei).* Antigenele grupelor sanguine cu expresie codominantă sunt utilizate în multiple cazuri pentru aprecierea paternității. În prezența unor probe concludente despre maternitatea copilului, paternitatea poate fi exclusă prin una din metode:

**1. Metoda directă,** dacă markerul genetic este prezent la copil, absent la mamă și la presupusul tată. De exemplu: copilul – B, mama 0, tatăl presupus 0, copilul a moștenit alela B, care nu putea fi moștenită de la mamă sau de la tatăl prezumptiv decât în condiția că nici mama, nici

tatăl presupus nu posedă fenotipul rar Oh. În baza fenotipurilor observate la mamă și copil gena B trebuia să fie moștenită doar de la tatăl biologic și se numește corespunzător alela paternă obligatorie;

2. *Metoda indirectă*, dacă la copil este absent markerul genetic care ar fi moștenit de la tatăl presupus în conformitate cu fenotipul constatat la toți copiii lui. De exemplu: copilul Jk (a+b-), mama Jk (a+b-), tatăl presupus Jk (a-b+). În cazul dat, tatăl presupus posibil este homozigot după  $Jk^b$  și copilul lui trebuia să moștenească  $Jk^b$ .

Excluderea directă a paternității este cea mai convingătoare, pe când cea indirectă poate deveni utilă în prezența alelei non-expresiate (alelă tăcută). În exemplul prezentat tatăl presupus putea avea genotipul  $Jk^b$  și Jk și astfel se transmite alela nonexpresiată (Jk) copilului. Genotipul copilului în acest caz putea fi  $Jk^aJk$ , și nu cel mai frecvent înregistrat  $Jk^aJk^a$ . La interpretarea rezultatelor fenotipizării este necesar să se ia în considerație toți factorii biologici care pot influența rezultatele.

În cazul când rudenția tatălui presupus nu poate fi exclusă, se poate calcula veracitatea paternității. Ultima poate fi calculată când de la tatăl presupus au fost moștenite alelele obligatorii, care apoi se confruntă cu probabilitatea transmiterii alelelor obligatorii de la orice bărbat de aceeași rasă. Rezultatele se exprimă în procente sau prin indicele paternității. Metodele de analiză a paternității includ cercetarea unui număr major de sisteme genetice, diferite de grupele sanguine, de asemenea și studiul asupra polimorfismului dimensional al fragmentelor de restricție a ADN și „*finger-print*” ADN. Au fost elaborate proceduri standarde pentru laboratoarele care efectuează cercetări de rudenie.

Unele date din genetica populației sunt de importanță în situații clinice pentru posibilitatea selectării sângelui compatibil cu serul în care sunt prezenți multipli Ac. Calculele vor fi dependente de frecvența fenotipurilor. Ultima în raport cu grupele sanguine se realizează în baza rezultatelor de testare a unui număr mare de indivizi selectați randomizat la o rasă identică. Suma frecvenței fenotipurilor constituie 100% sau 1,0. De exemplu, în populația europeană 77% indivizi selectați sporadic sunt Jk (a+). Frecvența persoanelor Jk (a-) constituie 23%. Dacă sângele este necesar pentru transfuzie pacientului cu Ac anti- $Jk^a$  atunci 23% sau aproximativ fiecare a 4 mostră de sânge compatibil după AB0 trebuie să fie compatibil și după sistemul dat.

Pe lângă sistemele eritrocitare de grup, foarte numeroase și bine studiate, există și Ag de grup specifice pentru seriile leucocitare și trombocitare. Deși descoperite relativ recent, Ag leucocitare și trombocitare sunt din ce în ce mai bine precizate, mai ales că acestea reprezintă suportul Ag de histocompatibilitate încadrate în sistemul HLA, la rândul său de importanță deosebită în problemele imunității celulare.

Pe lângă grupele sanguine caracterizate prin cercetarea unor Ag legate de elementele sanguine figurate ca eritrocite, leucocite, trombocite, catalogarea de grup a sângelui unui individ consideră și caractere antigenice legate de proteinele serice din sânge.

Actualmente sunt descrise mai mult de 10 sisteme genetice care consemnează polimorfismul antigenic al elementelor proteice din ser. Mai bine studiate se consideră 4 sisteme de aloantigene ale proteinelor serice (Gm, Am, Inv, IsF). Sistemul Gm (gama marker) este legat de lanțurile polipeptidice grele ale IgG. Au fost descriși circa 25 factori, care se referă la modalitățile structurale ale fragmentului Fc. Printre reprezentanții rasei albe cel mai bine studiați au fost Gm (a), Gm (b) și Gm (c). Ac față de antigenele enumerate se întâlnesc la unele persoane aparent sănătoase, dar mai frecvent se testează la bolnavi sub formă de autoanticorpi.

Sistemul Am (alfa marker) este legat de fragmentul Ca 2, iar sistemul IgSF (Imunoglobulina San Francisco) este localizată pe fragmentul Fc al moleculei IgG<sub>1</sub>.

Sistemul (inhibitor Virmi) este dependent de secvența aminoacidică a lanțurilor ușoare ale moleculelor IgG, IgM și IgA.

De regulă, specificitățile alotipice definesc modificări în poziția a 1–2 resturi de aminoacizi din șirul de aminoacizi ai lanțurilor, modificări moștenite și transmise conform legilor mendeliene de segregare a caracterelor. Acest efect îl poate avea și modificarea poziției unor hidrați de carbon. Astfel, în cursul hemopatiilor sau grefelor de măduvă alogenă, se realizează o mare frecvență a fenotipurilor Inv, probabil ca urmare a decupării unui grup de hidrați de carbon de pe molecula Inv 123. Bineînțeles că, de multe ori, expresia serologică a multor specificități alotipice se datorește structurii cuaternare a moleculei, când la suprafață rămân secvențe de aminoacizi, care în mod obișnuit sunt ascunse la moleculele de imunoglobulină.

## CAPITOLUL III

---

### INTERACȚIUNEA ANTIGENELOR ERITROCITARE CU ANTICORPII. METODELE DE TESTARE (principii)

Interacțiunea dintre antigen și anticorp, fiind influențată de diferiți factori, se manifestă prin multiple fenomene imunologice, printre care mai frecvente și bine studiate sunt *aglutinarea*, *precipitarea* și *hemoliza*, *testul antiglobulinic Coombs*.

**Aglutinarea** prezintă o aglomerare celulară indusă de anticorpii care interacționează cu epitopii expiași ai hematiilor învecinate. În unele cazuri fixarea moleculelor de Ac la determinantele antigenice nu definește conglomerarea lor, iar pentru vizualizarea fenomenului este necesară o cantitate suplimentară de anticorpi. Ce consideră, că aglutinarea evoluează prin 2 faze:

1. Fixarea Ac pe membrana celulelor (sensibilizarea lor);
2. Formarea unei rețele între celulele sensibilizate cu aglomerarea celor implicate.

Prima fază a reacției este influențată de afinitatea anticorpilor, cora-portul dintre Ag și Ac, de temperatură, mediul pH, timpul incubației, de puterea ionică ș.a.

Interacțiunea dintre Ac și Ag este un proces reversibil, influențat de mulți factori. Printre ultimii ar fi constanta de echilibru al Ac, majorarea căreia suscită interacțiunea mai eficientă a componentilor în această fază.

Testarea Ac se efectuează la diferiți parametri de temperatură (22–37° sau 30–37°). De regulă, la testarea hematiilor Ac IgM reacționează mai pregnant la temperaturi relativ mai scăzute (4–27°C), pe când IgG are optima termică de activitate la 37°C. Anticorpii care *in vitro* reacționează la temperaturi mai scăzute de 37°C doar arare induc hemoliza eritrocitelor antigen-pozitive transfuzate și nu sunt de sugestivitate clinică, cu excepția Ac anti-P, apreciați în serul unor pacienți cu hemoglobinurie paroxistică *a frigore*. Unii Ac „reci” de tip IgM activează complementul la temperaturi de peste 30°C, dar rar influențează viabilitatea hematiilor transplantate cu Ag respectiv expiat.

Ac cu importanță clinică sunt cei care diminuează viabilitatea eritrocitelor *in vivo* și pot fi testați *in vitro* la 37 °C.

Pentru majoritatea testelor se utilizează remedii cu pH~7,0. La păstrarea îndelungată a soluțiilor saline, pH scade până la 5,0-6,0, iată de ce pentru testările serologice se folosesc soluții tampon-fosfat saline.

Unii Ac sporadici, îndeosebi unele mostre anti-M, reacționează mai eficient la un pH scăzut.

Timpul de incubare pentru echilibrarea componentelor reacției este diferit pentru Ac grupelor sanguine. De importanță majoră în acest sens sunt clasa imunoglobulinelor, specificitatea Fab-fragmentelor și configurația epitopilor antigenici. Suplimentarea test-sistemelor cu agenți care potențează această interacțiune conduce la creșterea numărului de Ac care interacționează cu Ag în primele 15 min și astfel se reduce timpul de incubare pentru echilibrarea componentelor. Pentru sistemele montate în soluții saline sau albuminoase, când se utilizează serul antiglobulinic pentru demonstrarea fixării Ac, incubarea curs de 30 min la +37°C este suficientă pentru detecția Ac cu valoare clinică. Pentru Ac slab reactogeni acest interval poate fi insuficient pentru a atinge starea de echilibru, iar pentru creșterea sensibilității testului este necesar de majorat perioada de incubație, care, însă, nu va influența concludența rezultatelor reacției.

Coraportul numărului de molecule de Ag și Ac este important pentru viteza interacțiunii dintre aceștia. În unele cazuri creșterea numărului de Ac asigură majorarea indicelui de sensibilitate a metodei. Dacă în serul testat prevalează Ac, aceasta asigură legarea mai multor molecule imunoglobulinice cu determinantele antigenice. În unele cazuri concentrația majoră de Ac poate inhiba aglutinarea, inducând fenomenul de „prozonă”. Cu toate acestea, creșterea concentrației de Ac accentuează sensibilitatea testului de aglutinare.

În testele serologice se utilizează coraportul de 1:10 al hematiilor la ser pentru a reuși inclusiv detecția Ac slab reactogeni.

*Puterea ionică.* În soluțiile saline normale ionii de Na<sup>+</sup> și Cl<sup>-</sup> se concentrează în jurul corpusculilor și parțial neutralizează sarcinile opuse ale moleculelor Ag și Ac, ceea ce conduce la diminuarea intensității de interacțiune dintre Ag și Ac, iar minorizarea puterii ionice a mediului reactogen poate exclude acest efect. Scăderea concentrației de săruri în amestecul de celule și Ac, ca regulă, accelerează fixarea Ac și, posibil, crește numărul



moleculilor legate. Utilizarea soluțiilor saline cu putere ionică scăzută reduce din timpul de incubație necesar detecției de rutină a Ac.

Faza a doua a reacției de aglutinare cu formarea de aglomerări celulare este influențată de dimensiunile și proprietățile fizice ale moleculilor de Ac, de concentrația epitopilor pe celule și de distanța dintre ultimele.

Membrana eritrocitelor suspendate în soluțiile saline au sarcină negativă, care concentrează cationii pozitivi, ultimii micșorând, dar nu și neutralizând încărcătura superficială pe limitanta dintre mediul ambiant și aglomerarea ionilor atrași de celulă. Corpusculii cu aceeași încărcătura se resping, distanța dintre eritrocite în mediul ionic rămâne, însă, suficientă pentru a nu se produce aglomerații.

Un alt factor ce contribuie la menținerea distanței dintre eritrocite în mediul salin este molecula de apă a membranei hidrice. Se consideră, că moleculele de apă amplasate la suprafața celulei formează așa-numitele „bule” care împiedică asocierea celulelor.

Aglutinarea este destul de eficientă în cazul moleculilor polivalente IgM, care interacționează cu Ag superficiali ai celulelor suspendate în soluțiile saline. IgG nu este capabilă să lege eritrocitele, care se găsesc la o anumită distanță și induce sensibilizarea acestora, dar nu se constituie rețele aglutinabile. Micșorarea distanței dintre celule crește posibilitatea de formare a aglutinatelor vizibile prin modificarea componenței ionice a soluțiilor, reducerea încărcăturii negative a moleculilor superficiale, utilizarea macromoleculilor pentru minorizarea puterii ionice a soluțiilor, reducerea stratului hidric din perimetrul celulei etc. Aglutinarea este influențată și de proprietățile membranei. Mobilitatea și formarea clasterilor de molecule purtătoare de Ag induce efecte nu chiar clare. Moleculele de Ac se leagă cu celulele, membrana cărora nu este deformată și Ag se găsesc în stare nativă, dar aglutinarea nu se produce. Prelucrarea hematiilor cu enzime proteolitice înlătură de pe membrană polipeptidele, modificând astfel configurația lor sferică și interacțiunea celulară. Detașând un număr major de molecule cu resturi de acid sialic, aceste enzime influențează sarcina superficială.

În prezența polimerilor cu sarcină pozitivă (polibren) eritrocitele normale agreghează spontan. Formarea agregatelor poate fi evitată suplimentând citrat de sodiu. Acest fenomen este, probabil, asigurat de neutralizarea încărcăturii negative pe care o comportă membrana eritrocitară, grație multiplelor resturi de acid sialic. Această ipoteză se confirmă și prin faptul,

că polibrenul nu influențează hematiile, membrana cărora nu conține acid sialic (prin deficiențe congenitale sau prelucrare cu enzime). Agregarea indusă de policationi poate fi și rezultatul interacțiunii dintre macromolecule și moleculele încărcate ale membranei celulare, care înlătură moleculele de apă ale membranei hidrice.

**Testul antiglobulinic** a fost descris în 1945 de Coombs și colab., care îl utilizau pentru detecția Ac fixați pe celule fără formarea de aglutinate. Primar testul se utiliza pentru demonstrarea prezenței Ac în ser, iar ulterior – și pentru testarea hematiilor acoperite *in vivo* cu Ac sau complement. În testul dat se utilizează Ac anti-globuline umane, care fac vizibilă aglutinarea eritrocitelor sensibilizate. Există 2 variante ale acestui test: *direct* și *indirect*.

**Testul antiglobulinic direct** (TAD) se folosește pentru demonstrarea sensibilizării eritrocitelor *in vivo* în anemiile hemolitice autoimune, în hemoliza indusă de remediile medicamentoase, în **maladia hemolitică a nou-născutului** și în reacțiile aloimune la hematiile transplantate recent.

**Testul antiglobulinic indirect** (TAI) se efectuează în 2 etape și se utilizează pentru determinarea *in vitro* a prezenței Ac ce sensibilizează celulele, dar nu le aglutinează. Această variantă este utilizată pentru **evidențierea și identificarea Ac**, pentru tipizarea grupelor sanguine și pentru testarea compatibilității donatorului cu recipientul.

*Principiile testului antiglobulinic:*

1. Pentru obținerea serului antiglobulinic se efectuează imunizarea animalelor cu globuline umane și adsorbția ulterioară a serului imun pentru extragerea aglutinelor indezirabile. În dependență de materialul utilizat pentru imunizare și metodele de prelucrare a serului, se poate obține ser antiglobulinic de diversă specificitate (anti-IgG, anti-compo-nentele complementului etc.). Actualmente se utilizează antiglobuline de origine hibridomică.
2. Anticorpii antiglobulinici reacționează cu fragmentele Fc ale moleculelor Ig fixate pe eritrocite, având ca reactogeni cele 2 Fab-fragmente care se leagă cu celulele sensibilizate învecinate și formează aglutinate vizibile. Celulele fără globuline pe suprafață nu se aglutinează. Inten-sitatea aglutinării, de regulă, este proporțională cantității de antiglobu-line legate de celulă.
3. Antiglobulina umană reacționează cu moleculele globulinice umane fi-xate pe eritrocite sau cu cele libere din ser. Globulinele libere, reacțio-

- nând cu antiglobulina umană, pot împiedica interacțiunea dintre serul indicator și moleculele globulinice fixate pe membrană. Dacă eritrocitele nu vor fi spălate de proteinele nefixate pe membrană până la suplimentarea serului antiglobulinic, globulinele libere sunt capabile să neutralizeze antiglobulinele umane, devenind cauza rezultatelor fals negative.
4. Testul antiglobulinic direct este utilizat pentru demonstrarea prezenței anticorpilor fixați pe eritrocite *in vivo*, în special al IgG și C3dg. Eritrocitele spălate ale pacientului sunt testate cu ser antiglobulinic.
  5. Testul antiglobulinic indirect se efectuează prin incubarea hematiilor donatorului de același grup cu serul pacientului și spălarea ulterioară a eritrocitelor pentru înlăturarea globulinelor nefixate. Aglutinarea hematiilor după ce s-a adăos ser antiglobulinic indică interacțiunea Ac din ser cu Ag (globulinele umane) fixate pe membrana eritrocitului. Testul poate fi utilizat și pentru identificarea Ag, aprecierea specificității anticorpilor, a compatibilității donator-recipient. În cazul testării antiglobulinice „cross-mutch” nu este cunoscut atât caracterul Ag, cât și cel al Ac, de aceea metoda este utilizată în principiu pentru identificarea interacțiunii dintre aceștia. Factorii care influențează prima fază de aglutinare sunt valabili și pentru sensibilitatea testării antiglobulinice indirecte. Necesitatea de a spăla amestecul „ser-celule” poate fi exclusă prin prelucrarea Ac cu reactivitate antiglobulinică. Metoda include legarea Ac specifici cu eritrocitele Ag-pozitive și disocierea lor ulterioară prin utilizarea eluatului. Serul reactogen nu este contaminat cu alte globuline umane și de aceea test-sistemul nu necesită spălare până la adăugarea serului antiglobulinic. Realizarea testului în gel este mai simplă atât pentru metoda directă, cât și pentru cea indirectă. Reagenții pentru testarea antiglobulinică pot avea diversă origine (tab. 8).

Tabelul 8

**Caracteristica reagenților antiglobulinici umani**

<b>Reagentul</b>	<b>Caracteristici operaționale</b>
Polispecific (policlonal de iepure, amestec policlonal iepure/șoarece, monoclonal murin)	Reagentul policlonal de iepure conține Ac anti - IgG și anti - C3d (poate să conțină și alți Ac anti - complement și anti-Ig); amestecul policlonal de iepure/șoarece conține Ac policlonali anti-IgG umane și Ac monoclonali murini anti-C3b și anti- C3d; reagentul monoclonal murin conține Ac monoclonali anti-IgG, anti-C3b și anti-C3d.

Anti-IgG (policlonal de iepure; lanțurile grele IgG; IgG monoclonal)	Reagentul policlonal de iepure conține anti-IgG fără activitate anticomplementară (nu obligatoriu și specific la lanțurile grele $\gamma$ ); reagentul lanțurilor grele IgG conține numai Ac anti – lanțurile $\gamma$ – umane; reagentul monoclonal IgG conține Ac monoclonali anti – IgG murine.
Anti-C3d și anti-C3b (policlonal de iepure) și anti-C3d, anti-C4b, și anti-C4d (policlonal de iepure)	Conține numai anticorpi la componenții respectivi ai complementului fără activitate anti- imunoglobulinică.
Anti-C3b (monoclonal murin) și anti-C3b, anti-C3d (monoclonal murin)	Conține numai anticorpi contra componenților respectivi ai complementului fără activitate anti- imunoglobulinică.

Reagenții polispecifici anti-globuline umane sunt predestinați pentru detecția anticorpilor IgG cu importanță clinică majoră. Sunt utilizați pentru testarea anti-globulinică directă (prezența Ac), pentru testele de rutină în stabilirea compatibilității. Ei conțin Ac anti-IgG și anti-C3d uman. Este posibilă și prezența altor Ac (anti-componentele complementului – C3b, C4b și C4d). Serul anti-globulinic polispecific manifestă activitate minoră (sau chiar absentă) la lanțurile grele de IgA și IgM. Cu toate acestea, el poate reacționa cu moleculele IgA și IgM, deoarece amestecul polispecific reacționează cu lanțurile ușoare de  $k$  și  $\lambda$ , care intră în componistica tuturor claselor de imunoglobuline. Reagenții polispecifici manifestă și activitate anticomplementară anti-C3d, asemeni serului standard anti-C3d. Majoritatea Ac cu importanță clinică aparțin clasei de IgG, de aceea funcția predominantă a reagenților polispecifici anti-globulinele umane este în majoritatea cazurilor cea de detecție a IgG.

Activitatea anticomplementară este de valoare modestă în testarea „cross-mutch” și în detecția Ac, deoarece ultimii au capacitatea de a fixa complementul și se atestă foarte rar. Dar activitatea anti-C3d este importantă pentru TAD, în special pentru cercetările asupra anemiei autoimune hemolitice (AAIH). La unii pacienți cu AAIH unica globulină care poate fi identificată pe eritrocite este anume C3dg.

**Reagenții monospecifici pentru antiglobulinele umane** pot fi obținuți fie prin imunizarea animalelor cu preparate purificate IgG, IgA, IgM, C3, C4 cu adsorbția ulterioară a serului obținut, fie ca produse ale hibridoamelor. Anticorpii produși de hibridoame se amestecă pentru realizarea

combinațiilor necesare de Ac sau a mixajului de Ac cu specificitate unică preluată de la diverse clone limfocitare. Mai frecvent sunt utilizați reagenții monospecifici anti-globuline umane – anti-IgG, anti-C3b și anti-C3d. După evidențierea globulinelor pe suprafața eritrocitelor în testul antiglobulinic direct, pentru caracteristica acestor proteine se utilizează reagenți monospecifici anti-globuline umane. Anti-IgG și anti-C3d se utilizează și la testarea antiglobulinică indirectă pentru diferențierea caracterului de interacțiune a unui ser cu Ac care fixează și care nu fixează complementul, de exemplu în amestecul anti-Le<sup>a</sup> și anti-E.

Reagentul anti-IgG nu are activitate anticomplementară și conține anticorpi anti-lanțurile  $\gamma$  umane. Dacă pe ambalaj lipsește indicația „specifici pentru lanțurile grele”, atunci acești Ac pot manifesta activitate și pentru lanțurile ușoare ale IgA și IgM, comune tuturor claselor Ig. Dar un rezultat pozitiv în testul antiglobulinic direct cu utilizarea acestui reagent anti-IgG nu confirmă prezența IgG, deși numai în cazuri rare pe eritrocite *in vivo* pot fi detectați IgA sau IgM și nu IgG. Preferință pentru utilizare ar avea reagentul anti-IgG, deoarece comparativ cu antiglobulina polispecifică umană în testele pentru compatibilitate și la detecția anticorpilor anti-IgG acesta nu reacționează cu complementul fixat pe hematii de anticorpii *a frigore* care nu sunt nici de însemnătate clinică.

**Rolul complementului în reacțiile antiglobulinice.** Componentii complementului se atașează pe eritrocite *in vivo* și *in vitro* cu ajutorul Ac specifici pentru Ag eritrocitare; ei pot fi activați și de complexe imune circulante de diversă specificitate (fără relație cu Ag eritrocitare), care vor fi adsorbiți nespecific pe eritrocite, fenomen denumit acoperirea martorului nevinovat de către complement (*innocent bystander*). Eritrocitele, sub influența componentilor complementului, pot fi hemolizate, dar nu în mod obligatoriu. Dacă activarea componentilor complementului nu s-a finisat, prezența componentilor atașați anterior poate fi detectată cu ajutorul reagenților anticomplementari. Mai frecvent se depistează componentul C3, deoarece câteva sute de molecule C3 pot să se lege cu eritrocitul la atașarea doar a câtorva molecule de Ac. Prezența C4 de asemenea poate fi testată, dar acoperirea cu C3 este de o mai mare semnificație clinică.

În unele cazuri pe eritrocitele spălate poate fi testat numai complementul fără Ig. La aproximativ 10–20% pacienți cu anemie hemolitică

autoimună eritorcitele dau rezultate pozitive în TAD induse doar de fixarea C3. Utilizarea metodelor de rutină nu indică prezența IgG, IgA și IgM, cu toate că unele mostre eritrocitare pot fi acoperite cu IgG, dar într-o concentrație mai mică decât cea de limită pentru detecția lor cu TAD standard.

În cazul prezenței hemaglutininelor *a frigore*, ele pot reacționa cu Ag eritrocitare la temperatura de până la 32°C, dar fără aglutinarea acestora. Traversând intima vaselor sangvine ale dermului, hematiile, la această limită termică, se acoperă cu autoanticorpi care activează complementul. Dacă celulele nu sunt hemolizate, ele se întorc în circuit, unde temperatura este de 37°C și autoanticorpii disociază de pe suprafața celulelor, lăsând componenții complementului bine fixați pe membrana eritocitară. Reagenții antiglobulinici umani testează în acest caz complementul C3dg.

Complexele imune ce apar în plasma sanguină și se leagă slab și nespecific cu eritrocitele pot contribui la acoperirea suprafețelor celulei cu complement. Ultimul fiind activat, se păstrează pe suprafața eritrocitelor după disocierea complexelor imune. C3 este unica globulină testată pe suprafața celulară.

În unele cazuri Ac de tip IgM se atașează pe suprafața eritrocitelor, dar nu induc aglutinarea lor. Evidențierea prezenței pe celule a IgM în testul antiglobulinic este dificilă datorită disocierii moleculelor IgM la spălare și activității minime a anti-IgM din serul antiglobulinic. De memorat, că Ac IgM activează complementul, astfel că interacțiunea Ag cu Ac poate fi demonstrată prin identificarea câtorva sute de molecule C3 legate de membrana celulară prin fragmentele imunoglobulinice.

### **Cauzele erorilor posibile în testul antiglobulinic.**

Rezultate fals-negative pot avea loc atât în TAD direct cât și în cel indirect la:

1. Spălarea insuficientă a hematiilor care este una din cauzele principale ale rezultatelor fals-negative în TAG, datorită interacțiunii prioritare a serului antiglobulinic cu globulinele nefixate pe eritrocite. Este important ca spălarea să fie efectuată cu un volum suficient de soluție fiziologică (2/3 ale tubului), iar resuspendarea hematiilor să fie completă. Supernatantul trebuie înlăturat complet. Este contraindicată acoperirea tubului cu degetul sau palma, deoarece globulinele pot ajunge astfel în

soluția de spălare, urmând inactivarea completă a reagentului antiglobulinic și pot prezenta pericol pentru sănătatea cercetătorului.

2. Cercetarea trebuie efectuată încontinuu, fără întreruperea etapelor de investigație. Dacă după spălare imediat nu se adaugă reagent antiglobulinic, globulinele fixate pe eritrocite pot disocia de pe suprafața celulară și astfel rămâne o cantitate insuficientă pentru detecția IgG și parțial se neutralizează reagentul antiglobulinic. După suplimentarea cu globulina anti-umană se efectuează imediat centrifugarea, se monitorizează reacția, grație diminuării frecvențe, după un timp, a intensității de aglutinare a celulelor acoperite cu IgG.
3. Metodologia de executare inadecvată a reacției poate genera interpretarea incorectă a testelor slab reactogene ca fiind rezultat negativ. Cota testelor pozitive care pot fi interpretate drept negative constituie 5–60%, iar rezultatele obținute nu depind de experiența personalului care a efectuat testarea. Iată de ce personalul laboratoarelor se confruntă adesea cu dificultăți importante de monitorizare, apreciere și interpretare a rezultatelor slab pozitive.
4. Reagenții antiglobulinici devin inactivi și când sunt păstrați inadecvat, la contaminare bacteriană și cu ser uman, în urma congelării. Contaminarea cu ser uman conduce la neutralizarea parțială sau totală a reagentului antiglobulinic. Scăderea activității nu întotdeauna poate fi apreciată vizual, fiind evidentă doar în absența aglutinării în proba martor cu hematiile acoperite cu IgG. Neutralizarea parțială poate rămâne uneori neobservată, în special atunci când pe celulele martor este prezentă o cantitate majoră de IgG.
5. Utilizarea reagenților antiglobulinici umani colorați permite detecția prezenței pe membrana celulară a globulinelor, dar nu și aprecierea gradului de diminuare a activității acestora.
6. Un factor important pentru veracitatea rezultatelor îl constituie centrifugarea corectă a reactanților. Realizarea ei insuficientă nu asigură condiții optime pentru aglutinare, pe când centrifugarea intensivă conduce la formarea sedimentelor celulare dense și la resuspendarea ulterioară aglutinatele instabile se vor distruge.
7. Concentrația majoră de hematii poate duce la afișarea reacțiilor slab evidente, pe când la un număr minor de eritrocite vizibilizarea și monitorizarea aglutinării este dificilă.

8. Indicii scăzuți ai pH-lui medului salin (reagenții comercializați) pot influența sensibilitatea testului antiglobulinic. Soluția-tampon fosfat cu pH 7,0–7,2 este considerată cea mai optimă pentru reacție.
9. Concentrația majoră de paraproteină IgG în serul pacientului poate inhiba anti-IgG chiar după multiple lavaje. Acest fenomen poate fi exclus prin realizarea tuturor etapelor la temperatura +37°C sau prin incubarea mostrei la 4°C pe parcursul nopții cu centrifugarea ulterioară la rece și separarea supernatantului de ser sau prin congelarea paraproteinei până la testare.

**Notă:** suplimentarea testelor antiglobulinice negative cu celule acoperite cu IgG pentru detectarea Ac și testarea *cross-match* nu asigură evidențierea tuturor rezultatelor fals negative. Nu pot fi excluse problemele elucidate în pct. 3, 6, 7 prin utilizarea probelor martor. Referitor la alte puncte utilizarea celulelor cu surplus major de IgG pe suprafață reduce din veridicitatea aprecierii hipoactivității antiglobulinei umane.

**Rezultatele fals-negative în TAD.** În testul antiglobulinic direct se pot implica și alte cauze de rezultate fals-negative, cum ar fi:

1. Numărul minor de molecule IgG (< 200–500) pe suprafața membranei celulare;
2. La aprecierea rezultatelor testului imediat după centrifugare celulele acoperite cu componentii complementului pot să nu se aglutineze. Pentru detecția completă a complementului se recomandă incubarea de 5 min la temperatura camerei și centrifugarea ulterioară. În cazul dat rezultatul negativ se va modifica în pozitiv, dacă eritrocitele sunt acoperite cu complement. Dar și eritrocitele acoperite cu IgG după acest termen de incubare pot să reacționeze mai slab decât la citirea imediată a rezultatelor. Aprecierea rezultatelor după incubare niciodată nu trebuie efectuată în locul celei cu citire imediată: în cazul dat mai optimal este să se realizeze testul paralel în 2 tuburi cu fixarea rezultatelor după centrifugare (proba 1) și după incubare (proba 2).

**Rezultatele fals-negative în TAI** se pot afișa în următoarele cazuri:

1. Păstrarea incorectă a hematiilor și serului (scăderea activității serului, hemoliza eritrocitelor) influențate de temperatură;
2. Unele mostre rare (anti-Jk<sup>a</sup> și anti-Jk<sup>b</sup>) pot fi testate numai cu antiglobulina polispecifică umană și în prezența complementului activ. Majoritatea anticoagulanților elimină ionii Ca<sup>2+</sup> și Mg<sup>2+</sup> necesari pentru fixarea



complementului. Uneori prin utilizarea plasmei pentru cercetare în locul serului acești Ac rar întâlniți nu vor fi identificați. Serurile păstrate timp îndelungat și incorect denotă activitatea insuficientă a complementului.

**Rezultatele fals-pozitive în testul antiglobulinic Coombs** se pot realiza în următoarele circumstanțe:

1. Contaminarea sticlăriei care poate induce aglomerarea celulelor. Dacă rezultatele cu toate mostrele sanguine sunt slab reactogene, trebuie folosite alte tuburi.
2. Eritrocitele ar putea fi aglutinate până la spălare și adăugarea serului antiglobulinic uman, deoarece în mostrele care conțin anticorpi *a frigore* cu activitate majoră eritrocitele pot forma aglutinate, inclusiv la temperatura camerei sau chiar la temperaturi mai joase. Deci până la suplimentarea materialului imunoreactogen se va aprecia starea eritrocitelor: unii Ac induc aglutinarea directă a eritrocitelor fără concursul antiglobulinei umane, ceea ce poate conduce la interpretarea greșită a aglutinării după suplimentarea antiglobulinei umane, ca indicator al prezenței IgG sau C pe suprafața eritrocitelor.
3. Centrifugarea intensivă poate determina formarea unui precipitat celular dens, iar corpusculii sedimentului resuspendat insuficient pot fi interpretați ca aglutinate.

**Rezultate fals-pozitive în TAD** mai pot fi înregistrate și în cazurile când:

1. Componentul C4 se leagă cu eritrocitele cheagului sanguin și autoaglutininele (naturale, complement activatoare *a frigore*), deseori prezente în ser, și astfel pot induce reacția de aglutinare. În cazul dat componenții C s-au fixat pe celule nu *in vivo*, ci la păstrare *in vitro*. De aceea în TAD trebuie utilizate mostrele eritrocitare colectate cu anticoagulanți.
2. Eritrocitele mostrelor colectate în tuburi cu silicon (gel) în 13% cazuri dau rezultate fals-pozitive în TAD datorită fixării complementului.
3. Complementul poate să se fixeze pe celulele mostrelor colectate din sistemele infuzionale care conțin glucoză. Reacții mai expresive se observă la utilizarea acelor cu diametru mare sau la colectarea probelor în volum mai mic de 0,5 ml.

**Rezultate fals-pozitive în TAI.** Mostrele eritrocitare care dau rezultat pozitiv în TAD induc aglutinarea în fiecare și orice TAI. Eritrocitele

acoperite cu IgG, ca regulă, nu pot fi testate cu siguranță la utilizarea reagenților antiglobulinici. Principiile de eliminare a IgG de pe suprafața eritrocitelor pozitive în TAD sunt multiple. Utilizând diferite metode, în majoritatea cazurilor se elimină o cantitate considerabilă de IgG, ce asigură realizarea testării cu antiser, proces urmat de necesitatea suplimentării antiglobulinei umane, dar ele trebuie minuțios controlate. La utilizarea soluțiilor care conțin enzime proteolitice și reagent tiolic Ag grupului sanguin Kell, Lw<sup>a</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S, s. Yt<sup>a</sup>, Ch, Rg, Pr, Tn se denaturează. Această metodă poate fi utilizată doar în cazul când alte metode de eliminare a IgG (prelucrarea la temperatură, utilizarea clorochinei) sunt ineficace. Orice principiu utilizat pentru eliminarea IgG poate duce la modificarea structurii Ag eritrocitar și influențează rezultatele testării cu reagenții respectivi (îndeosebi sistemul sanguin Kell). Este important de prelucrat celulele martor și cele testate concomitent, testul fiind realizat în paralel.

**Reacția de precipitare** este utilizată la studiul Ag solubili și Ac, operând tehnici performante ca imunodifuzia în gel sau imunoelectroforeza. Pentru formarea precipitatului este necesar coraportul optimal al Ac și Ag, în caz contrar chiar prezența Ag solubil și Ac specifici acestui Ag nu asigură precipitarea. Dacă există un surplus de Ac, atunci numărul de epitopi prezenți la Ag sunt insuficienți pentru formarea legăturilor necesare cu moleculele Ac și apariția structurii de rețele (precipitat). Cu toate că complexele Ag – Ac se formează, numărul lor este insuficient pentru formarea rețelei vizibile, acest fenomen fiind denumit *prozonă*.

**Hemoliza eritrocitară** este fenomenul de alterare a celulelor cu eliberarea hemoglobulinei. Hemoliza indusă de Ac *in vitro* depinde de activitatea complementului care alterează membrana celulară. În cazul absenței complementului în ser, plasmă (la eliminarea cationilor Ca<sup>2+</sup> și Mg<sup>2+</sup> prin utilizarea anticoagulanților) hemoliza nu se manifestă. La testarea Ac anti-antigene eritrocitare hemoliza este apreciată ca rezultat pozitiv, deoarece interacțiunea lor cu Ag activează cascada complementară. Colorarea supernatantului în roșu sau roz în test-sistemele ce includ Ac și hematii este foarte sugestivă, deoarece anume acești Ac manifestă acțiune litică *in vitro* și anume ei induc cu cea mai mare probabilitate hemoliza intravasculară la pacienții cu transfuzie sanguină.

## Metodele netradiționale de detecție a reacției „antigen – anticorp”

**Inhibarea aglutinării.** Prezența Ag sau Ac în testul de inhibiție a aglutinării se apreciază după capacitatea lor de a stopa aglutinarea în sistemul cu reagenți cunoscuți. De exemplu, saliva „secretorilor” conține Ag solubile ale grupelor sanguine, care reacționează cu Ac anti-A, anti-B sau anti-H. Sistemul indicator prezintă Ac în diluții standard, care aglutinează celulele respective. Dacă în salivă se conțin substanțele de grup sanguin, incubarea salivei cu Ac respectivi va bloca parțial sau complet aglutinarea celulelor introduse în amestecul incubat. Absența aglutinării indică prezența Ag solubil în materialul testat. Aglutinarea celulelor indicator se consideră ca rezultat negativ.

**Imunofluorescența** este o tehnică care permite identificarea și localizarea Ag intracelular sau pe suprafața celulei. Fluorocromii (fluoresceina sau ficoeritrina) pot fi atașați la molecula Ac fără modificarea specificității și capacității de a se lega cu Ag. Legarea Ag celulare cu Ac marcați cu fluorocromi induce luminescența galben-verzuie sau roșie a celulelor. Anticorpilor imunofluorescenți pot fi utilizați și în metoda directă, și în cea indirectă. În testul indirect serul antiglobulinic marcat se adaugă la celulele incubate cu Ac nemarcați de specificitate cunoscută. Primar metoda imunofluorescenței se utiliza pentru detecția Ag pe limfocite sau în țesuturi. Ulterior Ac imunofluorescenți s-au utilizat în flaucitometrie pentru determinarea cantitativă a hemoragiilor fetο-materne, pentru identificarea celulelor transplantate și monitorizarea viabilității lor la recipienți, pentru măsurarea concentrațiilor minime de IgG fixate pe celulă, pentru diferențierea expresiei Ag de grup sanguin la homo- și heterozigoți.

**Analiza radioimună (RIA).** Antigenele sau anticorpilor sunt marcați cu radionindicatori pentru utilizare în varianta directă și indirectă a metodei. Radiomarkerii nu influențează specificitatea, dar permit aprecierea cantitativă a Ac legați. În varianta indirectă a RIA prezența și cantitatea Ag poate fi apreciată prin incubarea materialului cercetat cu Ag nemarcat în faza solidă. Dacă Ag respectiv este prezent, el se leagă cu Ac imobilizat pe fază solidă. O anumită cantitate a Ac marcați cu radionuclizi de aceeași specificitate poate să se lege de Ag imobilizat, numărul lor fiind apreciat cu ajutorul numărătorii gama.

Marcarea cu radionuclizi se practică și în metoda de legare concurență, când Ag reacționează cu Ac marcați și nemarcați de aceeași specificitate. Calcularea cotei cantitative cunoscute de material marcat și legat în test-sistem permite aprecierea cantității de material nemarcat restant în acest sistem. Se utilizează pentru identificarea Ac la agenții cu transmitere sanguină.

**Analiza imunoenzimatică (ELISA).** Se utilizează atât pentru aprecierea Ag, cât și a Ac. Enzimele (fosfataza alcalină, peroxidaza) sunt atașate la molecula Ac, fără a li se modifica specificitatea și activitatea funcțională. Fermentul deține aici rolul de marker, activitatea cărui este măsurată după modificarea densității optice. Prioritatea metodei date față de RIA este dată de stabilitatea mai evidentă a enzimelor comparativ cu radiomarcheii, în plus este mai puțin costisitoare, nu cere securitate specială; activitatea lor este mai simplu de măsurat; în schimb sensibilitatea metodei ELISA și RIA sunt comparabile. ELISA se utilizează pentru detecția Ac la agenții hemotransmisibili, pentru aprecierea și măsurarea cantitativă a IgG legate de celulă, pentru diagnosticul hemoragiilor fetο-materne. La cercetarea eritrocitelor metoda dată deseori este denumită test antiglobulinic imunofermențativ (ELAT).

**Testele eritrocitare de adeziune pe fază solidă.** Metodele montate pe fază solidă în microplășete au fost utilizate mult timp pentru analiza imunologică (HBsAg). În prezent sunt preferate pentru identificarea Ag eritrocitari sau Ac. În testul direct Ac sunt fixați în godeul microplășei, unde se picură eritrocite. Dacă hematiile conțin Ag respectiv, ele vor fi fixate la suprafața internă a godeului; dacă reacția „Ag – Ac” nu are loc, atunci hematiile vor sedimenta pe fundul godeului. În varianta indirectă se utilizează eritrocite cu componenta antigenică cunoscută, care sunt fixate pe suprafața godeului ce a fost în prealabil prelucrată cu poli-L-lizină sau cu aldehydă glutarică. Serul cercetat se adăoga în godeu, după care probele se incubează pentru a incita interacțiunea Ac cu Ag hematiilor. Plășetele se spală pentru înlăturarea proteinelor serice nefixate. Reacția se consideră pozitivă, dacă celulele indicator sunt atașate la peretele godeului. Dacă ele sedimentează la fundul godeului, reacția se consideră negativă, ceea ce indică absența reacției antigen-anticorp.

**Testul în gel** a fost elaborat în 1986 de Lapierre. Eprubetele standard sunt înlocuite cu 6 microtuburi, în care se include așa-numita „cartelă

gel". Formatul cartelei permite centrifugarea concomitentă a 6 diferite test-sisteme antigen-anticorp. Particulele de gel joacă rolul unui filtru, care reține aglutinatele eritrocitare la centrifugarea cartelei. Aglutinatele mai mari rămân în partea de sus a microtubului, cele mai mici se rețin în partea de jos, iar eritrocitele neaglutinate trec prin gel de-a lungul tubului și sedimentează la fundul acestuia. La utilizarea reagenților respectivi metoda dată este folosită pentru detecția și identificarea Ag membranei celulare sau a Ac serici, de asemenea pentru testarea „*cross-match*". Este o metodă performantă care exclude multe din erorile posibile la testările sanguine.

## CAPITOLUL IV

---

---

### ANTIGENELE ERITROCITARE ALE SISTEMULUI AB0 ȘI CARACTERISTICA ANTICORPILOR ACESTUI SISTEM

În identificarea și descifrarea antigenelor eritrocitare este primordial aportul lui K. Landsteiner (1901), care în baza unui studiu asupra interacțiunii dintre hematiile și serurile recoltate de la diferite persoane a constatat existența a 2 tipuri de Ag, supranumite A și B. Observând proprietățile hematiilor și serurilor de a manifesta reacția de hemaglutinare, autorul conchide că oamenii pot fi repartizați în 3 grupe sanguine (A, B, C). Ulterior grupul C a fost semnatificat ca 0 și presupune absența antigenelor A și B și nu prezența antigenului 0. În 1907 I. Ianschi constata existența grupului sanguin AB.

Sistemul sanguin AB0 a fost cel depistat primar și până în prezent este de cea mai mare valoare pentru transfuziologie. Este unicul sistem în care anticorpii anti – antigenele respective sunt permanent prezente în serul individului normal. Prezența acestor anticorpi implică fenomenul de hemoliză intravasculară și alte manifestări ale reacției hemolitice acute la transfuzia de sânge incompatibil după sistemul AB0. De aceea testarea compatibilității donatorului și recipientului după sistemul AB0 este suportul investigațiilor pretransfuzionale.

Un element important și caracteristic pentru sistemul sanguin AB0 este prezența în ser a anticorpilor (izohemaglutininelor) anti-A și anti-B naturali, cu excepția persoanelor cu grupul sanguin AB. Anticorpii anti-Ag ale altor sisteme eritrocitare nu sunt congenitali și prezintă, cu unele mici excepții, niște produse ale stimulului antigenic.

În funcție de prezența sau absența pe eritrocite a antigenelor (aglutinogenelor) A și B și a anticorpilor (aglutininelor) anti-A și anti-B în serul sanguin distingem 4 grupe sanguine (tab. 9).

**Antigenele și anticorpii specifici grupelor sanguine după sistemul AB0**

Criterii	Grup sanguin			
	0	A	B	AB
Antigene eritrocitare	–	A	B	A, B
Anticorpi în serul sanguin	anti-A, anti-B	anti-B	anti-A	–

Sunt unanim acceptate următoarele semnificații ale anticorpilor sistemului AB0: anti-A și anti-B, care au substituit izohemaglutininele  $\alpha$  și  $\beta$ . Conform clasificării internaționale a grupelor sanguine după sistemul AB0 pentru semnificarea lor se utilizează numai literele A, B, AB și 0 și nu se indică cifrele I, II, III și IV.

**Caracteristica aglutinogenelor A și B**

Apariția antigenelor sistemului AB0 în eritrocite la făt se constată precoce (la a 37-a zi de dezvoltare embrionară), dar stabilirea cantitativă a proprietăților antigenice și imunogene se poate evalua doar la 2–4 ani și rămâne constantă pe parcursul întregii vieți. Persoanele aparent sănătoase pot dispune de Ag A și/sau B. Substanța H care se găsește în eritrocite nu aparține sistemului AB0 și este specificată într-un sistem separat și, anume, sistemul H. Antigenul H este precursorul antigenelor A și B, fiind depistat în cantități majore pe hematiile de grup sanguin 0.

Ag A, B, H sunt nu doar structuri eritrocitare, ele fiind prezente în diverse concentrații în majoritatea celulelor tisulare ale organismului, în trombocite, secrete și lichide biologice. Varianta antigenelor membrana-re este insolubilă în apă, pe când cea prezentă în lichidele biologice este solubilă, posedă specificități de grup AB0 și se înregistrează la circa 78% indivizi, numiți „secretori”. Subiecții care dețin Ag respective numai în eritrocite și țesuturi au fost numiți „nesecretori”, ei având o cotă de înregistrare de 22%.

Capacitatea de a transfera antigenele de grup în secrete este o caracteristică congenitală și este controlată de 2 gene: *Se* și *se*. Gena *Se* este dominantă, pe când *se* – recesivă. Indivizii care posedă genele *SeSe* sau *Sese* sunt “secretori”, iar cei cu *sese* – sunt “nesecretori”. Genele secretoare acționează prin scindarea legăturilor lipido-polizaharide ale antigenelor A și B tisulare, iar drept rezultat partea polizaharidă este eliberată în lichidul

tisular. Genele secretoare dețin un rol important și în sinteza antigenelor sistemului Lewis.

Pe membrana unui eritrocit se conțin până la  $10^6$  determinante antigenice (epitopi) ale antigenelor A și B. Datorită faptului, că fragmentele imunoactive ale acestor antigene sunt amplasate pe suprafața eritrocitului, ele sunt ușor accesibile pentru anticorpi și reacția de hemaglutinare dintre antigenele sistemului ABO și anticorpii specifici se realizează în mediul salin, fără a necesita suplimentarea cu soluții coloidale.

După structura lor chimică antigenele A, B, H sunt glicolipide și glicoproteine, având în principiu aceeași componență chimică, iar specificitatea lor imunologică este asigurată de zaharidele terminale ancorate pe lanțul de bază:  $\alpha$ -N-acetilgalactozamina pentru antigenul A, D-galactoza pentru antigenul B și L-fucoza – pentru antigenul H.

Glicolipidele purtătoare de oligozaharide A și B intră în componența membranei eritrocitelor, a celulelor epiteliale și endoteliale, iar în formă solubilă sunt prezente și în plasma sanguină. Saliva conține molecule de glicoproteine care la persoanele secretoare pot comporta oligozaharide identice. Oligozaharidele A și B libere (nelegate de molecula purtătoare a proteinelor și lipidelor) sunt testate de asemenea în lapte sau urină.

Genele a 3 loci separați (*ABO*, *Hh* și *Sese*) controlează prezența și amplasarea antigenelor A și B. Trei alele (*A*, *B* și *O*) se găsesc în locusul *ABO* pe cromozomul 9. Genele *A* și *B* codifică sinteza glicoziltransferazelor – enzime care asigură formarea antigenelor A și B, transportând resturile glicozile necesare pentru formarea determinantelor antigenice. Genele *A*, *B* și *O* codifică nu Ag A și B, ci producția glicoziltransferazelor răspunzătoare de transportul resturilor glicozile necesare pentru formarea determinantei antigenice.

Gena *A* codifică producerea N-acetilgalactozoaminotransferazei, care asigură transferul N-acetilgalactozaminei, gena *B* –  $\alpha$ -galactoziltransferazei ce răspunde de transferul D-galactozei. Gena *O* se consideră afuncțională și nu codifică careva glicoziltransferaze (Ag O nu există). Pe eritrocitele persoanelor de grup sanguin 0 antigenele A și B sunt absente, deși acestea conțin o cantitate importantă de Ag H, precursorul A și B.

Determinantele antigenice sunt structurate prin atașarea resturilor de zaharide la lanțul hidrocarbonic prin concursul glicoziltransferazelor – enzime care asigură transportul resturilor de zaharide. Atașarea resturilor de zaharide maschează specificitatea serologică a antigenului H.



Diferențele dintre copii și adulți în activitatea celulară a antigenelor A, B și H sunt, posibil, datorate numărului diferit de structuri determinante ramificate pe suprafața membranei celulare. Se consideră, că eritrocitele nou-născuților poartă oligozaharide liniare, care posedă numai un fragment capabil să lege zaharidele H (ulterior și A sau B). Eritrocitele maturilor dimpotrivă posedă un număr major de oligozaharide ramificate care se transformă în substanța H, iar ulterior în Ag A sau B. Grupul sanguin 0 se caracterizează prin prezența pe eritrocite a antigenului H.

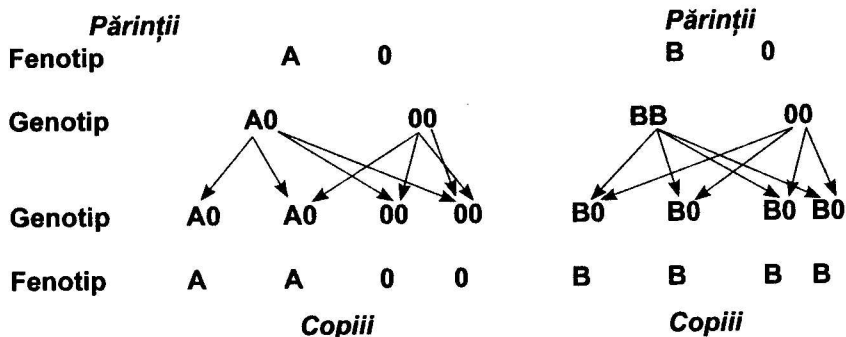
Genele A și B sunt dominante comparativ cu gena 0 și codominante una față de alta. Criteriul dominant se manifestă chiar dacă a fost moștenit numai de la unul din părinți, iar cele codominante se vor exprima în cazul moștenirii unuia de la tată, iar a celuilalt de la mamă. Gena 0 este recesivă comparativ cu genele A și B și se va manifesta la copil numai în cazul când va fi moștenită de la ambii părinți. Fenotipul și genotipul posibil sunt elucidate în tab.10 și figura 7.

Tabelul 10

Variante fenotipice și genotipice posibile ale grupelor sanguine după sistemul AB0

Fenotip (grupul sanguin)	Genotip posibil
A	AA, A0
B	BB, B0
AB	AB
0	00

Figura 7. Variante de moștenire a antigenelor de grup sanguin AB0



## Variantele antigenelor A și B.

La testarea antigenelor sistemului AB0 cu seruri standard pot apare dificultăți generate de modificarea determinantelor prezente pe membrana eritocitară. La persoanele aparent sănătoase s-a constatat heterogenitatea Ag A. S-a stabilit, că există 2 subclase mai importante de antigen A:  $A_1$  și  $A_2$ , ceea ce a sugerat existența respectivelor subgrupe sanguine. Ultimele reprezintă fenotipurile AB0, care se diferă după cantitatea antigenelor prezente pe membrana hematiilor și în saliva secretorilor. Subgrupele Ag A se întâlnesc mai frecvent și au o implicație clinică mai ponderală decât cea a Ag B. Astfel, Ag  $A_1$  se înregistrează la 80% dintre indivizii populației europene, iar  $A_2$  în 20% de cazuri. Genele  $A_1$  și  $A_2$  codifică diferite transfereze, ceea ce asigură diferențele calitative și cantitative dintre fenotipurile eritrocitare  $A_1$  și  $A_2$ .

Activitatea enzimei  $A_1$ -N-acetilgalactozamintransferazei este de 5 ori mai mare decât a N-acetilgalactozamintransferazei  $A_2$ , astfel fiind transformată o cantitate mai mare a substanței H în Ag  $A_1$ . Diferențele calitative se referă la structura biochimică a zaharidelor ( $A_1$  are o structura mai ramificată decât cea a  $A_2$ ), iar cele cantitative sunt asigurate de numărul epitopilor ( $A_1$  conține de 3 ori mai mulți epitopi decât  $A_2$ ). Există și alte diferențe dintre variantele antigenice  $A_1$  și  $A_2$  cum ar fi constanta de echilibru, viteza de disociație a complexelor antigen-anticorp etc.

Hematiile de ambele fenotipuri manifestă reacții evidente cu reagentul anti-A în testele de aglutinare directă. Diferențele serologice dintre celulele cu  $A_1$  și  $A_2$  pot fi stabilite în testele cu reagentul anti- $A_1$ , preparat din serul uman de grup B sau cu lecitine obținute din boabele *Dolichos biflorus*. La respectarea condițiilor de testare reagentul anti- $A_1$  aglutinează hematiile  $A_1$  și nu le aglutinează pe cele  $A_2$ . Aproximativ la 80% de indivizi cu grupul sanguin A sau AB hematiile sunt aglutinate de anti- $A_1$  și sunt clasificate ca  $A_1$  și, respectiv,  $A_2$ .

Celelalte 20% de persoane, eritrocitele cărora sunt aglutinate de anti-A și nu sunt aglutinate de anti- $A_1$  sunt specificate ca subgrupe  $A_2$  sau  $A_2B$ .

Anticorpii anti- $A_1$  sunt prezenți în serul sanguin la 1-8% indivizi cu fenotipul  $A_2$  și la 22-35% cu fenotipul  $A_2B$ . Acești Ac pot conduce la dificultăți în testarea Ag sistemului AB0 sau la incompatibilitate în testul „cross-mutch” cu hematiile  $A_1$  și  $A_1B$ . Anticorpii anti- $A_1$ , de regulă, reacționează mai eficient, dacă temperatura de testare este sub 37°C și sunt considerați

de valoare clinică, când reacționează la  $t$  37°C. Informația obținută la o astfel de testare este valabilă pentru mostrele care conțin anti- $A_1$ .

Au fost descrise și alte variante ale antigenului A:  $A_3$ ,  $A_x$ ,  $A_m$ ,  $A_{end}$ ,  $A_{cl}$ ,  $A_y$ , care se înregistrează foarte rar și sunt slab imunogene. Testarea acestor variante este posibilă doar la utilizarea unui ser imun anti-A cu activitate majoră sau prin intermediul testului de absorbție – eluție a anticorpilor de pe eritrocitele A. Activitatea minoră a hematiilor cu varianta antigenică A este dependentă de numărul de epitopi care interacționează cu anticorpul (*tab. 11*).

Tabelul 11

**Cantitatea determinantelor antigenice A pe hematiile adulților cu diverse variante antigenice**

Variantele antigenului A	Numărul de epitopi antigenici
$A_1$	810 000 – 1170 000
$A_2$	160 000 – 440 000
$A_3$	40 600 – 118 000
$A_x$	7 500 – 10 500
$A_{end}$	2 100 – 2 700
$A_m$	100 – 1 900
$A_{cl}$	100 – 1 400
$A_y$	100 – 1 900

De regulă, la clasificarea subgrupelor A slabe se ia în considerație intensitatea aglutinării eritrocitelor cu reagenții anti-A, anti- $A_1$ , anti- $A_1B$ , anti-H (ultimul obținut din *Ulex europeans*), prezența sau absența Ac anti- $A_1$  în ser, prezența substanțelor A și H în saliva secretorilor.

În practica transfuzională foarte rar se întâlnesc  $A_x$ ,  $A_{end}$ ,  $A_{cl}$ ,  $A_3$ . Hematiile  $A_x$  se specifică de absența aglutinării cu Ac umani anti-A ai grupului sanguin B, dar acestea sunt aglutinate de serul grupei 0 cu anti-A, B. Eritrocitele  $A_x$  pot reacționa și cu unii reagenți monoclonali anti-A de origine murină, în dependență de caracterul Ac utilizați în acest reagent. Hematiile  $A_{cl}$  nu se aglutinează de către anti-A sau anti-AB de diversă geneză și prezența Ag  $A_{cl}$  în cazul dat poate fi demonstrată prin metoda de absorbție sau eluție. Eritrocitele  $A_3$  la testare cu anti-A și anti-AB formează aglutinate minuscule printre multiplele hematii libere.

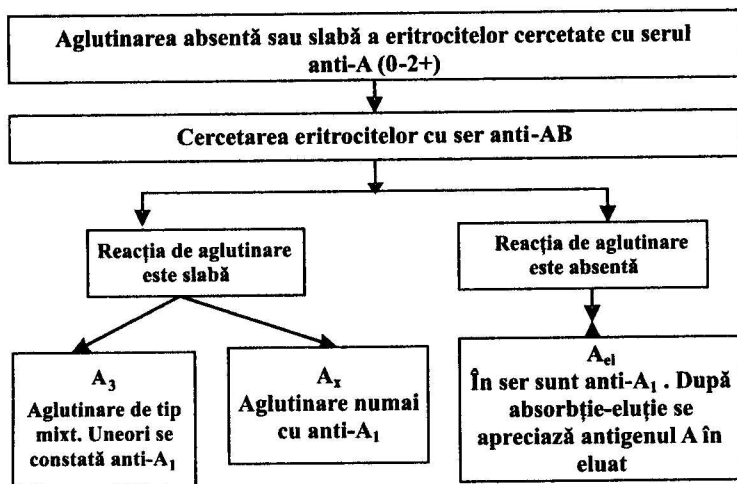
Subgrupele slabe ( $A_x$ ,  $A_{cl}$  etc.) nu pot fi apreciate cu precizie doar prin testare serologică, se impun teste specifice asupra salivei, folosirea metodelor de absorbție și elutie, investigații genealogice etc.

Alte subclase antigenice se caracterizează prin diminuarea cantitativă a antigenului H și accentuarea expresiei antigenului A. Există indivizi care conțin pe eritrocite antigenul A în formă supraexprimată (A compl.). În cazul dat hematiile sunt lipsite de substanța H și de aceea în serul acestor indivizi pot apare anticorpi anti-H. Așadar indivizii grupelor sanguine A, B, AB la care este absentă substanța H pot produce Ac anti-H, proces care face dificilă cercetarea specificității Ac: serurile acestora vor aglutina majoritatea mostrelor test-eritrocitare. După conținutul substanței H în eritrocite grupele sanguine se amplasează în următoarea cosecutiveitate:  $0 > A_3 > A_2 > A_1$ . Testarea subgrupului  $A_2$  se poate realiza și estimând caracterul interacțiunii cu anti-H, luând în considerație faptul, că anticorpii anti-H reacționează mai intensiv cu celulele  $A_2$  decât cu  $A_1$ , dat fiind conținutul mai mare de substanță H pe eritrocitele  $A_2$ .

La testarea grupei sanguine după sistemul AB0 caracterul aglutinării hematiilor care conțin varianta antigenică A este dependent de reagentul utilizat. Ac monoclonali anti-A și anti-AB se deosebesc prin capacitatea de interacțiune cu eritrocitele care dețin varianta antigenică  $A_2$ . În cazul dat este necesară standardizarea Ac monoclonali. Mai frecvent pentru detecția variantelor antigenice A sunt utilizate serurile umane și lecitina anti-  $A_1$  (fig.8).

Subgrupele B se întâlnesc și mai rar decât subgrupele A, ele fiind diferențiate în baza criteriilor comune cu cele descrise pentru subgrupele A. Printre variantele de antigene B slabe distingem:  $B_3$ ,  $B_x$ ,  $B_w$ ,  $B_m$ , ele având o frecvența minoră la populația europeană. Formarea antigenului B este realizată prin acțiunea  $\alpha$ -galactoziltransferazei asupra substanței H, și astfel variantele de antigene B slabe pot avea pe suprafață lor antigenul H. Mai frecvent varianta slab antigenică B a fost semnalată la populația chineză. Variantele antigenice B se deosebesc între ele prin caractere cantitative, adică prin intensitatea aglutinabilă și prin capacitățile de absorbție a aglutinogenului B. La secretori Ag  $B_w$  se testează în salivă și se moștenește.

**Figura 8. Algoritm de testare a variantelor antigenice A cu serurile sanguine anti-A și anti-AB umane**



Apelând la serurile standard cu activitate majoră pentru testarea apartenenței de grup a eritrocitelor B, se poate reuși evidențierea acestor aglutinogene slabe. De altfel la testarea grupelor sanguine după sistemul AB0 caracterul aglutinării eritrocitelor ce comportă variantele antigenice A și B va depinde de reagenții utilizați (tab. 12).

### **Varianța eritocitară tip Bombay (ferotipul Oh)**

Există un fenotip rar de hematii, identificat la Bombay, care se moștenește și care se caracterizează prin absența antigenelor H și AB0. Hematiile cercetate nu se aglutinează cu serurile anti-A, anti-B, anti-h, anti-0. În serul acestor indivizi se conține anticorpi anti-A, anti-B și anti-H.

Pacienților cu ferotipul Oh li se transfuzează numai sângele Oh, grație faptului că Ac acestora vor hemoliza celulele cu Ag A, B și A. La prezența fenotipului Oh va indica absența reacției la interacțiunea celulelor cu lectina anti-H.

Existența variantelor sanguine de tip Bombay trebuie luată în considerare în practica medicinei legale. Dacă se atestă prezenți Ac anti – A, anti – B și anti – H devine evidentă și apartenența de grup sanguin.

**Carcateristica reacțiile serologice realizate la persoanele  
cu fenotipurile A și B**

Fenotipul eritrocitelor	Reacția eritrocitelor cu serul anti -									Saliva secretorilor conține
	A	B	AB	H	A <sub>1</sub> lectin	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B	0	
A <sub>1</sub>	4+	0	4+	+/-	3+	0	0	4+	0	A și H
A <sub>2</sub>	3+	0	3+	3+	0	*	0	4+	0	A și H
A <sub>3</sub>	2+mf	0	2+mf	4+	0	*	0	4+	0	A și H
A <sub>end</sub>	+mf	0	+mf	4+	0/+	0	0	4+	0	H
A <sub>m</sub>	+/-	0	+	4+	0	0	0	4+	0	A și H
A <sub>x</sub>	-/+	0	1+/2+	4+	0	2+/0	0/1+	4+	0	H
A <sub>el</sub>	0	0	0	4+	0	2+/0	0	4+	0	H
B	0	4+	4+	0		4+	4+	0	0	B și H
B <sub>3</sub>	0	1+mf	2+mf	4+		4+	4+	0	0	B și H
B <sub>m</sub>	0	0	0/±	4+		4+	4+	0	0	B și H
B <sub>x</sub>	0	0/±	0/2+	4+		4+	4+	0	0	H

**Notă:** Între 1+ până la 4+ - aglutinare intensă; ± - aglutinare slabă; **mf** - aglutinare „mixed-field”, microscopic se disting aglutinatele mici și hematii libere; **0** - aglutinare absentă;

\* incidența anti - A<sub>1</sub> este diferită: la persoanele cu fenotip A<sub>2</sub> anti - A<sub>1</sub> aceștia sunt frecvenți la indivizii cu A<sub>3</sub> Ac anti - A<sub>1</sub> sunt absenți cu unele excepții.

### **Anticorpul normal și imuni de grup ai sistemului ABO**

În mod normal la om sunt prezenți Ac cu specificitate anti-antigenele A și/sau B. Distingem două categorii de anticorpi de grup: *normali*, *naturali*, care apar în procesul de formare a organismului, și *imuni* - care au rezultat din imunizări cu substanțele antigenice de grup A și/sau B. Ultimii se sintetizează în rezultatul acțiunii poligene a substanțelor cu specificitate de grup A și B asupra organismului uman: maladiile infecțioase, vaccinurile, unele produse alimentare și fitogene, sarcina heterospecifică, hemotransfuziile incompatibile. La majoritatea indivizilor Ac anti-A și anti-B din ser se prezintă sub forma unui amestec de Ac naturali și imuni (IgM și IgG).

Ac anti-A și anti-B pot fi depistați în serul sanguin uman în primele luni de viață, uneori fiind prezenți deja la naștere. Dar majoritatea Ac

prezenți în sângele ombilical sunt de geneză maternă. Producția de Ac se majorează și atinge nivelul maxim la 5-10 ani, menținându-se la un titru relativ înalt pe parcursul mai multor ani, dar cu vârsta are loc o diminuare treptată. Persoanele vârstnice au indici mai mici de expresie a Ac anti-A și anti-B decât restul adulților.

Rezultatele testării sanguine a nou-născuților sau a copiilor de până la 4-6 luni la anti-A și anti-B nu sunt concludente, deoarece o parte din Ac copilului prezintă IgG cu activitate anti-A și anti-B achiziționate transplacentar.

Există anumite corelații între titrul aglutininelor la mamă și copil. În condiții de normă titrul hemaglutininelor anti-A variază de la 1:64 până la 1:512, iar al aglutininelor anti-B se încadrează în intervalul 1:16 - 1:64. În cazuri rare aglutininele naturale pot fi exprimate atât de slab, încât se impun dificultăți la testarea lor. Au fost descrise variații de sezon ale concentrației de aglutinine anti-A și anti-B. În agamaglobulinemie Ac respectivi sunt absenți.

Anticorpul anti-A, produse de persoanele de grup sanguin B, și Ac anti-B, secretați de indivizii de grup A, sunt prezentați în majoritate de IgM, dar printre ei pot exista în cantități mai mici IgG. Deoarece IgG, spre deosebire de IgM, pot fi liber transferate prin placentă, copiii de la mame cu grup sanguin 0 au o mai mare șansă de a produce maladia hemolitică a nou-născuților decât cei proveniți din mame cu grup sanguin A sau B. Diferențele pentru activitatea anti-A și anti-B a IgM și IgG sunt prezentate în tab.13.

Tabelul 13

**Particularitățile IgM și IgG cu activitate anti-A și anti-B**

Criterii relevante	IgM	IgG
<i>Reacțiile se intensifică:</i>		
- la scăderea temperaturii	da	nu
- cu hematiile prelucrate cu enzime	da	da
Sunt inhibate ușor cu antigenele A sau B solubile	da	nu
Pot fi inhibate cu 2-mercaptoetanol, DDT	da	nu
Predomină la donatorii neimunizați ai grupelor sangvine A și B	da	nu

Anticorpul de tip IgM și IgG cu activitate anti-A și anti-B aglutinează eritrocitele la temperatura 20-24°C sau mai puțin și activează sistemul complementului la 37°C. Activitatea complementară a acestor Ac de a he-

moliza eritrocitele se manifestă, dacă testarea include incubarea la 37°C. Serul unor pacienți sau donatori poate induce hemoliza eritrocitelor ABO – incompatibile și la temperaturi de sub 37°C. Liza celulară este absentă la testare în prezența EDTA sau a altor reagenți care stopează activarea sistemului complementar sau când în test se utilizează plasma sanguină

### **Anticorpii anti-A, anti -B (serul de grup 0)**

Serul persoanelor cu grupul sanguin 0 conține Ac anti-A și anti-B, care interacționează atât cu hematiile ce conțin Ag A, cât și cu cele care conțin Ag B, specificitatea respectivă rămânând stabilă chiar și după absorbție diferențiată. Saliva secretorilor, atât cu substanța A cât și cu substanța B, inhibă activitatea Ac anti-Ag eritrocitare de tip A și B.

Serul de grup 0 se utilizează pentru prepararea reagenților de grup cu forță majoră de aglutinare a celulelor A și B. Reagenții care conțin amestec de anticorpi monoclonali de asemenea aglutinează celulele cu Ag A și B precum orice variantă de Ac anti-A și anti-B diferențiază facil hematiile celor trei grupe sanguine de grupul 0, deoarece (în dependență de mostra Ac monoclonali selectată) ei sunt capabili să reacționeze mai manifest și cu hematiile de fenotip slab exprimat, spre deosebire de Ac naturali umani.

**Anticorpii anti-A<sub>1</sub>** S-a constatat că Ac prezenți la persoanele de grup B pot fi subdivizați în componentele anti-A<sub>1</sub> și anti-A<sub>2</sub>. Serul nativ de grup B aglutinează hematiile A<sub>1</sub> și A<sub>2</sub>, iar după absorbția cu celulele A<sub>2</sub>, serul de grup B reacționează exclusiv cu hematiile A<sub>1</sub>. Diferențele de expresie a Ag A pe celulele A<sub>1</sub> și A<sub>2</sub> sunt mai degrabă cantitative decât calitative. Uneori Ac anti- A<sub>1</sub> pot fi identificați în serul indivizilor cu fenotipul A<sub>2</sub> sau cu alte fenotipuri ale subgrupului A. Un reagent eficient pentru diferențierea Ag A<sub>1</sub> și A<sub>2</sub> s-a elaborat din lecitinele extrase din *Dolichos biflorus*, care într-o diluție nu aglutinează celulele A<sub>2</sub> și astfel poate fi utilizat în calitate de reagent anti-A<sub>1</sub>.

**Fenotipul B(A).** La unii indivizi de grup sanguin B eritrocitele sunt aglutinate de reagentul anti-A care conține anticorpi monoclonali de murine MH04. La aceste persoane s-a constatat hiperactivitatea galactoziltransferazei codificată de gena B. Fenotipul acestui grup a fost semnatificat ca B (A). Identificarea acestui fenotip, de regulă, se efectuează fără utilizarea reagentului monoclonal anti-A, cu care hematiile B(A) reacționează divers. În majoritatea cazurilor se observă o reacție slabă, iar aglutinatele



sunt mai frecvent instabile, disociază ușor, cu toate că uneori reacția s-a manifestat de 2+. Serul acestor indivizi aglutinează celulele A<sub>1</sub> și A<sub>2</sub>, astfel că, exceptând nou-născuții și persoanele imunocompromise, testarea serului va trebui să evidențieze diferențele între acest fenotip și fenotipul AB, în care subgrupul A presupune prezența Ac anti-A<sub>1</sub>. O confirmare definitivă se poate reuși numai prin studiul structural al transferazelor sau prin analiza secvențială a nucleotidelor. Transferaza GalNAc este prezentă în serul A sub B (A sub B-) și absentă în serul persoanelor cu fenotipul B (A). Transferaza care determină fenotipul B (A), spre deosebire de transferaza B, are o modificare aminoacidă în poziția 235, după care se deosebesc transferazele A<sub>1</sub> și B. În secvența aminoacidă a transferazei B (A) în poziția 235 este prezentă glicina, detaliu specific și pentru transferaza A<sub>1</sub>.

### Testarea AB0 standard

Cercetarea Ag, realizată prin intermediul Ac anti-A și anti-B, a primit denumirea de testare directă sau eritocitară. Utilizarea reagenților eritocitari A<sub>1</sub> și B pentru detecția Ac anti-A și anti-B în ser se numește testare serică.

Testarea standard include testarea hematiilor și serului, de altfel, fiecare din aceste teste servește ca martor unul pentru celălalt (tab. 14).

Tabelul 14

Testarea AB0 standard

Reacția eritrocitelor testate cu anticorpii		Reacția serului cu hematiile standard			Grup sanguin dedus
Anti-A	anti-B	A <sub>1</sub>	B	0	
0	0	+	+	0	0
+	0	0	+	0	A
0	+	+	0	0	B
+	+	0	0	0	AB

**Notă:** + aglutinare prezentă; 0 – aglutinare absentă.

Pentru confirmarea apartenenței după AB0 a donatorilor, pentru care deja s-a efectuat tipizarea, la fel și pentru examinarea copiilor de sub 4 luni se permite numai testarea AB0 pe hematii. Vezi metodologia și tehnica de testare a sistemului AB0 în anexe.

Unii reagenți folosiți pentru tipizarea AB0 a hematiilor sunt preparați din serurile persoanelor stimulate cu substanțele sanguine de grup A și B, pentru obținerea unui titru mai înalt de Ac. Alți reagenți sunt preparați în baza Ac monoclonali. Ambele tipuri de reagenți aglutinează majoritatea hematiilor antigenpozitive la interacțiune dezvoltată direct, chiar fără centrifugare.

### **Testarea AB0 nestandard**

La tipizarea sistemului AB0 în calitatea de reagenți suplimentari se poate utiliza serul anti-AB, pentru testarea hematiilor și A<sub>2</sub>, sau hematiile de grup 0 – pentru testarea serului. Unii autori consideră că testarea de rutină cu Ac anti-AB este mai eficientă pentru detecția Ag slab expresiați decât dacă se folosesc anti-A sau anti-B. Alții, dimpotrivă, precizează, că în subgrupele A slabe doar Ax sunt evidențiate cu Ac anti-A, B umane prin incubarea serului și celulelor la t încăperii curs de 10–60 min. Unele amestecuri de Ac monoclonali cu specificitate anti-A reacționează evident cu hematiile subgrupelor slabe în testele cu centrifugare imediată. Dacă producătorii recomandă utilizarea reagentului anti-A pentru detecția subgrupelor slabe, aceasta înseamnă că a fost demonstrată capacitatea reagentului dat de a reacționa cu eritrocitele Ax. Unele seturi comerciale de celule recomandate pentru testarea serurilor conțin eritrocite A<sub>1</sub>, B și A<sub>2</sub>. Hematiile A<sub>2</sub> sunt predestinate pentru facilitarea aprecierii anti- A<sub>1</sub> în mostrele serice, care au manifestat criterii specifice subgrupului A. Deoarece majoritatea mostrelor serice ale grupului sanguin A nu conțin anti-A<sub>1</sub>, utilizarea de rutină a acestui reagent nu este indicată în cazurile când nu există divergențe la testarea eritrocitelor și serului. Celulele A<sub>2</sub> pot fi utilizate pentru testarea diferențiată a mostrelor donatorului sau pacientului, care conțin anti-A<sub>1</sub>, iar prezența acestui reagent face testarea mai comodă. De menționat necesitatea de a studia atent instrucțiunile de utilizare a reagenților AB0 de la producători, deoarece acestea pot să difere după activitatea și specificitatea lor.

### **Divergențele posibile la testarea serului și hematiilor**

Divergențele de tipizare a grupului sanguin pot apare, când rezultatele testelor eritrocitare nu corespund cu cele serice. Rezultatele se fixează, dar interpretarea trebuie efectuată numai după clarificarea cauzelor necoresponderii. Dacă mostra este colectată din sângele donatorului, acesta nu

poate fi utilizat până la stabilirea cauzei rezultatelor discordante. Dacă se testează sângele recipientului potențial, atunci până la finisarea cercetării pot fi utilizate hematiile de grup 0 cu respectiva apartenență Rh. Este important ca până la transfuzie de la pacient să se recolteze cantitatea de sânge necesară pentru finisarea cercetărilor ulterioare.

Cauza rezultatelor discordante poate fi dependentă de seruri, eritrocite, dificultățile apărute la testare, erorile tehnice etc. Divergențe se constată și la obținerea rezultatelor negative, când se așteptau probe pozitive și invers.

*Rezultate falsnegative* pot apare în urma erorilor la:

- Suplimentarea reagentului sau serului testat în tub;
- Identificarea hemolizei ca rezultat pozitiv;
- Realizarea unui coraport incorect dintre ser (reagent) și eritrocite;
- Centrifugarea îndelungată a tuburilor;
- Incubarea la temperaturi de 20–24°C și mai puțin;
- Înregistrarea și interpretarea incorectă a rezultatelor testului.

*Rezultatele falspozitive* pot fi datorate:

- centrifugării îndelungate a tuburilor;
- utilizării reagenților contaminați;
- utilizării sticlăriei murdare;
- înregistrării și interpretării incorecte a rezultatelor testării.

### ***Dificultăți de testare a hematiilor dependente de mostră***

La tipizarea hematiilor se pot manifesta rezultate neașteptate din cauza că:

1. În sângele pacientului cu multiple transfuzii sau cu transplant medular pot circula eritrocite aparținente concomitent la câteva grupe sanguine după AB0, iar un astfel de fenomen a fost supranumit himeră transfuzională sau de transplant;
2. Hematiile persoanelor cu diferite gene *A* și *B* comportă uneori Ag slab exprimate. Minorizarea expresiei poate avea loc la pacienții cu leucemie și alte tumori maligne, iar în aceste situații testele de aglutinare cu reagenții anti-*A* și anti-*B* pot să nu realizeze rezultatele așteptate;
3. Modificările structurale ale membranei eritrocitare moștenite sau adaptive pot conduce la poliaglutinare. Aceste eritrocite pot fi aglutinate de reagenții anti-*A*, anti-*B* sau de ambii;

4. Concentrațiile anormale de proteine serice, prezența în ser a macromoleculilor sau în proba de sânge ombilical a gelului Warton (*Warton's jelly*) poate genera agregarea nespecifică a celulelor suspendate în ser, care se poate interpreta eronat ca fiind aglutinare;
5. Concentrațiile majore de substanță de grup sanguin A sau B în ser pot reacționa cu Ac reagentului și îi neutralizează, iar aceasta poate conduce la rezultate negative ale reacției cu eritrocitele suspendate în ser sau plasma sanguină;
6. Serul poate conține Ac care interacționează cu coloranții utilizați pentru colorarea reagenților anti-A și anti-B. Dacă pentru testare se utilizează hematiile suspendate în ser sau plasmă, acești Ac pot manifesta o aglutinare falspozitivă;
7. Pacienții cu autoaglutinine *a frigore* pot conține eritrocite acoperite masiv cu Ac, ceea ce conduce la aglutinarea lor spontană în prezența diluentului, indiferent de specificitatea Ac reagentului.

### **Dificultăți la testarea serului dependente de mostră**

Și la tipizarea serului se pot obține rezultate false:

1. În cazul utilizării plasmei sau serului sanguin incomplet coagulat la testarea AB0 (coagulele mici de fibrină pot fi interpretate ca aglutinate);
2. Concentrațiile anormale de proteine sau modificarea coraportului proteinelor serice, substanțele de contrast administrate i/v, substituenții de plasmă înalt moleculari pot induce agregarea nespecifică a eritrocitelor, care uneori se diferențiază greu de aglutinarea reală;
3. Ac diferiți de cei anti-A și anti-B în mostră testată pot aglutina hematiile reagentului A<sub>1</sub> sau B, dacă acestea posedă Ag respectivi;
4. Ac anti-componentele diluentului, utilizat pentru păstrarea reagenților eritrocitari A<sub>1</sub> și B, pot aglutina celulele independent de Ag și Ac sistemului AB0;
5. La pacienții cu imunodeficiență dependentă de maladie sau tratamentul administrat, nivelul Ig în unele cazuri poate fi atât de mic, încât activitatea aglutininelor AB0 este diminuată sau total absentă. Mostrele sanguine ale pacienților la care conținutul Ac s-a redus cu vârsta sau cele ale pacienților la care concentrația Ac s-a micșorat evident în urma procedurilor de substituire a plasmei pot releva de asemenea aglutinine slabe;

6. Reacții negative sau slab manifeste se observă și la testarea serului copiilor de până la 4-6 luni de viață. Serul nou-născutului, de regulă, nu se testează, deoarece Ac prezenți la el sunt de origine maternă;
7. Titrul foarte înalt de Ac anti-A și anti-B fixatori ai complementului induce legarea intensivă a moleculelor componentului complementar C1 la suprafața eritrocitelor, care conduce la blocarea Ag membranari și aglutinarea nu se manifestă. Acest fenomen a fost descris la testarea serului cu utilizarea suspensiei eritrocitare în diluant fără EDTA;
8. Dacă pacientului i s-a transplatat măduvă osoasă compatibilă, dar nu identică după grupul AB0, atunci Ac serici nu vor corespunde Ag eritrocitari. De exemplu, la transplantul măduvei osoase de grup 0 unui individ de grup A, la acesta din urmă vor circula hematiile 0, iar în ser se vor secreta numai Ac anti-B;
9. Transfuzia recentă de componenți plasmatici care conțin aglutinine AB0 poate induce reacții neașteptate.

### **Soluționarea contradicțiilor de testare a sistemului AB0**

Pentru rezolvarea acestor inadvertențe se efectuează testarea repetată a mostrei date. Dacă primar s-a utilizat suspensia de eritrocite în plasmă sau ser, atunci la cercetarea repetată se recomandă utilizarea suspensiei de celule spălate în soluție salină. Dacă divergențele din nou sunt prezente, atunci se efectuează următoarele manevre:

1. Recoltarea unei mostre sanguine noi, care se testează și astfel contradicțiile dependente de contaminarea probelor sau marcarea incorectă dispar;
2. Spălarea celulelor testate și a celulelor reagentului pentru înlăturarea tuturor componenților serici și chimici capabili să inducă reacții pozitive neașteptate;
3. Testarea eritrocitelor cu Ac anti-A, B, anti- A<sub>1</sub> sau anti-H în funcție de problema concretă.
4. Dacă se presupune prezența anti- A<sub>1</sub>, serul se testează cu utilizarea câtorva mostre eritrocitare A<sub>2</sub>.
5. Screening-ul repetat al Ac cu utilizarea eritrocitelor de grup 0 pentru detecția efectelor nespecifice ale aloanticorpilor *a frigore*.
6. Pentru detecția Ag slabe sau Ac test-reacția se efectuează la *t* camerei timp de minimum 30 min. Incubația poate fi efectuată și la o tempera-

tură mai joasă dar cu realizarea testelor în paralel cu celulele grupei 0 și autologe pentru evidențierea interferenței aglutininelor cu celulele de grup 0 și autologe pentru evidențierea interferenței aglutininelor cu spectru larg, cum ar fi anti-I sau anti-H, care reacționează cu hematiile tuturor adulților.

### **Caracteristica anticorpilor anti-A și anti-B**

Anticorpicii naturali anti-A și anti-B aparțin imunoglobulinelor de clasa M, pe când cei imuni se referă la clasa G. Ultimii se sintetizează în rezultatul acțiunii poligene a substanțelor cu specificitate de grup A și B asupra organismului uman: maladiile infecțioase, vaccinurile, unele produse alimentare și fitogene, sarcina heterospecifică, hemotransfuziile incompatibile. La majoritatea oamenilor anticorpicii anti-A și anti-B din ser se prezintă sub forma unui amestec de anticorpi naturali și imuni (imunoglobuline M și G). Specificitatea structurală a imunoglobulinelor de clasa M (structura pentameră cu 10 situsuri combinate), caracteristică anticorpilor naturali anti-A și anti-B, asigură agregarea unui număr major de hematii în reacția de aglutinare în mediul salin. Această proprietate a anticorpilor naturali este utilizată la prepararea serurilor standard pentru testarea antigenelor eritrocitare ale sistemului AB0.

Activitatea majoră a anticorpilor anti-A și anti-B semnifică implicarea lor clinică majoră în apariția complicațiilor secundare transfuziilor de sânge incompatibil după antigenii AB0. Donatorii de grup sanguin 0 care comportă IgG cu specificitate anti-A, anti-B sunt "donatorii universali periculoși", deoarece concentratul eritrocitar conține cantități minore de plasmă, care pot induce complicații posttransfuzionale severe reacționând cu eritrocitele A, B, AB ale recipientilor.

### **Soluționarea contradicțiilor dependente de absența antigenelor prognozate**

Hematiile persoanelor de grup A sau B în majoritatea cazurilor sunt aglutinate (3-4+) de Ac reagenților respectivi, iar serul sanguin al acestora în norma aglutinează (2-4+) eritrocitele A<sub>1</sub> sau B din reagenții aplicați. Cauza necorespunderii rezultatelor uneori poate fi datorată intensității de interacțiune la tipizarea serului sau a eritrocitelor. De exemplu, serul care aglutinează intensiv eritrocitele de grup B, dar nu și celulele A<sub>1</sub>, mai de-

grabă aparține unei persoane cu grupul A, cu toate că eritrocitele nu sunt aglutinate de Ac anti-A sau anti-B. Ag A sau B pot să nu fie exprasați pe suprafața celulelor persoanelor care au moștenit alele variabile sau ale indivizilor cu maladii ce au indus deprimarea producției de antigene. Pentru detecția Ag slab exprimați se pot utiliza următoarele proceduri:

1. Incubarea celulelor spălate cu anti-A sau anti-B la temperatura camerei timp de 30 min, pentru a intensifica interacțiunea dintre Ac și Ag insuficient cantitativ. Incubarea la  $+4^{\circ}\text{C}$  favorizează și mai mult legarea, dar testarea la temperatură dată trebuie controlată cu hematiile de grup 0 și cu celulele autogene. Aceasta permite confirmarea că reacțiile observate sunt rezultatul interacțiunii cu anti-A și anti-B, dar nu cu careva alte aglutinine *a frigore*;
2. Prelucrarea eritrocitelor pacientului cu enzime proteolitice (fișină, papaină, bromelină), care contribuie la intensificarea interacțiunii „antigen-anticorp” cu anti-A sau anti-B. Reacția de legare a Ac cu eritrocitele ce au Ag exprimate corespunzător în unele cazuri va avea loc în primele 30 min la temperatura camerei, dacă eritrocitele au fost prelucrate în prealabil cu enzime. Pentru confirmarea specificității reacțiilor ABO este necesară testarea în paralel a eritrocitelor de grup 0 prelucrate cu enzime;
3. Incubarea alicvetei eritrocitare la temperatura camerei sau la  $+4^{\circ}\text{C}$  cu Ac umani anti-A sau anti-B pentru absorbția Ac cu Ag eritrocitare corespunzătoare. Pentru absorbție / eluție nu se recomandă utilizarea lecitinei anti-A<sub>1</sub> sau a reagenților monoclonali. În calitate de martor la absorbție/eluție este necesar a utiliza eritrocite de grupul 0. După incubare hematiile trebuie minuțios spălate, apoi se prepară eluatul. Ultimul se testează cu celulele de grup A<sub>1</sub>, B sau 0. Dacă eritrocitele posedă Ag A, atunci eluatul va aglutina A<sub>1</sub>, dar nu și hematiile cu Ag B sau 0. Eluatele preparate din hematiile de grup B aglutinează cu exclusivitate alte celule ale grupului B. Eluatul din eritrocitele de grup 0 trebuie să fie areactiv. Activitatea eluatului din celulele martor de grup 0 anulează rezultatele obținute cu eritrocitele pacientului și poate însemna, că serul anti-A sau anti-B conține alți Ac sau că procedura absorbție/eluție a fost efectuată incorect;
4. Testarea salivei la prezența substanței H, A sau B este utilă pentru clarificarea discordanțelor doar în cazurile când pacientul este secretor, dar acest detaliu poate rămâne necunoscut până la finisarea cercetării.

## **Soluționarea divergențelor induse de reacțiile neobișnuite cu anti-A și anti-B**

Uneori testele eritrocitare afișează reacții pozitive neașteptate. De exemplu, reagentul anti-A poate aglutina slab eritrocitele mostrei sanguine, serul căreia reacționează identic serului normal de grup B sau 0. Cauza acestui fapt poate fi variabilitatea alelelor locusului *ABO* sau niște probleme care nu țin de acțiunea genelor *ABO*.

### **Fenotipul B adoptiv**

Acest fenotip este identificat în cazul când serul conține Ac anti-B cu activitate majoră, iar hematiile sunt aglutinate intensiv de Ac anti-A și slab de Ac anti-B. Fenotipul B adoptiv apare când enzimele microbiene modifică Ag A (N-acetilgalactozamina) astfel, că el devine identic celui din restul de galactoză apreciabil la Ag B. Acest fenotip se manifestă *in vivo* numai la hematiile A<sub>1</sub>. Ag B adoptiv se dezvoltă din contul AgA, iar aceasta poate conduce la micșorarea numărului de molecule ale Ag A. Când Ag B adoptiv este prezent pe suprafața celulelor în cantitate majoră, ele pot fi aglutinate de Ac anti-B umani. Cu toate că majoritatea eritrocitelor cu AgB adoptiv reacționează slab cu anti-B, în unele cazuri poate fi observată o aglutinare intensivă. Intensitatea reactivității eritrocitelor de acest tip cu Ac monoclonali depinde de caracterul acestora. Pentru confirmarea prezenței Ag B adoptiv pe suprafața eritrocitelor grupei A este necesar:

- Să se concretizeze diagnosticul pacientului. De obicei, AgB adoptiv se întâlnește în stările care favorizează pătrunderea bacteriilor intestinale în fluxul sanguin, cu toate că uneori el poate fi depistat și pe suprafața eritrocitelor donatorilor.
- Să se testeze serul pacientului cu autoeritrocite. Ac anti-B ale acestui individ nu aglutinează hematiile cu Ag B adoptiv al propriilor lui celule.
- Să se testeze eritrocitele cu reagenții monoclonali anti-B. Spre deosebire de serurile umane, unii Ac monoclonali nu reacționează cu celulele de fenotip B adoptiv (detalii și probe vezi în instrucțiunile anexate).
- Să se testeze eritrocitele cu serul anti-B uman cu pH 6,0. Ac anti-B umane în mediul acid nu interacționează cu Ag B adoptiv.
- Dacă pacientul este secretor, se va testa saliva acestuia la prezența Ag A și B. Secretorii, eritrocitele cărora posedă Ag B adoptiv, conțin în salivă substanța A și nu conțin substanța B.



- Să se prelucreze eritrocitele cu anhidridă acetică care reacitilează moleculele superficiale ale celulelor și minorizează esențial reactivitatea hematiilor cu Ag B adoptiv. Anhidrida acetică nu influențează reactivitatea Ag obișnuit de grup B.

### **Ag A identice adoptive**

Discordanțe după sistemul AB0 pot fi observate și în cazurile de poliaglutinare Tn, când este dereglată sinteza oligozaharidelor prezente în normă pe moleculele sialoglicoproteinelor, ce conduce la apariția pe suprafața eritrocitelor a structurilor antigenice aberante (criptantigene). Restul glucidic neprotejat terminal prezintă GalNAc – o monozaharidă care apreciază specificitatea Ag A. Unele mutații somatice ale celulelor stem duc la formarea unei populații stabile de celule – așa-numitele Tn activate. Celulele Tn-activate de grupul 0 și B se manifestă asemenea celor purtătoare de Ag A, capabile să reacționeze cu reagenții anti-A monoclonali sau cei umani. Ag A identic al hematiilor Tn-activate poate fi diferențiat de Ag A produs de transferaza genei A, dacă până la testare eritrocitele vor fi prelucrate cu enzime proteolitice. Ultimele scindează moleculele purtătoare de criptoantigene, făcând astfel imposibilă capacitatea lor de a reacționa cu anti-A.

**Aglutinarea „mixed-field”.** Uneori se întâlnesc mostre sanguine care conțin două populații diferite de hematii. De regulă, acest fapt anunță despre o transfuzie recentă cu hematii de grupul 0, aplicată recipientului cu o altă grupă sanguină, sau despre transplantarea măduvei osoase care se diferă de cea a recipientului după sistemul AB0. Himerismul grupelor sanguine la schimbul de țesuturi eritrocitare între gemenii heterozigoți sau în prezența mozaicismului conduce de asemenea la apariția unui amestec eritrocitar. În toate aceste cazuri la testarea eritrocitelor după sistemul AB0 poate fi observată aglutinarea „mixed-field”. La transfuzie aceasta se va observa pe tot parcursul perioadei de viața a hematiilor.

După transplantul medular reacția va dispărea odată ce la pacient s-a inițiat sinteza de eritrocite proprii, iar la unii recipienți pot fi înregistrate populații „mixed-field” constante. În cazul himerismului sanguin reacția se manifestă pe parcursul întregii vieți.

Aglutinarea tip „mixed-field” este caracteristică pentru hematiile A<sub>3</sub> și reagentul anti-A. Dacă se elimină celulele aglutinate, iar eritrocitele ră-

mase se testează din nou cu anti-A, se va observa aglutinarea hematiilor rămase care n-au fost aglutinate anterior.

**Eritrocitele acoperite cu anticorpi.** Hematiile copiilor cu boala hemolitică a nou-născutului și cele ale adulților cu maladii auto- și aloimune uneori poartă pe suprafața lor molecule de IgG și manifestă aglutinare spontană în prezența diluanților de reagenți care conțin proteine în concentrații majore (18–22%). Aceste concentrații de proteine sunt caracteristice pentru unii reagenți anti-D. Uneori eritrocitele sensibilizate pot manifesta aglutinare la utilizarea reagenților AB0 cu concentrația proteinelor de 6–12%. Majoritatea Ac se pot detașa de pe suprafața eritrocitelor cu ajutorul eluției ușoare la +45°C, după care aceste celule pot fi utilizate pentru testarea cu anti-A și anti-B.

Hematiile mostrelor care conțin autoaglutinine *a frigore* IgM pot să se aglutineze spontan în testele cu soluție fiziologică. Acești Ac pot fi extrași prin incubarea suspensiei celulare la +37°C, urmând spălarea lor repetată cu soluții saline încălzite până la +37°C. Dacă aglutinarea nu dispăre, atunci eritrocitele necesită prelucrare cu ditiotreitil (DTT).

### **Soluționarea divergențelor dependente de reacțiile neprevăzute ale serului**

Erările testărilor serologice pot fi dependente de unele fenomene serice ca:

1. Concentrația de Ac anti-A și anti-B la pacienții cu imunodeficiențe poate fi sub limita de sensibilitate a metodei de detecție utilizată. Acești Ac pot fi absenți în serul nou-născuților sau în concentrații minore la persoanele aparent sănătoase de vârstă înaintată.
2. Concentrațiile majore anormale de Ac anti-A și anti-B pot fi cauza zonei proaglutinante, care va genera rezultate fals-negative. În aceste cazuri grupul sanguin poate fi determinat după diluarea serului sau prelucrarea acestuia cu EDTA (2,5%).
3. Ac anti-  $A_1$  din serul persoanelor cu  $A_2$ ,  $A_2B$  sau alt subgrup sanguin aglutinează hematiile reagentului  $A_1$ . Pentru confirmarea cauzei generatoare de asemenea contradicții este necesar: a) de testat serul dat cu mostre eritrocitare sanguine  $A_1$ ,  $A_2$  și 0 (preferabil câte 3 mostre de celule de fiecare grup). Ac pot fi specificați ca anti- $A_1$  numai în cazul când ei vor aglutina hematiile celor 3 probe de grup  $A_1$  și nici una din  $A_2$  sau 0; b) de utilizat lecitina din *Dolichos biflorus* și serul sanguin

uman de grup B în calitatea de reagent anti- $A_1$ , pentru a se confirma, că celulele persoanei date nu aparțin la subgrupul  $A_1$ . Majoritatea mostrelor anti- $A_1$  reacționează doar la temperaturi de sub  $+30^{\circ}\text{C}$  și nu sunt de valoare clinică, cu toate că unele reacționează la  $37^{\circ}\text{C}$  și sunt de semnificație clinică. Pentru transfuzie în cazul dat se permite utilizarea numai a eritrocitelor  $A_2$  sau 0.

4. Autoaglutininele *a frigore* anti-I și anti-IH cu activitate majoră pot aglutina eritrocitele adulților, inclusiv pe cele autologe și reagente. Cu mici excepții, autoaglutininele *a frigore* induc o reacție mai puțin expresivă decât anti-A și anti-B. Când reactivitatea dată face dificilă interpretarea testelor, se procedează în modul următor:
  - a) înainte de testarea serului și a eritrocitelor acestea se încălzesc până la  $+37^{\circ}\text{C}$ . Dacă se impune, se poate utiliza testul antiglobulinic. Mostrele serice slab reactogene anti-A sau anti-B nu se depistază la utilizarea metodei date, deoarece temperatura optimă pentru activitatea Ac este de sub  $+37^{\circ}\text{C}$ . La persoanele cu grupul sanguin A sau B anticorpii AB0 sunt prezenți în special sub forma de IgM, care nu pot fi apreciate la testarea antiglobulinică standard cu utilizarea reagenților anti-IgG. Mostrele anti-A și anti-B cu concentrații minore sau chiar absente de IgG pot să nu fie detectate;
  - b) este necesar să se extragă autoaglutininele *a frigore* din ser prin metoda de autoabsorbție la rece. Serul absorbit se testează ulterior cu eritrocitele reagenților  $A_1$  și B;
  - c) serul se va prelucra cu DTT, după care se poate utiliza în testarea de grup reversă. DTT induce pierderea capacității Ac IgM de aglutinare, de aceea aceste teste necesită realizare în faza antiglobulinică pentru detecția IgG. Deoarece multe persoane de grup sanguin A sau B nu secretă cantități majore de IgG cu activitate anti-A sau anti-B, interpretarea rezultatelor negative trebuie efectuată cu prudență.
5. Aloanticorpii anti- $P_1$  sau anti-M activi la temperatura camerei pot aglutina eritrocitele utilizate la testarea serologică, dacă ultimele conțin Ag respective. De obicei, celulele reagentului utilizat pentru detecția anticorpilor vor aglutina la temperatura camerei. Testarea corectă a serului AB0 care conține alți aloanticorpi *a frigore* include: a) amestecul serului și celulelor la temperaturile  $+30-37^{\circ}\text{C}$ , contradicțiile pot fi evita-

te, dacă temperatura optimă de interacțiune a aloanticorpilor este mai joasă decât temperatura la care reacționează anti-A și anti-B; b) identificarea aloanticorpilor cu posibila detecție ulterioară a Ag respective pe eritrocitele reagenților A<sub>1</sub> sau B. Utilizarea pentru testarea serului a eritrocitelor A<sub>1</sub> și B, pe care este absent Ag dat; c) în cazul probei negative pentru detecția Ac serul se va cerceta prin utilizarea câtorva mostre eritrocitare A<sub>1</sub> și B. Serul poate conține Ac anti-Ag rar înregistrate sau absente pe majoritatea eritrocitelor A<sub>1</sub> și B spontan colectate pentru testare.

6. Concentrațiile anormale de proteine în ser, dereglarea coraportului lor sau utilizarea reagenților înalt moleculari, a substituenților de plasmă pot duce la agregarea eritrocitelor din ser și imită aglutinarea. În unele cazuri apar agregatele de tip "stâlpușori numulari", vizibile la microscopie, dar mai frecvent agregatele au formă diversă și sunt foarte asemănătoare aglutinatelor induse de Ac. În aceste situații, pentru a reuși rezultate plauzibile, serul poate fi diluat cu soluție salină în raport 1:3, pentru a exclude proprietățile agregante.

## SISTEMULUI ANTIGENIC ERITROCITAR RHESUS

Sistemul de antigene eritrocitare specifice Rhesus a fost descoperit de Landsteiner și Wiener în 1940 în rezultatul studiului asupra sintezei de Ac la imunizarea animalelor cu hematiile maimuțelor *Macacus Rhesus*. Analizând proprietățile hemolitice ale Ac identificați, autorii au remarcat că aceștia aglutinează în proporție de 85% cazuri eritrocitele umane. În același an Lewine și Katzin au depistat Ac cu asemenea activitate în serul femeilor cu nașteri multiple, iar Wiener și Peters – în serul persoanelor eritrocitele cărora nu posedau determinanta antigenică respectivă, dar în schimb aveau în anamneză transfuzii sanguine compatibile după sistemul AB0.

Actualmente sistemul de antigene eritrocitare Rh înglobează 48 de antigene, printre care de importanță clinică majoră se consideră Ag D, care posedă proprietăți imunogene evidente și este cauza maladiei hemolitice a nou-născutului în 95% din cazurile de incompatibilitate dintre mamă și făt, precum și a complicațiilor severe posttransfuzionale. Persoanele care posedă antigenul D se consideră Rh-pozitive, iar cele care nu au acest Ag sunt Rh-negative. Termenii Rh(+) și Rh(-) reflectă deci prezența sau absența antigenului D pe eritrocite. Denumirea de **Rh<sub>0</sub>(D)** nu se mai utilizează, având doar o conotație istorică.

Antigenul D, ca și A, B, are un rol important în practică transfuzională. Sinteza de Ac anti-D este dependentă de inocularea eritrocitelor care expresază Ag D în cazul transfuziilor sanguine sau pe fond de sarcină. Pentru evitarea acestor inadvertențe, sângele tuturor recipienților și al donatorilor este testat la prezența Ag D, manevră care asigură securitatea transfuziei sanguine. Ag D este determinat genetic, moștenirea criteriului ce face pe cale autosomal dominantă (fără vre-o relație cu sexul).

Cercetările realizate în 1940 au demonstrat existența a încă 4 Ag: C, E, c, e. În prezent se cunosc, precum menționam, 48 Ag (tab.15), dar numai 5 (D, C, E, c, e) din acestea și Ac lor respectivi sunt responsabile de manifestările clinice (99% cazuri) relaționate cu sistemul RH.

Antigenele eritrocitare ale sistemului Rhesus

Nr. Ag după ISBT	Simbolul Ag	Nr. Ag după ISBT	Simbolul Ag	Nr. Ag după ISBT	Simbolul Ag
RH1	D	RH21	C <sup>g</sup>	RH40	Tar
RH2	C	RH22	CE	RH41	Rh41
RH3	E	RH23	D <sup>w</sup>	RH42	Rh42
RH4	c	RH26	c-like	RH43	Crawford
RH5	e	RH27	cE	RH44	Nou
RH6	f	RH28	hr <sup>t1</sup>	RH45	Riv
RH7	Ce	RH29	Rh29	RH46	Sec
RH8	C <sup>w</sup>	RH 30	Go <sup>a</sup>	RH47	Dav
RH9	C <sup>x</sup>	RH31	hr <sup>b</sup>	RH48	JAL
RH 10	V	RH32	Rh32	RH49	STEM
RH11	E <sup>w</sup>	RH33	Rh33	RH50	FPTT
RH12	G	RH34	Hr <sup>b</sup>	RH51	MAR
RH17	Ht <sub>n</sub>	RH35	Rh35	RH52	BARC
RH18	Hr	RH36	Be <sup>a</sup>	RH53	JAHK
RH19	hr <sup>a</sup>	RH37	Evans	RH54	DAK
RH20	VS	RH39	Rh39	RH55	LOCR

**Notă:** Rh 32 prezintă un Ag rar înregistrat, mai des la rasa negroidă, codificat de gena *R<sup>v</sup>* și care este responsabil pentru expresia scăzută a C și e. Rh 37 corespunde Ag Evans și el rar atestat și asociat cu haplotipul D cu activitate minoră.

În prezent se consideră plauzibilă ipoteza lansată de Tippett despre existență a 2 loci structurali pe cromozomul 1, care determină sinteza Ag Rh. Determinantele antigenice Rh sunt niște polipeptide neglicozilate. Gena *RHD* controlează sinteza proteinei transmembranice, care determină activitatea D a hematiilor. La indivizii D-pozitivi această genă este prezentă, pe când la cei D-negativi respectivul material genetic este absent.

Gena *RHCE* condiționează prezența Ag C, c, E, e, iar produsele proteice ale genelor *RHD* și *RHCE* sunt polipeptide ce traversează membrana eritrocitară, având spre exterior niște extremități scurte, și care, spre deosebire de alte Ag proteice cu specificitate de grup, nu poartă resturi glucidice.

Ag Rh sunt omogene, deosebirile fiind asigurate de unii aminoacizi și secvențele lor. Pe hematiile Rh-nule Ag Rh sunt absente. Proteinele Rh sunt concomitent necesare și pentru expresia sau prezentarea altor Ag (Lw, Duffy, U).

## Clasificarea antigenelor eritrocitare ale sistemului Rhesus

Există 3 clasificări pentru Ag eritrocitari ai sistemului Rhesus (tab. 16).

Tabelul 16

**Simbolizarea antigenelor eritrocitare ale sistemului Rhesus după diferite clasificări**

După Wiener		Fisher-Race	Rosenfield
Aglutinogene	Factori		
Rh <sub>0</sub>	Rh <sub>0</sub> hr' hr''	cDe	Rh: 1,4,5
Rh <sub>1</sub>	Rh <sub>0</sub> rh' hr''	CDe	Rh: 1,2,5
Rh <sub>2</sub>	Rh <sub>0</sub> hr' rh''	cDE	Rh: 1,3,4
rh	hr' hr''	cde	Rh: -1,4,5
rh'	rh' hr''	Cde	Rh: -1,2,5
rh''	hr' rh''	cdE	Rh: -1,3,4
Rh <sub>2</sub>	Rh <sub>0</sub> rh' rh''	CDE	Rh: 1,2,3
rh <sub>y</sub>	rh' rh''	CdE	Rh: -1,2,3

Clasificarea Wiener este bazată pe concepția că în cromozomul Rh există numai un locus, care poate fi ocupat de unul din cele 8 gene alele, iar fiecare genă codifică producția aglutinogenului, care constă dintr-un complex de Ag ce pot fi depistate cu antiserurile respective. Semnificarea antigenelor după Wiener este, totuși, destul de complicată, rar se utilizează în izoimunologie, cu excepția Ac anti-Rh<sub>0</sub>(D), de care se face uz în practică.

Clasificarea Fisher-Race admite existența a 3 loci pentru 3 gene strâns legate de același cromozom. Actualmente specificarea Ag după Fisher-Race este recomandată de către experții OMS pentru a fi utilizată la scară largă, ea fiind ușor memorizată și favorizând interpretarea rapidă a reactivității hematiilor cu anti-serurile specifice respective (de ex. serul antic reacționează cu eritrocitele cde/cDE și nu interacționează cu hematiile CDE/CDe).

Clasamentul Rosenfield este bazat numai pe investigații serologice. Ag au fost specificate după numărul de ordine pe măsura descoperirii lor. Prezența Ag pe eritrocite este simbolizată cu numărul de ordine al Ag, iar absența lui - prin semnul „-” notat înaintea numărului de ordine al Ag (de ex. prezența Ag D pe hematii Rh:1, absența AgD pe hematii - prin Rh:-1).

Actualmente cele 2 puncte înaintea simbolului nu se marchează la descrierea Ag, fiind utilizate numai la descrierea fenotipului.

În prezent se disting 2 gene (*RHD* și *RHCE*), responsabile de producția Ag eritrocitare ale sistemului Rhesus. Prezența unui număr major de Ag în sistemul Rhesus se datorează mutațiilor genice. Gena *RHD* controlează producția Ag D, iar gena *RHCE* – cea de Ag C, c, E, e. Nu s-a confirmat existența genei d și respectiv a Ag d, dar acest simbol este utilizat în izoimunologie la descrierea fenotipului pentru semnificarea absenței lui pe eritrocite. Persoanele Rh- pozitive posedă 2 gene *RHD* și *RHCE*, pe când cele Rh-negative au doar gena *RHCE*. În tab. 17 sunt redată cele mai frecvente combinații antigenice ale acestui sistem, exprimate ca haplotip.

Tabelul 17

**Genele principale ale sistemului Rh după Fisher-Race**

Haplotip	Combinății genice	Specificități antigenice
R <sup>1</sup>	CDe	C, D, e
r	ce	c, e
R <sup>2</sup>	cDE	c, D, E
R <sup>0</sup>	cDe	c, D, e
r'	Ce	C, e
r''	cE	c, E
R <sup>Z</sup>	CDE	C, D, E
r'	CE	C, E

Simbolica fenotipurilor reflectă denumirea haplotipurilor marcate cu simbolul R și, respectiv, r – adică producătoare sau neproducătoare de Ag D. Simbolul suplimentar notat în colțul de sus sau jos, indică prezența altor Ag. De exemplu, R<sup>2</sup> indică prezența concomitentă a Ag c, D și E; r = c și e, R<sup>0</sup> = c, D și e etc. Fenotipurile cu expresie homozigotă a haplotipului unic se semnifică cu un simbol, alte fenotipuri – cu două.

Antigenele eritrocitare ale sistemului Rhesus pot fi identificate prin suplimentarea antiserului cu specificitatea respectivă ce se manifestă în reacția de aglutinare și caracterizează un anumit fenotip antigenic. Frecvența de înregistrare a fenotipurilor este elucidată în tabelul 18.

Pentru testări izoimunologice se utilizează în principal 5 reagenți de tipizare a sângelui: anti-D, -C, -E, -c și -e. În testările pretransfuzionale se utilizează doar testul pentru Ag D. Alți reagenți sunt utilizați de preferință



pentru soluționarea divergențelor dependente de Ac sau în cercetările genealogice. Diversitățile antigenice testate pe eritrocitele umane prezintă fenotipul Rh.

Tabelul 18

**Frecvența de înregistrare a fenotipurilor sistemului Rhesus**

Rezultatele investigațiilor cu serul anti-					Fenotipul	Frecvența, %	Genotipul posibil
D	C	c	E	e			
+	+	+	-	+	CcDe	34	<b>CDe/ce</b> Ce/cDe <b>CDe/cDe</b>
+	+	-	-	+	CDe	19,5	<b>CDe/CDe</b> CDe/Ce
+	-	+	+	+	cDEe	12	<b>cDE/ce</b> <b>cDE/cDe</b> cDe/cE
+	-	+	+	-	cDE	2,9	cDE/cDE cDE/cE
+	+	+	+	+	CcDEe	14	<b>CDe/cDE</b> CDe/cE Ce/cDE cDe/CE CDE/cDe CDE/ce
+	-	+	-	+	cDe	3	<b>cDe/ce</b> <b>cDe/cDe</b>
-	-	+	-	+	ce	13	ce/ce
-	+	+	-	+	Cce	1	Ce/ce
-	-	+	+	+	cEe	0,1	cE/ce
-	+	+	+	+	CcEe	0,5	Ce/cE

**Notă:** Cu caractere bold sunt evidențiate genotipurile cel mai frecvent înregistrate. Genotipul antigenelor eritrocitare ale sistemului Rhesus poate fi determinat numai în baza investigațiilor serologice familiale.

Identificarea Ag nu permite în toate cazurile consemnarea exactă a genotipului. Genotipul posibil este apreciat în baza frecvenței combinațiilor antigenice aparente în complexul genomic individual.

Pentru delimitarea genelor umane care codifică Ag C, c, E, e eritrocitele sunt testate cu Ac anti-Ag respectivi. Dacă hematiile expresează

ambii Ag C și c, sau E și e, atunci se presupune la individul examinat prezența genelor respective. Dacă eritrocitele exprimează numai unul din Ag C și c, sau E și e, se consideră că această persoană este homozigotă după alela respectivă. Cercetarea titrului în unele cazuri poate confirma aceasta prezumție, dat fiind faptul că pe eritrocitele subiecților homozigoți după Ag dat cantitatea Ag este mai mare decât la cei heterozigoți. Testele pentru Ag D depistează numai prezența sau absența lui, iar rezultatele titrării pentru aprecierea dozei nu permit în cazul dat obținerea unor probe veridice.

### ***Caracteristica antigenelor eritrocitare ale sistemului Rhesus***

Antigenele sistemului Rhesus sunt proteine, fapt confirmat prin scindarea lor de către enzimele proteolitice. Proteinele sunt neuniform amplasate în membrana eritrocitelor. Determinantele antigenice ale sistemului Rhesus de pe eritrocitele umane variază cantitativ în dependență de genotip: AgD – 10 000-200 000; C – 21 500-56 500; E – 450-25 000, e – 13 500-24 500, c – 37 000-85 000 pentru o hematie.

Reducerea determinantelor antigenice D de la 30000 până la 10000 se dezvoltă în următoarea succesiune: DcE/DcE > DCe/DcE > Dce/Dce > DCe/DCe > DcE/dce > DCe/dce.

Cu cât mai multe determinante antigenice există pe suprafața eritrocitului, cu atât mai activ ele vor fi aglutinate de către serurile specifice și mai ușor va fi depistat Ag la tipizare.

Pentru antigenele sistemului Rhesus este caracteristic un polimorfism marcat prin marea lor diversitate. Actualmente sunt descriși peste 36 epitopi. În hematiile diferitor indivizi cu apartenență Rh-pozitivă pot fi prezenți toți epitopii relevați sau unii pot fi absenți. Mai frecvent hematiile persoanelor aparent sănătoase exprimează toți epitopii antigenului D (antigenul D normal exprimat). Mostrele eritrocitare care nu exprimează toți epitopii antigenului D au fost notate cu termenul de varianta D (D-parțial), iar cele care denotă o expresie scăzută a antigenului D - antigenul D-slab (D-weak). Anterior diferențierea antigenului D-slab sau D-parțial era imposibilă și hematiile erau specificate cu simbolul comun D<sup>U</sup>. Actualmente, grație utilizării anticorpilor monoclonali testarea acestor variante antigenice este posibilă și termenul D<sup>U</sup> nu se mai utilizează ca reper.

## Expresia antigenului D

Persoanele D-negative nu posedă *RHD* ce codifică Ag D sau, mai rar, ei prezintă gena *D* afuncțională. Majoritatea persoanelor D-negative sunt homozigote după gena *RHce*, care determină c și e. Mai rar acestea posedă gena *RHCe* sau *RHcE* responsabile pentru sinteza C și e sau, respectiv, c și E. Gena *RHCE* care codifică sinteza Ag C și E se întâlnește rar. Genotipul persoanelor D-pozitive este imposibil de apreciat prin metodele serologice, deoarece testarea dozei nu este informativă pentru demonstrarea faptului că individul este homozigot sau heterozigot după *RHD*.

Prin interacțiunea genelor se produc așa-zisele „efecte de amplasare”. Dacă interacționează genele amplasate pe un cromozom sau produsele acestora (antigenele „cis”), are loc „efectul cis”, iar dacă gena sau produsul proteic interacționează cu gena cromozomului vecin, atunci se apreciază „efectul trans” (Lawler, Race). De exemplu, „efectul cis” se manifestă când AgE produs de *cDE* este mai slab decât în cazul *cE*. Efectul „trans” se va manifesta prin expresia mai slabă a Ag C și E la genotipul *CDe/cDE* comparativ cu *CDe/ce* sau, respectiv, *cDE/ce*. Anticorpul anti-Ag „cis” se întâlnește uneori, cu toate că testarea lor este dificilă din cauza altor specificități *RH* mai evidente. Prezența lor poate fi depistată cu ajutorul absorbției eritrocitelor unor fenotipuri.

Apartenența de rasă importă la emiterea concluziei despre genotip, date fiind variațiile de frecvență a genelor *RH* la reprezentanții diferitor rase. Mostrele eritrocitare D-pozitive pot manifesta o diversă reactivitate cu reagenții anti-D. Majoritatea hematiilor D-pozitive posedă capacitate de aglutinare macroscopică evidentă la testarea cu reagenții anti-D, dar unele mostre eritrocitare D-pozitive nu afișează o aglutinare imediată și pentru a argumenta prezența Ag D devine necesară o incubare mai îndelungată cu reagentul anti-D sau suplimentarea lor după incubare cu ser antiglobulinic. Celulele se vor considera D-pozitive chiar dacă la testare au necesitat utilizarea unor etape suplimentare.

Ag D parțial diferă de Ag D obișnuit prin absența unor epitopi. Au fost descrise 13 tipuri de variante antigenice parțiale: DII, DIIIa, DIIIb, DIVa, DIVb, DVa, DVI, DVII, DBT, DFR, R<sub>0</sub>Har, DHmi, DHmii. O frecvență majoră de înregistrare s-a apreciat pentru DII și DIII, care conțin un număr mai mare de epitopi ai Ag D. Variantele antigenice DVI, DBT și DFR conțin un număr mai mic de epitopi. Frecvența de înregistrare a variantelor

antigenice nu este apreciată definitiv, dar se presupune că ea ar fi de un caz la 6000 de cercetări sau mai rar.

Absența unor epitopi (până la 5) face dificilă testarea apartenenței sanguine Rh. În serurile anti-D preparate din sângele donatorilor imunizați, se determină, de regulă, majoritatea epitopilor antigenului D, dat fiind faptul că la imunizarea persoanelor Rh-negative se utilizează hematiile donatorilor D+ cu o expresie antigenică bună. Anticorpii monoclonali au o specificitate restrânsă, astfel că vor releva numai unii epitopi.

Varianta DVI se înregistrează mai frecvent și hematiile DVI nu reacționează cu majoritatea mostrelor de anticorpi monoclonali anti-D IgM datorită absenței epitopului cu care reacționează acești Ac. Pentru aprecierea apartenenței Rh la donatorii primari se utilizează anti-D IgM, iar mostrele eritrocitare care au dat rezultat negativ vor fi testate suplimentar cu anti-D IgG.

Pentru diagnosticul variantelor antigenice D se utilizează seturi speciale de reagenți (Dia Med, Suedia), care conțin diverse mostre de anticorpi monoclonali și oferă posibilitatea de a depista diferite variante de antigenice D. Teoretic se consideră, că persoanele cu variantele antigenice D pot secreta anticorpi la epitopii absenți ai Ag D, iar Ac vor avea specificitate anti-D. Semnificația clinică a Ac anti-D secretați de acești recipienți pare a fi dubioasă, de aceea transfuzia sângelui de la donatorul Rh-negativ se adoptă pentru recipienții care posedă variantele antigenice D.

**Antigenul D slab** conține de 3-10 ori mai puține determinante antigenice pe eritrocite comparativ cu Ag D obișnuit, ceea ce face dificilă depistarea acestuia și deseori poate genera erori la aprecierea apartenenței Rh a sângelui. În prezența unui Ag D slab la donator sau la bolnav, chiar în condiția când se folosesc diferiți reagenți, rezultatele de testare a Rh-apartenenței sunt adesea divergente și nesigure.

Fenotipul D-slab al eritrocitelor poate fi consecința unor predispuneri genetice. Unele mostre RHD denotă expresia slabă a Ag D (fenomen mai frecvent la negrozii), ca parte componentă a haplotipului *cDe*. La rasa alba genele care determină expresia slabă a Ag D se întâlnesc mai rar, fiind referite la haplotipurile neobișnuite *CDe* sau *cDE*.

Persoanele cu antigenul D slab nu secretă Ac anti-D, de aceea Ag D slab nu întotdeauna se poate testa prin metodele cu gelatina sau expres cu anticorpi monoclonali, dar acesta se poate aprecia cu testul antiglobulinic indirect. Antigenul D-slab se poate depista la cercetarea apartenenței Rhe-

sus cu ser anti-D uman prin testul antiglobulinic indirect. De altfel persoanele care posedă Ag D slab se consideră Rh-pozitive, indiferent de faptul dacă sunt donatori sau recipienți.

Variantele antigenice se întâlnesc rar și dacă la testarea apartenenței Rhesus se remarcă adesea semne sugestive prezenței de Ag D slab sau parțial, aceasta înseamnă că s-au utilizat reagenți cu activitate joasă sau că metodele de cercetare sunt de eficiență slabă.

La determinările de rutină pentru apartenența de grup sanguin este dificilă diferențierea variantelor antigenice, precum și relevarea Ag D parțial sau slab în mostrele cercetate. Nu există încă probe certe despre imunitatea variantelor de AgD, dar pentru a se preveni posibila sensibilizare la Ag D, în condiția când și testarea veridică a apartenenței Rhesus este dificil de realizat, se acceptă următoarea tactică de interpretare: sângele donatorului se consideră Rh+, iar sângele recipientului se consideră Rh-.

Nu toate persoanele D+ care secretă Ac cu specificitate aparentă anti-D pot fi considerate ca purtătoare de hematii epitopdeficitare. Anticorpilor anti-LW<sup>ab</sup> sau anti-LW<sup>a</sup> uneori reacționează cu celulele D+ și nu cu cele D-. Persoanele cu Ac anti-LW<sup>ab</sup> slab reactogene la testarea serologică primară sunt imposibil de diferențiat de indivizii cu Ag D- parțial, care secretă Ac la epitopii absenți. În cazul dat anti-LW pot fi testați cu hematii prelucrate cu reagenți sulfhidrili care scindează Ag LW și nu afectează Ag D.

În sistemul Rhesus există și alte variante antigenice. Mai cunoscut este Ag C<sup>w</sup>, care structural se diferă de Ag C al sistemului Rhesus. Confirmarea acestui fapt ar fi secreția de anticorpi anti-C<sup>w</sup> observată la persoanele C-pozitive. Ag C<sup>w</sup> poate fi sintetizat concomitent cu Ag C și c, cu aparența fenotipului C+, c+ C<sup>w</sup>+. Testarea Ag C<sup>w</sup> se efectuează cu un reagent standard anti-C, care conține în majoritatea cazurilor Ac anti-C<sup>w</sup>. Și mai rar se înregistrează antigenele D<sup>w</sup>, E<sup>w</sup>, E<sup>t</sup>, e<sup>s</sup> etc., dar și în aceste situații se observă mozaicitatea antigenică.

În sistemul antigenic Rhesus se întâlnesc cazuri când pe eritrocite absentează unele antigene sau pot fi absente toate Ag acestui sistem (fenomenul "*hematii Rh-nule*" – tipul Bombay). Cauza apariției acestui fenotip poate fi interacțiunea genică care conduce la supresia formării substanței predecesoare din care apar Ag CDE.

Independent de originea genetică, hematiile care nu posedă Ag Rh au alterări de structură membranară, care reduc din viabilitatea acestora. In-

tensitatea hemolizei și anemiei ulterioare variază, dar în toate cazurile se observă stomatocitoză, micșorarea duratei de viață a eritrocitelor, modificarea activității altor antigene, în deosebi S, s și U. La indivizi cu hematii de tip Rh –nul au fost testați Ac “naturali” anti-Rhesus. Fenotipul Rh-mod reflectă supresia incompletă a Ag Rh, dependentă de genă modificată X<sup>o</sup>. Spre deosebire de hematiile Rh-nule, pe celulele fenotipului Rh-mod Ag Rh și LW nu sunt complet absenți, ei având o activitate scăzută sau variabilă dependentă de genele sistemului Rhesus, de reactivitatea și specificitatea antiserului utilizat pentru cercetare. Cantitatea lor poate fi atât de infimă, încât prezența lor se va releva doar prin metoda de absorbție/eluție. Atât în cazul fenotipului Rh-nul, cât și la persoanele cu Rh-mod, maladia caracteristică este anemia hemolitică, deosebirile fiind prezentate doar de intensitatea manifestărilor clinice.

În 1958 a fost descris în premieră antigenul G, care denotă imunogenitate, iar 30% din serurile anti-D și 100% de seruri anti-DC conțin suplimentar anticorpi anti-G. Și astfel practic toate mostrele eritrocitare care posedă Ag D și C conțin și antigenul G. Hematiile care n-au Ag D și C nu posedă antigenul G.

Prezența Ag G pe eritrocitele ce conțin antigenul D creează situația când la imunizarea persoanelor Rh-negative cu hematii D+ serurile acestora reacționează cu eritrocitele C+. În cazul dat se concluzionează despre prezența Ac anti-C. În realitate pe lângă Ac anti-D sunt secretați și anticorpi cu activitate anti-G, care reacționează cu Ag prezent pe eritrocitele-test concomitent cu Ag C. Tot astfel se poate explica și faptul de ce la gravidele Rh- se apreciază Ac anti-C, deși la tată și făt Ag C este absent pe eritrocite. La cercetarea serurilor aglutinarea este asigurată de Ac anti-G cu Ag G al eritrocitelor testate. Exemplele date trebuie luate în considerație la identificarea specificității anticorpilor la persoanele Rhesus-pozitive în prezența variantelor antigenice D. Dacă se conchide, că la persoana cu varianta antigenică D sunt prezenți Ac anti-D, se impune a dovedi faptul că reacția nu este rezultatul prezenței Ac anti-G. Pentru excluderea Ac anti-G se utilizează hematiile rar înregistrate D – C – G+ (r<sup>G</sup>).

Anticorpii anti-Rh sunt de origine imunogenă și apar în organism în urma transfuziilor de eritrocite de la donatori, care comportă antigene absente la recipient, precum și la imunizarea mamei cu eritrocitele fetale. Mai frecvent sunt prezentate de IgG și de aceea nu reacționează în aglutinarea

directă *in vitro* cu eritrocitele. Pentru manifestarea aglutinării eritrocitelor cu Ac IgG este necesară suplimentarea componentilor ce intensifică reacția (gelatină, poliglucină, albumină și alți coloizi). Aglutinarea se intensifică la centrifugare sau la suplimentarea enzimelor proteolitice. Ac anti-Rh sunt mai activi la temperatura 37–48° C. Unii cercetători consideră, că metodele ce utilizează enzimele sunt cele mai indicate pentru evidențierea anticorpilor anti-Rh slab reactogeni sau aparenti.

Anticorpii depistați, de regulă, se păstrează pe parcursul mai multor ani. Cu mici excepții, Ac anti-Rh nu leagă complementul la interacțiunea cu Ag, de aceea dacă concentrația de Ac în ser este sub sensibilitatea metodei utilizate, inocularea ulterioară a Ag suscită reacția de răspuns imun secundar și creșterea titrului de Ac.

Efectul dozei de Ac poate fi uneori demonstrat pentru anti-E, anti-C și – e. Unii Ac anti-Rh se pot întâlni în diverse combinații. De exemplu, persoanele *CDe/CDe* care posedă Ac imuni anti-E și anti-c au avut foarte probabil contact cu Ag E și – c, situație în care se vor pune în evidență Ac anti-E și anti-c, ultimii fiind mai puțin activi și deci greu de reperat. Transfuzia cu sânge E - c+, care părea compatibilă, poate induce reacții hemolitice imediate sau întârziate. De regulă nu se impune selectarea pentru transfuzie a unui sânge negativ pentru toți sau majoritatea Ag absenți pe celulele recipientului, dar unii specialiști consideră că recipientii *CDe/CDe* dotați cu Ac anti-E la nivel de detecție necesită o altă abordare. Deoarece la persoanele imunizate anti-c se atestă adesea în asociere cu anti-E, la ei eritrocitele fiind E- și c-negative, pentru transfuzie se selectează sânge de Rh similar cu sângele pacientului, inclusiv dacă prezența anti-c nu poate fi dovedită cu metode standard de testare.

Ac anti-E mai rar îi însoțesc pe cei anti-c, deoarece pacientul mai ușor ar fi putut contacta cu Ag c decât să contacteze concomitent și cu Ag E. Testarea serului care conține anti-c la prezența Ac anti-E nu are sens, deoarece în majoritatea cazurilor sângele donatorului c-negativ va fi negativ și la Ag E.

Frecvența de identificare a aloanticorpilor anti-Ag diferă și este dependentă de imunogenitatea antigenelor, precum și de frecvența de înregistrare a acestora în populația dată. Cel mai frecvent în sângele donatorilor și recipientilor se atestă Ac anti-D, mai rar anti-e. Imunogenitatea Ag de sistemul Rhesus este următoarea:  $D > c > E > C > e$ .

Ac IgG anti-Ag eritrocitare de sistemul Rh aparțin în special subclaselor IgG1 și IgG3, care mai frecvent induc complicații posttransfuzionale și boala hemolitică a nou-născutului. La unele persoane Ac aparțin parțial subclaselor IgG2 și IgG4. Alteori Ac anti-Ag ai sistemului Rhesus se secretă de către persoanele fără antecedente de hemotransfuzii sau graviditate. Ac anti-Rh naturali mai des au specificitate anti-E sau anti-C<sup>w</sup>, aparțin de clasa IgM și parțial de IgG. Autoanticorpii anti-E, -D se depistează la bolnavii cu anemie hemolitică autoimună dependentă de anticorpii calzi.

### **Testele pentru tipizarea Rh**

Tipizarea Rh obișnuită a donatorului și recipientului include numai aprecierea Ag D, iar testarea de expresie a Ag D de nivel scăzut se utilizează numai pentru sângele donatorilor. Testele pentru alte Ag Rh se efectuează cu un scop concret: identificarea Ac anti-Rh neprevăzuți, obținerea sângelui compatibil pentru pacientul cu Ac anti-Rh, la stabilirea paternității sau în alte cercetări genealogice, selectarea panelului de celule pentru fenotipizare sau pentru aprecierea individului, dacă acesta este homozigot sau heterozigot după Ag D.

Pentru selectarea sângelui compatibil pentru transfuzie unui recipient posesor de Ac anti-Rh slabi testele cu reagenți de activitate elevată demonstrează mai exact absența Ag decât rezultatele „cross-mutch” la compatibilitate. Aprecierea fenotipului pacientului poate confirma specificitatea Ac și probabilitatea altor Ac anti – Rh.

### **Testarea standard a Ag D**

Pentru identificarea Ag D în testele pe lame, microplanșe sau în tuburi se utilizează reagenți policlonali anti-D ce conțin în cantități majore proteine umane. Actualmente sunt larg utilizați cu acest scop anticorpii monoclonali anti-D, iar în cercetare pot fi utilizate eritrocitele suspendate în mediu salin, ser sau plasmă, condițiile de efectuare a testului fiind în concordanță cu indicațiile producătorului (ele pot fi diferite).

Condiția *sine qua non* pentru aprecierea veridică a apartenenței Rh este calitatea reagenților folosiți pentru tipizare (specificitatea strictă și activitatea înaltă) și respectarea instrucțiunii de realizare a testului. Reagenții standard destinați pentru o metodă nu pot fi utilizați în alte teste. Încălcarea acestei reguli poate fi una din cauzele erorilor la aprecierea apartenenței Rhesus.



Despre calitatea insuficientă a reagenților utilizați denotă reacția slab pozitivă a mostrelor de control cu apartenență Rh-pozitivă. Instrucția pentru aprecierea apartenenței sanguine Rhesus prevede martori pentru fiecare serie de cercetare (verificarea zilnică a calității).

Dacă în reagent sunt urme de Ac de altă specificitate, aceasta conduce la erori în aprecierea apartenenței Rhesus. Astfel sângele Rhesus negativ poate fi apreciat ca Rh-pozitiv, dacă în reagentul de tipizare anti-D sunt mixați anticorpi de altă specificitate, de exemplu, anti-K, anti-E, anti-C, și dacă în eritrocitele cercetate se conțin Ag respectivi.

Mai dificilă pentru aprecierea apartenenței Rhesus rămâne interpretarea rezultatelor reacțiilor slab pozitive, când aglutinarea eritrocitelor cercetate cu serul anti-D este apreciată ca fiind pozitivă și apare sub aspect de mici aglutinate. În cazul dat reacțiile slab pozitive pot fi generate de:

- Prezența pe eritrocitele cercetate a autoanticorpilor care induc reacție slab pozitivă prin legarea cu componentele reagentului anti-Rhesus (poliglucina, gelatina, albumina). Excluderea acestor reacții fals-pozitive este posibilă prin realizarea testelor control pentru fiecare cercetare. Controlul presupune cercetarea mostrei sanguine cu 33% poliglucină sau gelatină sau prin efectuarea cercetării cu reagent special pentru control (de la producător) fără Ac anti-D.
- Scăderea activității Ag sistemului Rhesus din cauza unor maladii. În cazurile date la unul și același individ se observă divergențe cu rezultatele precedente de apreciere a apartenenței Rhesus: sângele apreciat anterior ca Rh+ se atestă ca Rh- și invers.

În toate cazurile dubioase pentru cercetarea sistemului Rhesus este necesară utilizarea testului antiglobulinic (proba Coombs). Se recomandă efectuarea testului antiglobulinic nu numai cu serul antiglobulinic standard, dar și cu reagentul monospecific anti-IgG. Aceasta oferă posibilitatea excluderii reacțiilor de aglutinare nespecifice, care pot fi generate de interacțiunea dintre componentii complementului absorbiți pe suprafața eritrocitelor cercetate și Ac anticomplementari care se conțin în serul antiglobulinic.

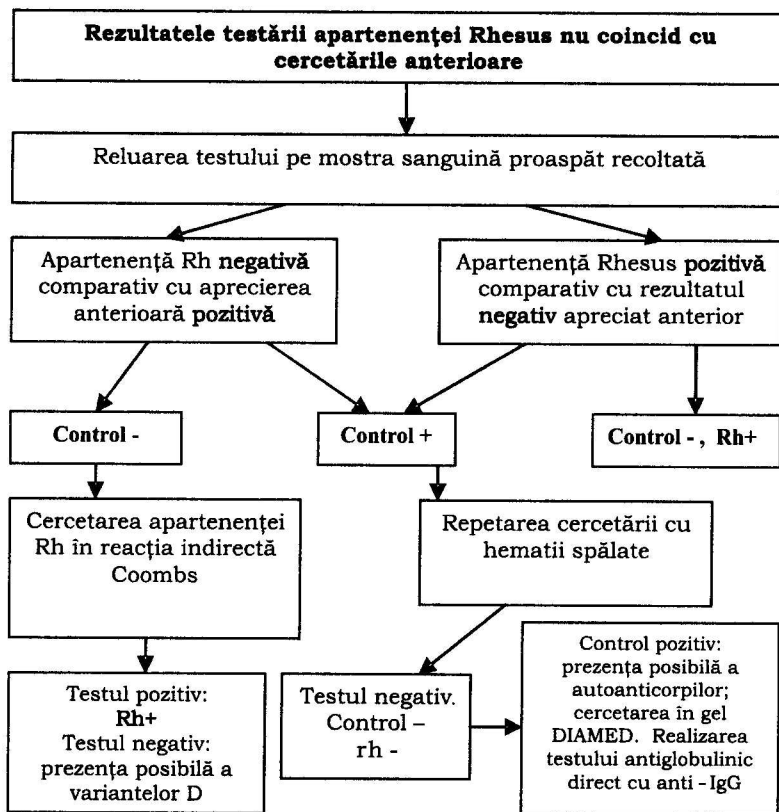
În cazurile complicate concluzia despre prezența Ag D se va emite numai în baza testului antiglobulinic. Cercetarea trebuie să fie însoțită de control la specificitatea reacției: eritrocitele cercetate sunt spălate și sensibilizate cu serul AB fără Ac și cu reagentul anti-IgG. Absența aglutinării

în control denotă veracitatea rezultatului obținut. Prezența aglutinării în control anunță absorbția autoanticorpilor pe eritrocite și deci nu permite concluzia corectă despre apartenența Rhesus a mostrei cercetate.

Printre donatori astfel de cazuri sunt foarte rare, persoana vizată fiind invitată pentru repetarea testului de apartenență Rhesus. Dacă recipientului nu i se poate aprecia apartenența sanguină Rhesus, atunci i se transfuzează hematii Rh-negative.

Algoritmul de apreciere a apartenenței Rhesus este redat în figura 9.

**Figura 9. Algoritmul cercetării apartenenței Rhesus în cazurile dificile de diagnostic**



Rezultatele falsnegative înregistrate la testarea apartenenței Rhesus pot fi dependente de particularitățile individuale ale mostrei:

- Prezența Ag D parțial sau D slab;
- Minorizarea Ag în diferite maladii sau pe fond de graviditate;
- Absorbția pe eritrocitele cercetate a unui număr major de anticorpi care împiedică interacțiunea Ag D cu Ac anti-D ai reagentului care determină absența aglutinării. Controlul, în cazul dat, poate fi atât unul pozitiv, cât și unul negativ. La prezența autoanticorpilor pe eritrocitele cercetate mai eficientă este metoda de aglutinare în gel (mai rar, dar se poate observa reacția pozitivă și în mostrele de control).

# CAPITOLUL VI

## ALTE SISTEME ANTIGENICE ERITROCITARE

### **Sistemul eritrocitar Lewis**

Sistemul Lewis (LE) este determinat de 2 gene *Le* și *le* și include 6 Ag, printre care cele mai cunoscute sunt  $Le^a$ ,  $Le^b$ ,  $Le^{ab}$  (tab. 19). Ag sistemului LE sunt sintetizate în țesuturi și sunt absorbite pe eritrocite din plasmă. Ele sunt exprimate pe mai multe țesuturi (epiteliul căilor respiratorii, uro-genitale, glandelor salivare) și, spre deosebire de alte sisteme antigenice, acesta se află într-o anumită dependență de antigenele sistemului AB0. Frecvența Ag Lewis variază în diferite grupe sanguine ale sistemului AB0.

Tabelul 19

**Caracteristicile Ag eritrocitare ale sistemului Lewis**

Antigenele sistemului		Fenotipul	$Le^a$	$Le^b$	Frecvența fenotipului	
ISBT Nr.	Simbolul Ag				rasa abla	rasa negroidă
LE 1	$Le^a$	Le (a+b-)	+	-	22	23
LE 2	$Le^b$	Le (a-b+)	-	+	72	55
LE 3	$Le^{ab}$	Le (a-b-)	-	-	6	22
LE 4	$Le^{bH}$	Le (a+b+)	+	+	Rar	Rar
LE 5	$ALe^b$					
LE 6	$BLe^b$					

Prezența antigenului pe eritrocite este dependentă de statutul secretor al individului. Aceste Ag apar primar în salivă și plasmă și numai secundar *in vivo*, fiind absorbite pe suprafața eritrocitelor. Ele sunt relativ slab active, dar pot induce formarea Ac imuni compleți și incompleți atât pe fond de sarcină, cât și în caz de hemotransfuzii.

Ag  $Le^a$  este exprimat pe eritrocitele persoanelor care posedă gena *Le*, dar au absentă gena *Se*, de aceea ei nu secretă substanțele de grup ABH în lichidele organismului. Dacă individul posedă ambele gene (*Le* și *Se*), pe eritrocite există Ag  $Le^b$  și persoana respectivă este secretoare de ABH. În 80% din cazuri persoanele cu fenotipul Le (a-b-) secretă ABH și, respectiv,

alte 20% nu secretă substanțele de grup ABH. Eritrocitele Le (a+b+) se întâlnesc foarte rar la testarea sângelui cu antiserul uman. Ele pot fi detectate folosind Ac monoclonali anti-Le<sup>a</sup> și anti-Le<sup>b</sup> care posedă reactivitate mai mare. La gravide expresia Ag LE scade. Eritrocitele nou-născuților se consideră Le (a-b-) grație reactivității lor variabile cu Ac anti-Le<sup>a</sup> și anti-Le<sup>b</sup> umani. Unele din ele pot da reacții pozitive în testele cu reagenții monoclonali sau cu Ac anti-Le<sup>a</sup> cu activitate majoră. Testarea Ag Lewis nu poate fi considerată veridică până la 6 ani. Eritrocitele Le(a+) se întâlnesc la copii destul de frecvent, mai rar celulele Le(b+). Fenotipul Le (a+b+) poate fi observat temporar la copiii, care ulterior în perioada adultă vor avea fenotipul Le (a-b+).

Hematiile fătului sunt aglutinate de Ac care-s specificați ca anti-Le<sup>x</sup>. Acești Ac aglutinează eritrocitele adulților cu fenotipul Le (a+b-) și Le (a-b+), dar nu și pe ale celor cu Le (a-b-). În testele serologice acești Ac se comportă asemeni componentelor cu 2 specificități strâns legate – anti-Le<sup>a</sup> și anti-Le<sup>b</sup>. Determinanta antigenică a acestui fenotip a fost denumită Le<sup>x</sup>. Ea este prezentă pe majoritatea eritrocitelor fetale și cele ale adulților care expresează sau Ag Le<sup>a</sup> sau Le<sup>b</sup>: Ac anti-Le<sup>x</sup> nu este o formă mai potentă sau avidă a anti-Le<sup>a</sup>.

Celulele transplantate după câteva zile de circulație în torentul sanguin își pierd Ag Lewis proprii și le obțin pe cele ale recipientului.

Anticorpilor anti-antigenele eritrocitare LE mai frecvent sunt depistați în serul persoanelor cu fenotipul Le (a-b-). Ei prezintă un amestec de Ac cu 2 specificități și activitate diversă. Persoanele cu fenotipul Le (a-b+) nu secretă Ac anti-Le<sup>a</sup>, deoarece o cantitate minoră de Ag Le<sup>a</sup> netransformat este prezentat în saliva și plasma lor. Ac anti-Le<sup>b</sup>, de regulă, nu se întâlnesc în serul persoanelor Le (a+b-), dar ei pot fi prezenți împreună cu anti-Le<sup>a</sup> în serul indivizilor Le (a-b-). Ac Lewis sunt prezentați de IgM și nu trec transplacental. Din această cauză, dar și pentru că Ag sistemului dat sunt slab dezvoltati la naștere, Ac Lewis nu sunt constatați în boala hemolitică a nou-născutului, grație dezvoltării lor tardive. Ei fixează complementul, iar serul colectat proaspăt care conține Ac anti-Le<sup>a</sup> (sau foarte rar anti-Le<sup>b</sup>) poate hemoliza *in vitro* eritrocitele incompatibile. Hemoliza în cazul dat este mai caracteristică pentru celulele prelucrate cu enzime comparativ cu cele neprelucrate.

Majoritatea Ac Lewis aglutinează eritrocitele suspendate în soluția fiziologică a fenotipului corespunzător. Aglutinatele aparente sunt frecvent in-

stabile și disociază ușor, dacă sedimentul celular nu este resuspendat după centrifugare. Aglutinarea directă este mai evidentă la temperatura camerei, dar poate fi observată și la 37°C. În testul antiglobulinic pot fi cercetați Ac cu reagentul care conține Ac anticomplementari.

Serurile cu Ac anti-Le<sup>b</sup> sunt divizate în 2 categorii: mai frecvent se întâlnesc mostrele serice care reacționează mai relevant cu eritrocitele Le (b+) de grup 0 și A<sub>2</sub>, anticorpii cărora sunt specificați ca anti-Le<sup>bH</sup>. Ac care reacționează evident cu eritrocitele Le<sup>b</sup> aparținând tuturor grupelor sanguine ABO sunt specificate ca anti-Le<sup>bL</sup>. Anti-Le<sup>bH</sup>, spre deosebire de Ac anti-Le<sup>bL</sup>, pot fi neutralizați de saliva persoanelor secretorii de Ag H cu grupul sanguin 0, aceștia având și fenotipul Le (a-b-). În tabelul 20 este redată activitatea serologică a Ac sistemului Lewis mai frecvent înregistrați.

Tabelul 20

**Activitatea serologică a anticorpilor grupei sanguine Lewis**

Anti-corpi relevați	Hemoliza <i>in vitro</i>	Soluțe fiziologice		Albumină		Enzime		Asociate cu:	
		+4°C	+22°C	+37C	TAG	+37C	TAG	BHNN	CPT
Anti-Le <sup>a</sup>	unele	majoritatea	majoritatea	unele	multe	majoritatea	majoritatea	Nu	puține
Anti-Le <sup>b</sup>	rar	majoritatea	majoritatea	puține	uneori	unele	unele	Nu	nu

Anticorpii Lewis din serul pacientului sunt ușor neutralizați de substanțele specifice a grupului sanguin Lewis din plasma donatorului, motiv pentru care hemoliza eritrocitelor transplantate Le (a+) sau Le (b+) la interacțiunea cu Ac Lewis se produce foarte rar. Dar Ac care manifestă reacții intensive în TAG sau induc hemoliza *in vitro* sunt capabili să suscite fenomenul de hemoliză posttransfuzională.

Se consideră, că relevarea Ag sistemului Lewis în sângele donatorului nu este obligatorie înaintea transfuziei sau la cercetarea cross-mutch-lui recipientilor prin intermediul anticorpilor Lewis. Testarea cross-mutch cu utilizarea reagentului anti-IgG și încălzirea prealabilă a test-sistemei sau fără această etapă asigură securitatea necesară a transfuziei.

Așadar, Ac anti-Ag eritrocitare ale sistemului Le din serul recipientilor sunt neutralizați de către substanța Le a plasmei donatorului și astfel hemoliza imună se înregistrează rar.

Ag sistemului Lewis își găsesc aplicație în medicină legală la examinarea petelor de sânge, pentru a concretiza capacitatea secretorie a Ag sistemului AB0. Ca markeri genetici ei prezintă interes pentru antropologi. Printre proprietățile Ag sistemului Lewis este angajamentul lor în procesele inflamatorii, când aceștia atașează de endoteliu neutrofilele și monocitele, prin care acestea migrează spre focarele inflamatorii extravasculare.

Persoanele cu fenotipul Le (a-b-) pot suferi de diferite deficiențe ale rezistenței antiinfecțioase. Spre exemplu, Ag Le<sup>b</sup> sunt capabili să fixeze *H. pylori* pe epiteliul gastric, iar absența lui asociază recidive ale infecțiilor urogenitale la femei. S-a demonstrat de asemenea, că fenotipul Le (a-b-) este markerul riscului major de dezvoltare a ischemiei cardiace.

### **Sistemul de antigene eritrocitare P**

Descoperit în 1927 de către Landsteiner și Levin la imunizarea iepurilor cu eritrocite umane, acest sistem conține Ag P<sub>1</sub>. Serul imun obținut astfel reacționează cu un Ag necunoscut, care a fost specificat convențional ca P, iar ulterior denumit P<sub>1</sub>. Actualmente simbolul P semnifică Ag prezent practic pe toate hematiile umane.

În tabelul 21 sunt prezentate fenotipurile Ag P<sub>1</sub> și frecvența de înregistrare a acestora.

Tabelul 21

**Antigenele sistemului P**

Simbolul antigenului	Fenotipul	Frecvența înregistrării, %	
		rasa albă	rasa negroidă
P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> +	80	93
	P <sub>1</sub> -	20	7

Diferite mostre eritrocitare cu Ag P<sub>1</sub> manifestă activitate diversă, care se diminuează dacă hematiile sunt păstrate un timp. Această proprietate a Ag P<sub>1</sub> face dificilă aprecierea specificității Ac din serul cercetat.

Ag P, P<sup>k</sup> și Luke (LKE) s-au referit primar la sistemul P, mai apoi au fost încadrate în colecția antigenică Globo [209]. Există fenotipuri mai rar întâlnite - P<sup>k</sup>, când eritrocitele dotate cu acest Ag secretă Ac aloreactogeni cu activitate majoră.

Ag P este în esență o sfigolipidă, legată cu epiteliul rinichilor și în poziția sa de receptor deține un rol important în patogenia unor variante de pielonefrită. Ag P<sub>1</sub> este receptor pentru parvovirionul B19, care provoacă eritem infecțios și se intrică în mecanismul patogenic al maladiei. Persoanele care nu dețin un asemenea antigen sunt nonreceptive la acest agent infecțios.

Ac anti-P<sub>1</sub> sunt secretați de mulți indivizi care nu sunt dotați cu Ag P<sub>1</sub>, în lipsa stimulului răspunsului imun al Ag eritrocitare. De regulă, Ac anti-P<sub>1</sub> reacționează la temperatura +4°C, cu toate că uneori pot fi detectați și la +37°C (tab.22).

Tabelul 22

**Activitatea serologică a anticorpilor de grup sanguin P**

Ac	Hemoliza in vitro	Soluție fiziologică		Albumina		Enzime		Asociate cu:	
		+4°C	+22°C	37°C	TAG	+37°C	TAG	BHN	CP
Anti-P <sub>1</sub>	Uneori	Majoritatea	Unele mostre	Uneori	Rar	Unele mostre	Puține	Nu	Rar
Anti-P	Unele mostre	Majoritatea	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Nu	?
Anti-P <sub>1</sub> +P+P <sup>k</sup>	Unele mostre	Majoritatea	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Rar	?

De obicei Ac anti-P<sub>1</sub> sunt niște IgM și induc aglutinarea directă a hematiilor în mediul salin, uneori manifestă acțiune litică. Rareori se întâlnesc Ac anti-P<sub>1</sub> cu apartenență la IgG4, detecția cărora se face în testul antiglobulinic, iar rezultatele sunt de valoare clinică.

Ac anti-P<sub>1</sub> pot fi detectați în hemoglobinuria nocturnă paroxistică (anticorpilor Donat-Landsteiner).

Reacțiile posttransfuzionale induse de prezența anticorpilor anti-P<sub>1</sub> pot fi atât de tip imediat, cât și întârziate.

Ac anti-P<sub>1</sub> nu provoacă boala nou-născutului grație absenței expresivității Ag P<sub>1</sub> pe eritrocitele nou-născutului și imposibilității lor de a trece transplacental.



## **Sistemul antigenic eritocitar H (Hh)**

Acest sistem include 2 gene *H* și *h* și Ag H care este precursorul antigenelor A și B. Pe membrana eritrocitelor grupei 0 este expresiată intensiv substanța H, fiind absente antigenele A și B. Celulele grupelor sanguine ale sistemului AB0 pot fi amplasate în descreșterea Ag H de pe hematii precum urmează: 0, A<sub>2</sub>, B, A<sub>2</sub>B, A<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B. În natură se întâlnesc antigene identice substanței H. Persoanele cu fenotipul rar Oh nu au pe eritrocite Ag H și ele secretă Ac anti-A, anti-B și anti-H, ultimii demonstrând capacitate reactantă majoră, fiind și de sugestivitate clinică. La persoanele cu grupa sanguină A<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B și mai rar la cele de grup B pe eritrocite sunt transformate practic toate moleculele de Ag H și astfel la ei se formează anti-H. Acești Ac sunt, însă, slab reactogeni, fiind activi la *t* camerei și chiar sub aceste valori, iar parmetrii lor nu sunt de valoare clinică.

## **Fenotipul Oh (Bombay)**

Acest fenotip se caracterizează prin absența pe eritrocite a Ag H, A și B și se semnifică ca Oh, deoarece rezultatele testării standard imită pe cele specifice grupei sanguine 0. Eritrocitele Oh nu se aglutinează cu reagenții anti-A, anti-B și anti-AB, iar serul conține Ac anti-A și anti-B cu activitate majoră. Fenotipul Oh este evident, dacă la testare serul aglutinează imediat și evident eritrocitele grupei 0. Ac anti-H prezenți la persoanele cu fenotipul Oh reacționează cu toate eritrocitele cu excepția celor Oh ale altor persoane la temperatura 4-37°C. Pacienții cu fenotipul Oh se vor transfuziona numai cu sânge Oh, deoarece Ac vor hemoliza celulele purtătoare de Ag A, B, H. Fenotipul Oh este caracterizat prin absența reacției celulelor cu lecitina anti-H (*Ulex europeans*). La prezența altor mostre sanguine Oh confirmarea ulterioară poate fi obținută dacă se confirmă compatibilitatea serului doar cu eritrocitele grupei Oh, dar nu și ale altora. Ac anti-H, ca regulă, sunt prezentate de IgM, iar uneori și de IgG. Valoarea clinică a acestor anticorpi este studiată insuficient.

**Fenotipul para-Bombay-Ah, Bh și ABh.** Este imposibilă aprecierea serologică a AgH pe suprafața Ah, Bh și ABh, dar aceste celule sunt purtătoare de cantități minore de Ag A și/sau B, în dependență de expresivitatea concretă a genelor locusului AB0. Testele cu anti-A și anti-B dau reacții slab manifeste, celulele nu reacționează cu *lecitina anti-H* sau cu *serul*

*anti-H* ale persoanelor 0h. Se consideră că fenotipul para-Bombay reflectă prezența genelor *H* variabile, expresia cărora este urmată de formarea unor cantități minore de Ag H, care sub acțiunea produselor genelor *A* și, respectiv, *B* se transformă complet în Ag A și B. Serul persoanelor de grup sanguin Ah și Bh conține Ac anti-A, anti-B și anti-H.

### **Sistemul antigenic eritocitar I**

Acest sistem este prezentat de Ag I și i. Eritrocitele embrionare conțin cantități majore de antigen *i* și sunt sărace în Ag I. În primii doi ani de viață cantitatea Ag I crește în paralel cu diminuarea Ag i. Hematiile adulților în majoritatea cazurilor reacționează intensiv cu Ac anti-I și ceva mai slab sau deloc – cu Ac anti-i. La adulți absența Ag I este un fenomen foarte rar. În serul acestor pacienți, ca regulă, sunt prezenți Ac anti-I, dar activitatea lor este slabă, iar pentru a fi examinați se cere utilizarea metodelor enzimaticе. Ac anti-I, ca și cei anti-H, sunt cel mai frecvent înregistrați în cadrul testărilor serologice efectuate la temperatura încăperii. Aceștia reacționează cu hematiile adulților în majoritatea cazurilor și nu interacționează cu eritrocitele fetale și cele ale adulților I-negativi. Dacă testarea se efectuează la  $t +4^{\circ}\text{C}$ , se poate releva, că serul persoanelor I-pozitive conține autoanticorpi anti-I. Ultimii se comportă ca aglutinine *a frigore* într-un interval termic restrâns în titre de până la 1:64. Cu o mai mare frecvență autoanticorpii anti-I se înregistrează la bolnavii cu macroglobulinemie Waldenstrom, care se specifică prin hemaglutinarea *a frigore*. Ei nu induc boala hemolitică a nou-născutului, dată fiind slaba expresie a Ag respectiv. Se prezumă astfel, că Ac anti-I se intrică cu rol patologic în anemia hemolitică autoimună mixtă și în această ipostază are proprietatea de a fixa complementul, reacționând într-un interval larg de valori termice și fiind prezent în titre majore.

În cazuri rare Ac anti-i pot prezenta proprietăți de autoaglutinine *a frigore*, când reacționează slab la  $t +4-10^{\circ}\text{C}$ . La pacienții cu mononucleoză infecțioasă apar destul de frecvent Ac anti-*i*, care denotă temporar activitate majoră. În tabelul 23 este redat caracterul de prezentare a Ac anti-I anti-i la temperaturile  $+4^{\circ}\text{C}$  și  $+22^{\circ}\text{C}$ .

**Activitatea serologică a Ac grupei sanguine I la diverse temperaturi**

Temperatura	Antigenul eritrocitar	Anti-i	Anti-i
+4°C	I adult	4+	0-1+
	i copii	0-2+	3+
	i adult	0-1+	4+
+22°C	I adult	2+	0
	I copii	0	2-3+
B	I adult	0	3+

Notă: 0-4+ intensitatea aglutinării.

Diferențele de aglutinare sunt observate predilect la mostrele cu Ac slabi. Pentru diferențierea mostrelor de Ac cu activitate majoră poate fi necesară titrarea. Serurile cu anti-I și anti-i pot uneori reacționa în testul antiglobulinic, ce indică activitatea Ac la +37°C. Posibil că reacția se derulează între anticomplementul din componența reagentului antiglobulinic polispecific și componentele complementului la temperaturi joase.

Ac anti-IH se atestă destul de frecvent în serul persoanelor A<sub>1</sub>, ei reacționează intensiv cu eritrocitele care posedă Ag H și I de expresivitate similară. Acești Ac reacționează slab cu eritrocitele adulților de grup sanguin A<sub>1</sub> și cu celulele embrionare ale tuturor grupelor sanguine, dar mai intensiv cu celulele adulților de grup 0. Prezența Ac anti-IH se poate suspecta în cazul când serul pacientului de grup A induce aglutinarea tuturor celulelor utilizate pentru detecția Ac, dar este compatibil cu toate sau cu majoritatea mostrelor de grup sanguin A ale donatorilor.

**Sistemul de grup sanguin MNS**

Acest sistem de antigene eritrocitare a fost descoperit în 1927 de către Landsteiner și Levin. Structura lor biochimică este cea a unor sialoglicoproteine, diferența antigenică fiind dependentă de secvența aminoacizilor din fragmentul terminal N al proteinelor. Sistemul include 43 de antigene cu diferită frecvență de înregistrare (tab. 24).

## Antigenele eritrocitare ale sistemului MNS

Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag	Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag	Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag	Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag
MNS1	M	MNS12*	Vr	MNS23*	S <sup>D</sup>	MNS34	MINY
MNS2	N	MNS13*	M <sup>a</sup>	MNS24*	Mit	MNS35	MUT
MNS3	S	MNS14*	Mt <sup>a</sup>	MNS25*	Dantu	MNS36	SAT
MNS4	s	MNS15*	St <sup>a</sup>	MNS26*	Hop	MNS37	ERIK
MNS5**	U	MNS16*	Ri <sup>a</sup>	MNS27*	Nob	MNS38	Os <sup>a</sup>
MNS6*	He	MNS17*	Cl <sup>a</sup>	MNS28**	En <sup>a</sup>	MNS39	ENEP
MNS7*	Mi <sup>a</sup>	MNS18*	Ny <sup>a</sup>	MNS29**	ENKT	MNS40	ENEH
MNS8*	M <sup>c</sup>	MNS19*	Hut	MNS30**	'N'	MNS41	HAG
MNS9*	Vw	MNS20*	Hil	MNS31	Or	MNS42	ENAV
MNS10*	Mur	MNS21*	M <sup>y</sup>	MNS32*	DANE	MNS43	MARS
MNS11*	M <sup>a</sup>	MNS22*	Far	MNS33	TSEN		

**Notă:** \* rar înregistrate, \*\* frecvent înregistrate

Printre Ag prezente în tabelul 24 de cea mai înaltă imunogenitate se prezintă *M*, *N*, *S*, *s*, care induc sinteza Ac respectivi. Eritrocitele pe suprafața cărora Ag *S* și *s* sunt absente nu posedă Ag *U* frecvent înregistrat. Persoanele ce nu sunt dotate cu Ag *U* sunt capabile să secrete Ac anti-*U*, dacă li se transfuzează hematii *U*-pozitive.

Unele eritrocite *S*-s- expresiază, totuși, Ag *U*, dar nivelul acestuia este atât de minor, încât detecția lui necesită utilizarea metodelor de absorbție-eluție.

Sistemul MNS include un mare număr de Ag de incidență rară și adesea rezultatele testelor de fenotipizare pot fi neordinare din cauza numeroaselor variante antigenice MNS. De exemplu, Ag *M<sup>s</sup>* (MNS11) nu reacționează cu reagenții anti-*M* și anti-*N*. Hematiile umane cu genotipul *M<sup>s</sup>N* manifestă reacții cu *M-N+*, ceea ce poate dirija spre falsă concluzie despre prezența fenotipului *NN*. Eritrocitele umane de genotipul *M<sup>s</sup>M* dau reacții cu *M+N-* și prin interpretarea inexactă a genotipului persoanelor *M<sup>s</sup>M* și *M<sup>s</sup>N* ca fiind *MM* și, respectiv, *NN* pot erona rezultatele testului de paternitate.

Frecvența fenotipurilor Ag MNS este redată în tabelul 25.

Frecvența înregistrării fenotipurilor antigenice MNS

Fenotipul	Frecvența fenotipurilor, %	
	rasa albă	rasa negroidă
M+N-	28	26
M+N+	50	44
M-N+	22	30
M-N-	Rar	Rar
S+s-	11	3
S+s+	44	28
S-s+	45	69
S-s-	0	<1

Sunt de importanță clinică Ag S, s și U, deși cazurile de boală hemolitică a nou-născutului sau de reacții posttransfuzionale induse de Ac anti-Ag respective sunt atestate rar.

Ac anti-Ag sistemului MNS, ca regulă, sunt IgM și chiar dacă se prezintă ca molecule de IgG, aceștia sunt mai eficient depistați în mediul salin la temperatura camerei sau la +4°C. În majoritatea cazurilor Ac nu sunt de sugestivitate clinică și nu se depistează în TAG. Mai rar Ac anti-M și anti-N sunt activi la +37°C și în aceste situații ei devin de valoare clinică. Activitatea serologică a Ac sistemului analizat la diferite fenotipuri este redată în tabelul 26.

Tabelul 26

Activitatea anticorpilor sistemului MNS la diferite fenotipuri

Interacțiunea cu anticorpii anti -					Fenotipul
M	N	S	s	U	
+	-				M+N-
+	+				M+N+
-	+				M-N+
		+	-	+	S+s-U+
		-	+	+	S-s-U+
		-	-	-	S-s-U-
		-	-	(+)	S-s- U+*

Ac anti-M reprezintă un amestec de IgM și IgG sau IgM și pot fi deceleți în serul persoanelor care au beneficiat de transfuzii eritrocitare. În

mediul salin aglutinarea hematiilor M-pozitive poate fi indusă atât de IgM, cât și de IgG. În unele cazuri la diminuarea pH până la 6,5 Ac anti-M pot manifesta o aglutinare mai evidentă.

De însemnătate clinică sunt Ac IgM activi la +37°C în TAG, dar extrem de rar aceștia pot induce boală hemolitică la nou-născut sau hemoliza celulelor transplantate. Autoanticorpii anti-M sunt depistați în anemiile hemolitice autoimune.

Ac anti-N se întâlnesc mai rar, sunt IgM și manifestă activitate de aglutinine slab reactogene *a frigore*. Unele mostre potențial importante de Ac IgG se întâlnesc la persoanele cu fenotipuri rarissime M+N-S-s-U- și M+N-S-s-U+<sup>w</sup>. La unii pacienți sub hemodializă se pot depista anticorpi cu activitate majoră și specificitate identică anti-N, dacă pentru dializă au fost utilizate membrane sterilizate cu formaldehidă. Aceasta din urmă, precum s-a constatat, induce modificări imunogenetice ale Ag N și 'H'. Lecitina obținută din boabele *Vicia graminea* posedă o specificitate identică cu anti-N și poate fi utilizată ca reagent anti-N eficient în diluția respectivă.

Ac anti-S, anti-s și anti-U se înregistrează rar și, de regulă, sunt secretați prin stimulență eritocitară. Ei sunt capabili să inducă reacții hemolitice posttransfuzionale și maladia hemolitică a nou-născutului. Detecția acestor Ac se practică de obicei prin utilizarea TAG; au fost, însă, descrise și mostre reactive în mediul salin, dar autoanticorpii de specificitatea dată se întâlnesc rar și mai rar ei pot induce anemia hemolitică autoimună și pot fixa complementul.

Ac anti-S sunt IgM sau IgG, iar anti-s aparțin de regulă clasei de imunoglobuline G.

Anticorpii anti-U sunt de incidență minoră și aparțin de clasa IgG, iar cei de valoare clinică sunt relevați în TAG și pot fixa complementul. De altfel au fost identificați exclusiv la rasa negroidă.

Rezumând asupra materialelor expuse, conchidem că Ac anti-M și anti-N induc reacții transfuzionale rar și numai în cazul când Ac sunt activi la +37°C. Ac anti-S, -s, -U pot suscita complicații de tip imediat sau întârziat, dar aceste cazuri sunt destul de rare.

Maladia nou-născutului indusă de Ac anti-M se întâlnește rar, dar cazurile descrise au fost de evoluție severă.

Ac anti-N nu induc boala hemolitică a nou-născutului.

Ac anti-S, -s pot cauza arare boala hemolitică a nou-născutului, dar evoluția acesteia este ușoară și doar rareori – severă.

Toate mostrele de Ac anti-U se consideră capabile să provoace boala hemolitică a nou-născutului.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Kell**

Antigenul Kell a fost identificat la 1946 de Coombs în timp ce acesta cerceta anticorpilor ce provocase BHNN. Actualmente sunt cunoscute 24 antigene eritrocitare ce aparțin sistemului Kell (tab. 27).

*Tabelul 27*

**Antigenele sistemului Kell și frecvența lor de înregistrare**

Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag	Frecvența, %	Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag	Frecvența, %
KEL1	K (Kell)	9,0	KEL16	k-like	99,8
KEL2	k (Chellano)	99,8	KEL17	Wk <sup>a</sup> Weeks	0,3
KEL3	Kp <sup>a</sup> (Pennery)	2,0	KEL18	Marshall	>99,9
KEL4	Kp <sup>b</sup> (Rautenberg)	>99,9	KEL19	Sublett	>99,9
KEL5	Ku (Total Kell)	>99,9	KEL20	Km	>99,9
KEL6	Js <sup>a</sup> (Sutter)	Albi, <0,1	KEL21	Kpc Levay	0,1
KEL7	Js <sup>b</sup> (Matthews)	Albi, >99,9	KEL22	Ikar	>99,9
KEL10	U1 <sup>a</sup>	Finlandezi 2,6	KEL23	Centauro	<0,1
KEL11	Cote	>99,9	KEL24	Cls	<2,0
KEL12	Bockman	>99,9	KEL25	VLAN	
KEL13	Sgro	>99,9	KEL26	TOU	
KEL14	Santini	>99,9	KEL27	RAZ	

Ag K posedă imunogenitate majoră și este de importanță clinică la transfuziile sanguine. Frecvența de înregistrare constituie 7-9%. Ag sistemului dat sunt niște glicoproteine și posedă legături disulfidice importante pentru amplasarea Ag sistemului Kell eritocitar. Ag sunt scindate de mercaptoetanol, ditiotreititol etc. (agenți sulfidoreductanți). Epitopii Ag sunt expresiați într-un număr mic pe suprafața eritrocitelor (K-3500, k – 2000-5000).

Pe eritrocitele fetale Ag sistemului Kell se afișează precoce, în primele luni de sarcină. În tabelul 28 sunt reprezentate fenotipurile principale ale

sistemului Kell și frecvența acestora, printre care și  $K_0$  (fenotipul 0), când eritrocitele nu posedă nici unul din antigenele acestui sistem.

Tabelul 28

Frecvența unor fenotipuri de sistemul Kell

Fenotipul	Frecvența, %		Fenotipul	Frecvența, %	
	rasa albă	rasa negroidă		rasa albă	rasa negroidă
K+k-	0,2	Rar	Kp (a-b+)	97,7	100
K+k+	8,8	2	Js (a+b-)	0	1
K-k+	91,0	98	Js (a+b+)	rar	19
Kp (a+b-)	Rar	0	Js (a-b+)	100	80
Kp(a+b+)	2,3	Rar	$K_0$		Foarte rar

Ag sistemului Kell (K1, K2, K3, K4, K6, K7, K11, K14, K17, K21, K24) sunt moștenite sub aspectul unor caractere asociate, ce amintesc de poziția Ag principali ai sistemului Rh. Nu toate combinațiile genetice teoretic posibile se atestă în sistemul Kell.

Actualmente se cunoaște că există o relație de corelare între expresia Ag eritrocitari Kell și Ag  $K_x$ . Ultimul aparține de sistemul antigenic XK (ISBT nr.19), iar gena care codifică sinteza lui este amplasată pe cromozomul X. Absența Ag  $K_x$  pe eritrocite scade și expresia Ag sistemului Kell și poate modifica morfologia eritrocitelor și reduce viabilitatea acestora. Acest fenomen asociază distrofia musculară manifestă la bărbați și cu alterarea morfologică a hematiilor. Sindromul a fost denumit fenomenul McLeod.

Ac anti-K sunt frecvent reperați în serul pacienților ce urmează transfuzii sanguine. Ac anti-K sunt mai frecvent activi în TAG și aparțin de clasa IgG. Se mai întâlnesc și Ac anti-K la persoanele care în anamneză n-au hemotransfuzii sau MHNN. În aceste cazuri Ac aparțin de clasa IgM, iar afișarea lor este asociată cu răspândirea largă a microorganismelor, pe rețele celulare al căroră conține structuri chimic identice cu Ag K uman. Majoritatea Ac (95–98%) țin de clasa IgG, subclasa IgG1. În majoritatea cazurilor acestea nu fixează complementul, reacționează operativ cu eritrocitele prelucrate cu enzime (papaină, fitină).

Dat fiind că 90% din donatori sunt K-negativi, nu este dificilă selectarea sângelui compatibil pentru pacienții cu Ac anti-K. Caracteristica clinică



și serologică a Ac anti-k este identică cu cea a Ac anti-K, care se întâlnesc mai rar, deoarece numai 1 din 500 indivizi nu posedă Ag k și, respectiv, în acest caz este dificilă selectarea sângelui compatibil. Activitatea imunologică a Ac de sistemul Kell cu hematiile diferitor fenotipuri este prezentată în tabelul 29.

Tabelul 29

**Activitatea serologică a anticorpilor sistemului Kell  
cu hematiile unor fenotipuri eritrocitare**

Anticorpii anti-						Fenotipul
K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	
+	-					K+k-
+	+					K+k+
-	+					K-k+
		+	-			Kp (a+b-)
		+	+			Kp (a+b+)
		-	+			Kp (a-b+)
				+	-	Js (a+b-)
				+	+	Js (a+b+)
				-	+	Js (a-b+)
				-	-	K <sub>n</sub>

Ac anti-Kp<sup>a</sup>-Kp<sup>b</sup>, -Js<sup>a</sup>, -Js<sup>b</sup> se întâlnesc mai rar decât anti-K, dar aceștia posedă caracteristici serologice identice și se consideră de importanță clinică. Ac de acest gen pot apărea în urma transfuziei sau prin imunizare fetomaternală. Frecvența înregistrării lor este dependentă de imunogenitate și de incidența lor la donatori.

Ac anti-Ag eritrocitare de sistemul Kell au implicații clinice și pot induce complicații posttransfuzionale și boala hemolitică a nou-născutului. Reacțiile transfuzionale induse de Ac anti-K, -k, Kp<sup>a</sup>, -Kp<sup>b</sup>, -Js<sup>a</sup>, -Js<sup>b</sup> sunt de caracter sever, uneori cu sfârșit letal. Hemoliza eritrocitelor este extravasculară.

Ac anti-K, -k, Kp<sup>a</sup>, -Kp<sup>b</sup>, -Js<sup>a</sup>, -Js<sup>b</sup>, -Kell 14, -Kell 22, -Kell 23 pot induce MHNN. Ac anti-K și anti-k provoacă cele mai grave reacții cu moartea întrauterină a fătului. MHNN indusă de Ac anti-K se caracterizează prin anemia fătului provocată de supresia hematopoezei și nu de hemoliza eritrocitelor. Frecvența înregistrării MHNN indusă de anti-K constituie un caz la 10 000-20 000 nașteri.

## Sistemul antigenic eritrocitar Duffy (FY)

Ag de sistemul Duffy sunt glicoproteine ce intersectează membrana citoplasmatică. Ele sunt expresiate nu numai pe eritrocite, dar și în diferite organe (rinichi, splină, cord, pulmoni, creier). Actualmente se cunosc 6 Ag ale acestui sistem cu diversă frecvență de înregistrare (vezi tab. 30).

Tabelul 30

### Antigenele eritrocitare ale sistemului Duffy

Antigenele		Frecvența, %		Fenotipul	Frecvența, %	
nr. după ISBT	simbolul	rasa albă	rasa neagră		rasa albă	rasa neagră
FY1	Fy <sup>a</sup>	67	10	Fy (a+b-)	17	9
FY2	Fy <sup>b</sup>	83	23	Fy (a+b+)	49	1
FY3	Fy3	>99,9	32	Fy (a-b+)	34	22
FY4	Fy4	rar	98	Fy (a-b-)	foarte rar	68
FY5 FY6	Fy5 Fy6	>99,9 >99,9	32 32	La malaiezi frecvența înregistrării Fy <sup>a</sup> atinge 100%		

Conform celor prezentate în tab. 30, Ag FY3 are o frecvență majoră de înregistrare și este prezent pe eritrocitele care posedă atât Ag Fy<sup>a</sup>, cât și Ag Fy<sup>b</sup>. Dintre fenotipurile acestui sistem la rasa albă sunt mai rar atestate variantele Fy (a-b-), pe când la cea negroidă ele se înregistrează cu o frecvență de până la 68%, iar în unele regiuni cota acestora atinge 100%. A fost descrisă forma slab expresivă a Ag Fy<sup>b</sup>, denumită Fy<sup>x</sup>, care poate rămâne neobservată, dacă nu se utilizează Ac anti-Fy<sup>b</sup> cu activitate majoră. Variantele Fy<sup>a</sup> și Fy<sup>b</sup> sunt receptori pentru *Plasmodium Knowlesi* și *vivax*. Indivizii care nu sunt dotați cu Ag Fy<sup>a</sup> și Fy<sup>b</sup> sunt nonreceptivi la malarie. Glicoproteina Duffy a fost identificată ca receptor eritrocitar pentru citokine (de exemplu, IL-8). Grație activității biologice înalte a citokinelor, se presupune că glicoproteinele Duffy joacă un rol important în absorbția acestora, prevenind astfel acțiunea lor nefavorabilă asupra eritrocitelor. Ag Fy<sup>a</sup> și Fy<sup>b</sup> se scindează sub acțiunea proteazelor în testele serologice și sunt areactogene în testele ce utilizează enzime. Ag Fy3, Fy4, Fy5 nu pot fi catabolizate de enzime.

Ag sistemului Duffy sunt bine dezvoltate la momentul nașterii, dar sunt descrise doar cazuri rare de MHNN incitată de acestea.

Majoritatea Ac anti-antigenele sistemului Duffy sunt prezentate de IgG1 și apar în rezultatul stimulării imune. A fost demonstrat efectul dozei  $Fy^a$ : capacitatea de a reacționa mai relevant cu eritrocitele  $Fy^a/Fy^a$ , comparativ cu tandemul  $Fy^a/Fy^b$ . Testarea acestor Ac se poate realiza mai pregnant în TAG. Foarte rar Ac anti-Ag sistemului Duffy se implică pe poziția de aglutinine directe. Multe mostre de Ac activează complementul, dar nu reacționează în testelele cu enzime datorită scindării Ag  $Fy^a$  și  $Fy^b$  de către enzime. Activitatea serologică a Ac cu Ag diferitor fenotipuri este elucidată în tab. 31.

Tabelul 31

**Activitatea serologică a anticorpilor sistemului Duffy cu Ag diferitor fenotipuri**

Reactivitatea cu anti-		Fenotipul
$Fy^a$	$Fy^b$	
+	0	Fy (a+b-)
+	+	Fy (a+b+)
0	+	Fy (a-b+)
0	0	Fy (a-b-)

Ac anti- $Fy^a$  și  $Fy^b$  pot induce boala hemolitică a nou-născutului și reacții posttransfuzionale. Anti- $Fy^b$  se întâlnesc mai rar și sunt slab reactogeni. Reacțiile posttransfuzionale pot fi de tip imediat și întârziat, uneori devin fatale. Mostrele serice anti- $Fy^a$  și anti- $Fy^b$  reacționează energic doar cu hematiile care conțin doze duble de Ag. Indivizii rasei albe care expresiază doar 1 dintre cele 2 Ag (homozigote după Ag respectiv) au o cantitate dublă de molecule antigenice. La rasa negroidă eritrocitele cu 1 Ag expresiază Ag în cantități scăzute și nu manifestă reacții intensive cu Ac reactogeni. În dependență de doză Ac anti- $Fy_3$ , anti- $Fy_4$ , anti- $Fy_5$  au fost testați în serul pacienților cu fenotip Fy (a-b-). Anti- $Fy_6$  prezintă Ac monoclonali murini care reacționează cu toate eritrocitele Fy (a+) /Fy (b+) și nu interacționează cu hematiile Fy (a-b-).

**Sistemul antigenic eritrocitar Kidd (JK)**

Antigenele sistemului eritrocitar Kidd sunt proteine și participă la transportul ureei în celulă. Actualmente sunt cunoscute 3 antigene ale acestui sistem și 4 fenotipuri (vezi tab. 32).

Fenotipul Jk (a-b-) este rar reperat și poate apare sub acțiunea inhibitorului dominant In(Jk) sau dacă a fost moștenită de la ambii părinți alela Jk "mută" (non-expresivă).

Se prezumă că Ag Jk3 este prezent și pe hematiile Jk (a+) și Jk (b+) – o situație de similitudine cu Fy3 prezent concomitent pe celulele Fy (a+) și Fy (b+). Enzimele și reductorii nu scindează Ag Jk.

Tabelul 32

**Antigenele eritrocitare ale sistemului Kidd (JK)**

Antigenele		Frecvența, %		Fenotipul	Frecvența, %	
nr. după ISBT	simbolul	rasa albă	rasa negroidă		rasa albă	rasa negroidă
JK1	Jk <sup>a</sup>	77	92	Jk (a+b-)	26,3	51,1
JK2	Jk <sup>b</sup>	74	49	Jk (a+b+)	50,3	40,8
JK3	Jk <sup>ab</sup>	>99,9	>99,9	Jk (a-b+)	23,4	8,1
				Jk (a-b-) Jk: -3	rar	rar

Anticorpii anti-Jk<sup>a</sup> au fost depistați primar la 1951 în serul unei femei care a născut un copil ce a făcut MHNN, iar anti-Jk<sup>b</sup> - în serul unui pacient cu reacție posttransfuzională. Ambele tipuri de Ac reacționează mai pregnant în TAG, dar la utilizarea mostrelor serice proaspăt recoltate pot manifesta activitate și în mediul salin. Destul de frecvent acești Ac dau reacții slabe chiar la prima testare, iar la păstrarea serului pot fi indetectabili. Acest fenomen, posibil, este dependent de fixarea complementului pe eritrocite, dar nu toți Ac fixează complementul. Serul proaspăt preparat, care conține anti-Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>, demonstrează efectul dozei, reacționând numai cu eritrocitele care conțin o doză dublă de Ag. Activitatea serului păstrat care conține anti-Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup> și a pierdut capacitatea de a reacționa se poate incita prin suplimentarea cu ser uman proaspăt (sursă de complement) sau prin utilizarea TAG cu eritrocite prelucrate cu enzime. Ac anti-Jk3 reacționează cu hematiile Jk<sup>a</sup> și Jk<sup>b</sup> pozitive și sunt secretate la indivizi cu Jk(a-b-).

Anticorpii anti-Kidd pot induce, în unele cazuri, BHNN care evoluează într-o formă ușoară, dată fiind concentrația minoră de Ac care au transbordat placenta. În schimb este cunoscută antrenarea acestor Ac în dezvoltarea formelor grave de reacții posttransfuzionale. Ultimele pot fi de caracter imediat sau întârziat. Aceste reacții se produc în situațiile când

Ac sunt secretați rapid prin răspunsul anamnestic imun la Ag eritrocitelor parvenite prin transfuzie și vor conduce la hemoliza acestora. Testările de până la transfuzie confirmă faptul, că acești Ac erau lipsă în testele serologice primar efectuate. Acest fapt indică importanța studiilor efectuate până la selectarea sângelui pentru transfuzie. În cazul pacienților la care s-au detectat și identificat Ac, datele notițelor anterioare permit evitarea contactului ulterior cu agentul imunizator cunoscut. Hemoliza ce se produce în asemenea situații este mai frecvent de caracter extravascular, iar hemoliza intravasculară este indusă de Ac care fixează complementul. Anticorpii examinați aparțin subclaselor IgG1 și IgG3.

Serul indivizilor cu fenotip rar Jk<sub>1</sub>Jk<sub>2</sub> conține Ac ce reacționează cu toate mostrele eritrocitare Jk (a+) și Jk (b+), nu, însă, și cu celulele Jk (a-b-).

### **Sistemul de antigene eritrocitare Lutheran (LU)**

Primar Ac anti-Lu<sub>1</sub> a fost depistat în 1945 într-un ser care conținea diverse tipuri de anticorpi. În prezent sistemul LU include 19 antigene (tab. 33 ), care sunt niște glicoproteine.

Ag Lu<sup>a</sup> și Lu<sup>b</sup> sunt slab dezvoltate pe eritrocitele nou-născuților și la adulți numărul de molecule pe un eritrocit este minor: 600-1600 pentru Lu (a+b+) și 1400-3800 – pentru celulele Lu (a-b+).

La sistemul dat se referă și o serie de Ag de incidență înaltă – LU2, LU4, LU5, LU6, LU7, LU8, LU11, LU12, LU13, LU16, LU17, LU20. Ac anti-Ag respective nu reacționează cu eritrocitele Lu (a-b-), indiferent de cauza apariției fenotipului dat. Alte 2 Ag rare LU9 și LU14 au fost de asemeni incluse în sistemul Lutheran pentru relația lor indirectă cu Ag LU 6 și, respectiv, LU8. Ag Au<sup>a</sup> (LU18) de frecvență majoră - 80% indivizi ai rasei albe posedă acest Ag și Ag Au<sup>b</sup> (LU19), prezent la 50% de albi, s-au considerat până nu demult ca fiind manifestări independente ale unei singure gene. Actualmente a fost demonstrată apartenența lor la sistemul Lutheran.

## Antigenele eritrocitare ale sistemului Lutheran

Nr. Ag după ISBT	Simbolul Ag	Nr. Ag după ISBT	Simbolul Ag	Fenotipul	Frecvența, %
LU1	Lu <sup>a</sup>	LU12**	Much	Lu (a+b-)	0,15
LU2**	Lu <sup>b</sup>	LU13**	Hughec	Lu (a+b+)	7,5
LU3**	Lu <sup>ab</sup>	LU14*		Lu (a-b+)	92,4
LU4**		LU16**		Lu (a-b-)	rar
LU5**		LU17**			
LU6**	Jank	LU18	Au <sup>a</sup> (Auberger)		
LU7**		LU19	Au <sup>b</sup>		
LU8**		LU20**			
LU9*	Mull	LU21**			
LU11**	Singleton				

**Notă:** \* antigene rar întâlnite;\*\* antigene frecvent întâlnite

Fenotipul Lu (a-b-) se întâlnește foarte rar (1:3000) și poate rezulta din următoarele situații genetice : 1) gena amorfă Lutheran este moștenită de la ambii părinți; 2) fenotipul negativ poate fi moștenit ca criteriu dominant prin moștenirea independentă a genei inhibitor *In* (*Lu*), care face imposibilă expresia normală a Ag de sistem Lutheran și a altor Ag (exp. P, I, AnWj, In<sup>a</sup>, In<sup>b</sup>); 3) fenotipul Lu (a-b-) poate fi indus de acțiunea supresorului amplasat pe cromozomul X, recesiv în varianta de manifestare.

Ac anti-Lu<sup>a</sup> și anti-Lu<sup>b</sup> se întâlnesc mai rar, fiind secretați la gravide sau pe fond de transfuzii sanguine, dar pentru apariția lor nu este necesar stimulul eritrocitar. Acești Ac sunt slab dezvoltati la naștere și nu sunt cunoscuți în ipostaza de cauză a bolii hemolitice, a reacțiilor hemolitice posttransfuzionale. Ac anti-Lu<sup>b</sup> reduc durata de viață a eritrocitelor transfuzionate, induc reacții posttransfuzionale ușoare sau nu le provoacă deloc. Majoritatea Ac anti-Lu<sup>a</sup> și unele mostre de anti-Lu<sup>b</sup> aglutinează eritrocitele suspendate în mediu salin ce posedă Ag respectivi cu formarea aglutinatelelor eritrocitare de mărime mică și medie, care se amplasează printre multiplele celule neaglutinate. Activitatea serologică a Ac Lutheran cu hematiile diferitor fenotipuri este redată în tabelul 34.

## Activitatea serologică a anticorpilor sistemului Lutheran

Interacțiunea cu anti-		Fenotipul
Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	
+	-	Lu (a+b-)
+	+	Lu (a+b+)
-	+	Lu (a-b+)
-	-	Lu (a-b-)

*Notă:* „+” reacție pozitivă; „-” reacție negativă

Anticorpii anti-antigenele eritrocitare de sistemul Lutheran aparțin de clasele IgM sau IgG. Aceștia se manifestă activi atât la *t* încăperii, cât și la +37°C. Ac anti-Ag Lu induce reacții posttransfuzionale cu hemoliză extravasculară. Unele mostre de Ac sunt prezente sub formă de IgG4 și chiar în prezența conflictului imunologic fetomaternal după Ag Lutheran aceștia induc forme ușoare de MHNN.

**Sistemul de antigene eritrocitare Diego (DI).**

Primul Ag al sistemului eritocitar Diego a fost identificat în anul 1956 în Venezuela în cadrul unui studiu de specificitate al Ac care au provocat MHNN. În prezent sunt cunoscute 21 antigene eritrocitare ale acestui sistem, dar numai 4 din ele sunt studiate la modul suficient (tab. 35).

Tabelul 35

## Antigenele eritrocitare ale sistemului Diego

Frecvența înregistrării, %					
Nr. antigenului după ISBT	Simbolul Ag	Rasa albă și negroidă	Chinezii	Japonezii	Aborigenii americani
DI 1	Di <sup>a</sup> Diego	<0,1	3-5	10	2-36
DI 2	Di <sup>b</sup>	>99,9	>99	>99,7	nu sunt date
DI 3	Wr <sup>a</sup> Wright	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
DI 4	Wr <sup>b</sup>	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

Antigenul Di<sup>a</sup> se întâlnește rar. Ag Di<sup>a</sup>/Di<sup>b</sup> sunt eficienți în calitatea de markeri în antropologie grație faptului că Ag Di<sup>a</sup> este atestat aproape

exclusiv la populația mongoloidă, inclusiv la aborigenii din SUA, unde frecvența lor de înregistrare atinge 36%.

Antigenul Wright (DI3 și DI4) s-a referit primar la alte colecții, dar după ce s-a constatat că sinteza este controlată de locusul *DI* au fost specificate în acest sistem. Ag  $Di^b$  se înregistrează cu o frecvență majoră. Anticorpul anti-Ag eritrocitare de sistemul Diego sunt imune și active în testul antiglobulinic, nu fixează complementul. Ac anti- $Di^a$  pot induce MHNN sau hemoliza eritrocitelor  $Di(a+)$  la transfuziile sanguine. Ac anti- $Di^b$  se întâlnesc rar, dar au implicații clinice. Anti- $Wr^a$  sunt Ac naturali și sunt secretați fără stimularea eritocitară. Se întâlnesc destul de frecvent, dar rămân neelucidați în cazul când pentru screeningul Ac nu se utilizează celulele  $Wr(a+)$ . În cazuri mai rare acești Ac induc MHNN și reacții posttransfuzionale.

Activitatea serologică a Ac sistemului Diego la diferite fenotipuri este prezentată în tabelul 36.

Tabelul 36

#### Activitatea imunologică a anticorpilor sistemului Diego

Interacțiunea cu anticorpi anti-		Fenotipul	Frecvența fenotipului %
$Di^a$	$Di^b$		
+	-	$Di(a+b-)$	0
+	+	$Di(a+b+)$	Rar
-	+	$Di(a-b+)$	100
$Wr^a$	$Wr^b$		
+	-	$Wr(a+b-)$	0
+	+	$Wr(a+b+)$	1
-	+	$Wr(a-b+)$	99

#### Sistemul de antigene eritrocitare Yt.

Acest sistem conține 2 antigene:  $Yt^a$  și  $Yt^b$ . Ag  $Yt$  sunt localizate pe molecula acetilcolinesterazei eritrocitare – enzimă cu rol important în transmiterea impulsurilor neuronale. Frecvența de înregistrare a Ag  $Yt^a$  este majoră - 99,7%. Sinteza Ag este controlată de genomul amplasat pe cromozomul 7. Majoritatea mostrelor de anti- $Yt^a$  sunt areactogene, dar în unele cazuri acestea induc hemoliza sporită a eritrocitelor transplantate  $Yt^a$ -pozitive, determinând complicații posttransfuzionale. Nu există cazuri descrise de apariție a MHNN provocate de Ac anti- $Yt^a$ . Ag  $Yt^b$  se întâlnește rar (8% cazuri). Ac anti- $Yt^b$  se întâlnesc de asemenea destul de rar și nu



induc MHNN sau reacții hemolitice posttransfuzionale. Frecvența diferitor fenotipuri ale sistemului antigenic eritrocitar Yt și reactivitatea imunologică a Ac respectivi este elucidată în tab. 37.

Tabelul 37

**Fenotipurile sistemului antigenic Yt și reactivitatea serologică a anticorpilor**

Fenotipul	Frecvența la rasa alba, %	Interacțiunea cu Ac anti-	
		Yt <sup>a</sup>	Yt <sup>b</sup>
Yt (a+b-)	91,9	+	-
Yt (a+b+)	7,9	+	+
Yt (a-b+)	0,2	-	+

**Sistemul de antigene eritrocitare XG**

Acest sistem conține 2 antigene: Xg<sup>a</sup> și CD99. Ag Xg<sup>a</sup> a fost decoperit în 1962, iar prezența lui este mai caracteristică pentru bărbați decât pentru femei. Aceasta particularitate de moștenire a criteriului cu cromozomul X (femeile moștenesc câte un cromozom X de la fiecare parinte, pe când bărbații - numai un cromozom X de la mamă) a fost specificată ca Ag Xg<sup>a</sup>.

Frecvența de înregistrare a diferitor fenotipuri ale Ag Xg<sup>a</sup> la bărbați și femei (rasa albă) este elucidată în tab. 38.

Tabelul 38

**Frecvența fenotipurilor Xg la bărbați și femei**

Fenotipul	Frecvența, %	
	Bărbați	Femei
Xg (a+)	65,6	88,7
Xg (b+)	34,4	11,3

Antigenul dat este catabolizat de proteaze (papaina, fișina) și de aceea în test-sistemele ce operează cu enzime vor fi și rezultate negative.

Ac anti- Xg<sup>a</sup> se întâlnesc rar, ei reacționează preferențial în TAG. Sunt cunoscute 3 mostre care induc aglutinarea eritrocitelor suspendate în mediu salin.

Importanța clinică a Ac anti-Ag Xg<sup>a</sup> și CD99 nu a fost studiată. A fost descrisă o mostră de Ac autoimuni cu specificitatea dată. Ac anti-Xg<sup>a</sup> pot fi utilizați pentru studiul moștenirii criteriilor genetice legate de cromozomul X.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Scianna (SC)**

Sistemul antigenic SC este reprezentat de 4 antigene: Sc1, Sc2, Sc3, Rd. Ag Sc1 se atestă frecvent, de vreme ce Sc2 - destul de rar. Sc1 și Sc2 se comportă ca produse ale alelelor antigenice (tab. 39). Ag SC sunt amplasate pe glicoproteine cu masa moleculară de 60-68 kD.

Tabelul 39

**Frecvența fenotipurilor sistemului antigenic SC și activitatea anticorpilor**

Fenotipul	Frecvența (%) la rasa alba	Interacțiunea cu Ac anti-	
		Sc1	Sc2
Sc:1, -2	99,7	+	-
Sc:1, 2	0,3	+	+
Sc: -1, 2	Foarte rar	-	+
Sc: -1, 2	Foarte rar	-	-

Se consideră, că Ag Sc3 este prezent pe eritrocitele tuturor indivizilor, care au moștenit genele *Sc1* și *Sc2* – o situație analogică cu cea a Ag Fy3.

Toate aceste Ag sunt insensibile la acțiunea enzimelor utilizate în testările izoserologice. Gena care codifică Ag Scianna este ancorată pe cromozomul 1. Ac care recunosc acești antigeni se întâlnesc rar. Ac anti-Sc1 nu induc MHNN sau reacții posttransfuzionale. Ac anti-Sc2 sunt capabili să provoace forme ușoare de MHNN.

Ag Rd rar întâlnit este codificat de genomul aceleiași locus la care se referă și sistemul SC, dar există și alte dovezi care confirmă apartenența Ag dat la sistemul sanguin Scianna.

Implicarea clinică a Ac sistemului Scianna este puțin studiată, dată fiind frecvența minoră de înregistrare a acestuia.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Dombrock (DO).**

Acest sistem este reprezentat de 5 antigene: Do<sup>a</sup>, Do<sup>b</sup>, Gy<sup>a</sup>, Hy, Jo<sup>a</sup>. Antigenul Do<sup>a</sup> se întâlnește la rata de 66%, Do<sup>b</sup> în 82% de cazuri. Ambele sunt imunogene și la transfuzii induc sinteza de Ac cu implicații clinice sub formă de complicații hemolitice posttransfuzionale. Cazuri de boală hemolitică a nou-născutului indusă de aceștia nu s-au raportat.

Ag Gy<sup>a</sup>, Hy și Jo<sup>a</sup> au o frecvență majoră de înregistrare, iar fenotipurile acestui sistem sunt reprezentate în tabelul 40.

**Fenotipurile sistemului de antigene eritrocitare Dombrock**

Fenotipul	Do <sup>a</sup>	Do <sup>b</sup>	Gy <sup>a</sup>	Hy	Jo <sup>a</sup>
Do (a+b-)	+	-	+	+	+
Do (a+b+)	+	+	+	+	+
Do (a-b+)	-	+	+	+	+
Gy (a-)	-	-	-	-	-
Hy -	-	(+)	(+)	-	-
Jo (a-)	(+)	-	+	(+)	-

**Notă:** (+) expresia slabă a antigenului

Eritrocitele Gy (a-) prezintă celulele fenotipului 0. Fenotipurile Gy (a+), Hy- și Jo (a-) au fost depistate numai la rasa negroidă. Reactivitatea acestor Ag poate fi majorată prin prelucrarea hematiilor cu papaină, fițină. De memorat că tripsina, pronaza,  $\alpha$ -hemotripsina și reagenții sulfhidrili sunt capabili să scindeze aceste Ag sau să atenueze activitatea lor.

Anticorpii anti-Do<sup>a</sup> nu sunt de răspândire largă, în ser fiind prezenți și Ac de altă specificitate, dar ei sunt apți să incite MHNN și RPT de forme ușoare.

Anti-Do<sup>b</sup> sunt de asemenea rar înregistrați, ei fiind atestați cu multiple alte specificități, dar recunoașterea lor se poate optimiza prin utilizarea hematiilor prelucrate cu fițină. Unele mostre pot induce RPT. Ac anti-Ag Gy<sup>a</sup>, Hy și Jo<sup>a</sup> pot contribui la minorizarea viabilității eritrocitelor transplantate, de asemenea pot induce forme ușoare de MHNN.

**Sistemul de antigene eritrocitare Colton (Co).**

Acest sistem este reprezentat de trei antigene: Co<sup>a</sup>, Co<sup>b</sup>, Co<sup>3</sup>. Antigenul Co<sup>a</sup> se înregistrează frecvent, Ag Co<sup>b</sup> – este mai rar întâlnit. Co<sup>3</sup>, ca de altfel și Fy<sup>3</sup> ar putea fi produsul uneia din genele Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup>. Toți acești anticorpi pot induce reacții posttransfuzionale și MHNN. Frecvența diferitor fenotipuri de asemenea caracter la rasa albă este redată sumar în tabelul 41.

**Frecvența fenotipurilor sistemului antigenic Colton și reactivitatea anticorpilor**

Fenotipul	Frecvența, %	Interacțiunea cu Ac anti-	
		Co <sup>a</sup>	Co <sup>b</sup>
Co (a+b-)	89,3	+	-
Co (a+b+)	10,4	+	+
Co (a-b+)	0,3	-	+
Co (a-b-)	Foarte rar	-	-

Prelucrarea cu fermenți a eritrocitelor cercetate amplifică reacția lor cu Ac respectivi. Chiar dacă sunt de incidență restrânsă, Ac anti-Co<sup>a</sup> și anti-Co<sup>b</sup> pot deveni suportul causal al MHNN sau al reacțiilor posttransfuzionale (RPT). Ac anti-Co<sup>b</sup> induc uneori RPT, nu au fost atestate, însă, și implicații ale acestuia în definiția MHNN.

**Sistemul de antigene eritrocitare Landsteiner-Wiener (LW).**

Este reprezentat de 3 antigene: Lw<sup>a</sup>, Lw<sup>b</sup> și Lw<sup>ab</sup>, care se denaturează în prezența reagenților sulfhidrici (DTT), iar sub influența pronazei devin insensibili la papaină și fișină. Fenotipurile antigenice ale sistemului LW și frecvența lor la rasa albă sunt redată în tabelul 42.

Tabelul 42

**Frecvența fenotipurilor antigenice și reactivitatea anticorpilor sistemului LW**

Fenotipul	Frecvența, %	Interacțiunea Ac anti-	
		Lw <sup>a</sup>	Lw <sup>b</sup>
Lw (a+b-)	Foarte rar	+	-
Lw (a+b+)	<1	+	+
Lw (a-b+)	>99	-	+

Deoarece Ag LW sunt adesea atestate în combinații și asociații antigenice, aceștia au fost studiați sub aspectul unor eventuale interrelații cu Ag sistemului Rh. Astfel s-a constatat că hematiile nule ale indivizilor cu genotip Rh sunt LW (a-b-). Hematiile D-pozitive cu LW (a+) leagă cantități majore de Ac anti-LW (a+) comparativ cu celulele D-negative LW (a+). S-

a mai apreciat în acest sens, că pentru expresiunea efectivă a glicoproteinei LW este necesară legarea ei cu proteinele Rh, mecanismul acestei interacțiuni fiind necunoscut. Anticorpul anti-Ag Landsteiner-Wiener nu induce MHNN și complicații posttransfuzionale.

### **Sistemul antigenic eritrocitar Chido-Rodgers (CH/RG).**

Încadrează 7 antigene eritrocitare: *Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, WH*. Antigenele de grup sunt frecvent înregistrate și se situează pe componenta a 4 a complementului (C4). Ele nu sunt caracteristice pentru eritrocite, dar sunt absorbite pe suprafața lor. Prezentăm fenotipurile antigenice ale acestui sistem este redat în tabelul 43.

Tabelul 43

**Fenotipurile antigenice ale sistemului CH/RG și frecvența acestora la rasa albă**

Fenotipul	Frecvența aproximativă, %
Ch+Rg+	95,0
Ch-Rg+	2,0
Ch+Rg-	3,0
Ch-Rg-	Foarte rar

Catalogarea și specificarea mostrelor serice este realizată încă incomplet, de aceea la testarea Ac pot apărea diferite dificultăți. Aprecierea lor rapidă este posibilă, dacă se folosesc eritrocite acoperite cu molecule C4.

Anticorpul anti-antigene eritrocitare CH/RG nu induce MHNN și complicații posttransfuzionale.

### **Sistemul antigenic eritrocitar Gerbich (GE).**

Respectivul sistem conține 7 antigene: *Ge2, Ge3, Ge4, Wb, Ls<sup>a</sup>, An<sup>a</sup>, Dh<sup>a</sup>*, dintre care 3 (*Ge2, Ge3 și Ge4*) se întâlnesc frecvent, iar celelalte 4 (*Wb, Ls<sup>a</sup>, An<sup>a</sup>, Dh<sup>a</sup>*) – destul de rar. Fenotipurile mai frecvent înregistrate ale sistemului GE sunt încadrate în tabelul 44.

**Fenotipurile antigenice ale sistemului Gerbich**

<i>Fenotipul</i>	<i>Anticorpul secretați</i>
<b>Ge: -2, 3, 4 (tip Yus)</b>	<b>Anti-Ge2</b>
<b>Ge: -2, -3, -4 (tip Gerbich)</b>	<b>Anti-Ge2 sau anti-Ge3</b>
<b>Ge: -2, -3, -4 (tip Leach)</b>	<b>Anti-Ge2 sau anti-Ge3</b>

Ag Ge2, Wb, Ls<sup>a</sup>, An<sup>a</sup>, Dh<sup>a</sup> sunt scindate de papaină, fitină, iar Ag Ge3 se manifestă rezistent la acțiunea proteazelor. Anticorpul anti-Ge pot fi imunogeni și sunt secretați prin stimulenta eritrocitară. Acești anticorpi prezintă IgG, uneori cu un amestec de IgM. Testarea lor rapidă este posibilă la utilizarea hematiilor acoperite cu molecule C4. Importanța clinică a acestor Ac este variabilă. Anticorpul anti aceste Ag doar arare pot fi cauza MHNN.

**Sistemul de antigene eritrocitare Cromer (CROM).**

Acest sistem este reprezentat de 11 antigene: Cr<sup>a</sup>, Tc<sup>a</sup>, Tc<sup>b</sup>, Tc<sup>c</sup>, Dr<sup>a</sup>, Es<sup>a</sup>, IFC, WES<sup>a</sup>, WES<sup>b</sup>, UMC, GUTI care se atestă cu o frecvență variabilă (tab. 45).

Tabelul 45

**Antigenele de frecvență majoră și minoră ale sistemului Cromer**

Antigen	Frecvența, %	Antigen	Frecvența, %
Cr <sup>a</sup>	>99	Es <sup>a</sup>	>99
Tc <sup>a</sup>	>99	IFC	>99
Tc <sup>b</sup>	<1	WES <sup>a</sup>	<1
Tc <sup>c</sup>	<1	WES <sup>b</sup>	>99
Dr <sup>a</sup>	>99	UMS	>99

Antigenele acestui sistem sunt ancorate pe proteinele sistemului complementar.

Anticorpul anti-Ag sistemului Cromer sunt de origine imună și se întâlnesc rar. Majoritatea mostrelor de anti-Cr<sup>a</sup>, -WES<sup>b</sup> și Tc<sup>a</sup> au fost atestate la rasa negroidă. Importanța clinică a acestor Ac este și ea variabilă: unele mostre induc minorizarea viabilității eritrocitelor transfuzionate, dar tot acestea se pot intrica în dezvoltarea complicațiilor posttransfuzionale și a bolii hemolitice a nou-născutului.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Knops (KN).**

Încadrează 8 antigene:  $Kn^a$ ,  $Kn^b$ ,  $McC^a$ ,  $SI1$ ,  $Yk^a$ ,  $McC^b$ ,  $SI2$ ,  $SI3$ , toate amplasate pe receptorul complementului CR1 (C3b/C4b). Cu excepția Ag  $McC^b$ , toți Ag sistemului Knops se întâlnesc frecvent, dar cu diferențe pentru rasa alba și cea neagră (tab. 46).

Tabelul 46

#### **Frecvența fenotipurilor antigenice ale sistemului Knops**

Fenotipul	Frecvența aproximativă, %	
	rasa alba	rasa negroidă
<i>Kn (a+) McC (a+)</i>	97,0	95,0
<i>Kn (a+) McC (a-)</i>	2,0	4,0
<i>Kn (a-) McC (a+)</i>	1,0	1,0
<i>Kn (a-) McC (a-)</i>	Rar	rar

Cercetată în testul antiglobulinic, reactivitatea anticorpilor anti-Ag sistemului Knops este variabilă și depinde de numărul și mărimea Ag CR1, de intensitatea de expresie a acestuia.

Anticorpilor anti-Ag Knops nu au și implicații clinice.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Indian (IN).**

Acest sistem include 2 antigene:  $In^a$  - cu frecvență minoră de înregistrare și  $In^b$  - Ag atestat frecvent. Ei sunt amplasați pe proteinele moleculelor de adeziune celulară CD44. Se întâlnesc în multe țesuturi. Frecvența fenotipurilor și reactivitatea cu Ac acestui sistem este prezentată în tab. 47.

Tabelul 47

#### **Frecvența fenotipurilor antigenice și reactivitatea anticorpilor sistemului Indian**

Fenotipul	Frecvența, %	Interacțiunea cu anti -	
		$In^a$	$In^b$
<i>In (a+b-)</i>	Foarte rar	+	-
<i>In (a+b+)</i>	<1,0	+	+
<i>In (a-b+)</i>	>99,0	-	+

Expresia Ag  $In^b$  este minimă pe hematiile Lu (a-b-), de tip In (Lu) dar este de nivel normal pe hematiile Lu (a-b-) ale indivizilor homozigoți după

alele amorfă sau care sunt purtători ai genei supresoare a cromozomului X. Ag sunt sensibile la acțiunea papainei, fitinei ș.a. Ac anti-In<sup>a</sup> nu au importanță clinică. Anticorpul anti-In<sup>b</sup> sunt rar secretați, dar există descrierea unui caz de RPT indusă de acest tip de Ac.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Kx.**

Denumitul sistem este reprezentat de un singur antigen - Kx. Anticorpul anti-Kx se atestă rar și sunt secretați de persoanele afectate de sindromul McLeod, la care acest antigen este absent. Anticorpul rezultați pot induce complicații posttransfuzionale.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Ok.**

Acest sistem antigenic este reprezentat de un singur antigen Ok<sup>a</sup>, cu o mare frecvență de înregistrare. Au fost descrise 2 cazuri de secreție a anticorpilor la acest Ag în Japonia, care au indus reacții posttransfuzionale. Sunt, însă, absente datele ce ar dovedi capacitatea lor de a induce MHNN.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Raph (RAPH).**

Sistemul posedă un singur Ag MER2. Importanța clinică a anticorpilor secretați față de acest Ag nu se cunoaște încă.

### **Sistemul de antigene eritrocitare JMH.**

Acest sistem posedă un singur antigen - JMH cu frecvență majoră de înregistrare. Anticorpul anti-JMH nu induce RPT și MHNN.

### **Sistemul de antigene eritrocitare Glob.**

Sistemul este prezentat printr-un antigen - P. Ac anti-P sunt activi la +37°C și pot induce RPT. Anticorpul anti-P nu provoacă boala hemolitică a nou-născutului, dar pot fi cauza avorturilor spontane în primul trimestru de sarcină.

### **Sistemul de antigene eritrocitare GIL.**

Acest sistem include un antigen GIL. Importanța clinică a anticorpilor anti-GIL nu este cunoscută.



### SISTEMUL ANTIGENIC LEUCOTISULAR HLA

Acest sistem antigenic încadrează un set complex de gene și produse alelice moleculare cu importanță majoră în reglarea imunității, la transfuziile de sânge și în transplantul de organe. Bazele acestui sistem au fost puse în 1954 de Dausset, care a reușit să evidențieze la bolnavii politransfuzionați anticorpi leucoaglutinanți care corespundeau unui răspuns imun dirijat împotriva antigenelor purtate de leucocitele sângelui transfuzionat. Ulterior s-a constatat implicarea acestor Ac pe fondal de graviditate, în transplantul de organe.

În 1967 a fost standardizat nomenclatorul antigenic al sistemului HLA, care ulterior, pe măsura descrierii unor noi Ag a fost completat cu specificități noi (tab. 48).

Ag sistemului HLA sunt codificate de genele complexului major de histocompatibilitate (MHC) al cromozomului 6. Aceste gene sunt responsabile de recunoașterea celulelor proprii și non-proprui, de răspunsul imun la stimulul antigenic și de reglarea imunității celulare și umorale.

Produsele proteice ale genelor *HLA* reprezintă niște molecule glicoproteice amplasate pe suprafața membranei celulare. Clasa antigenică I a HLA include Ag A, B, C, determinate de genele respective *HLA-A*, *HLA-B* și *HLA-C*. Concomitent există și alți loci genici specificați ca *HLA-E*, *-F*, *-G*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L*, produsele proteice ale cărora fie că nu sunt funcționale, fie că sunt absente. Genele neexpresiate cu proteine se numesc pseudogene și, probabil, prezintă un impas evolutiv. Analiza regiunii ADN, unde este localizată gena *HLA-C*, a demonstrat, că acest locus, posibil, s-a format grație dublării regiunii *HLA-B*.

## Specificitatea antigenice ale sistemului HLA

A	B		C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B5102	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B5103	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B52(5)	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B53	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B54(22)	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B55(22)	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B56(22)	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B18	B57(17)		Dw11(17)	DR10		
A2403	B21	B58(17)		Dw12	DR11(5)		
A25(10)	B22	B59		Dw13	DR12(5)		
A26(10)	B27	B60(40)		Dw14	DR13(6)		
A28	B35	B61(40)		Dw15	DR14(6)		
A29(19)	B37	B62(15)		Dw16	DR1403		
A30(19)	B38(16)	B63(15)		Dw17(w7)	DR1404		
A31(19)	B39(19)	B64(14)		Dw18(w6)	DR15(2)		
A32(19)	B3901	B65(14)		Dw19(w6)	DR16(2)		
A33(19)	B3902	B67		Dw20	DR17(3)		
A34(10)	B40	B70		Dw21	DR18(3)		
A36	B4005	B71(70)		Dw22			
A43	B41	B72(70)		Dw23	DR51		
A66(10)	B42	B73		Dw24			
A68(28)	B44(12)	B75(15)		Dw25	DR52		
A69(28)	B45(12)	B76(15)		Dw26			
A74(19)	B46	B77(15)					
	B47	B7801			DR53		
	B48						

**Bw4:** B5, B5102, B5103, B13, B17, B27, B37, B38(16), B44(12), B47, B49(21), B51(5), B52(5), B53, B57(17), B58(17), B59, B63(15), B77(15), A9, A23(9), A24(9), A2403, A25(10), A32(19).

**Bw6:** B7, B703, B8, B14, B18, B22, B35, B39(16), B3901, B3902, B40, B4005, B41, B42, B45(12), B46, B48, B50(21), B54(22), B55(22), B56(22), B60(40), B61(40), B62(15), B64(14), B65(14), B67, B70, B71(70), B72(70), B73, B75(15), B76(15), B7801.

Clasterul genic *HLA-DR*, *-DQ* și *DP*, responsabil de formarea Ag respective, aparțin clasei II HLA. Proteinele acestei clase se compun din 2 lanțuri diferite –  $\alpha$  și  $\beta$ , codificate de 15 loci. Organizarea genetică a regiunii clasei II HLA-D este mult mai complexă. Clasterul HLA-DR include 10 gene, 9 dintre care determină lanțul  $\beta$  și 1 - pe cel  $\alpha$ . Dintre cele 9 gene 5 sunt pseudogene (de exemplu  $\beta_2$ ). Proteinele codificate de genele *A* și *B1* formează un șir de antigene de la HLA-DR1 până la HLA-DR18. Gena *A* și *B3* se expresiază cu formarea HLA-DR52, iar *A* și *B4* rezultă cu formarea de HLA-DR51. Ag HLA DQ1 – DQ9 se regăsesc pe glicoproteinele codificate de genele *DQ*, *A1* și *B1* în clasterul genei *DQ*. Majoritatea altor gene ale acestui claster posibil, sunt pseudogene. Pentru clasterul HLA-DP este caracteristică organizarea identică.

Între genele claselor I și II se distinge un grup de gene care codifică moleculele clasei III, la care se referă proteinele sistemului complementului C2, Bf, C4A, C4B, fermentul hidrooxilaza 21 și citokina TNF. Genele care codifică proteinele complementului, de regulă, sunt moștenite printr-un bloc, denumit complotip. La oameni sunt cunoscute 10 complotipuri moștenite. Două gene ale clasei III, C4A și C4B, sunt responsabile de formarea moleculei C4. Aceste variante proteice se diferă după structură și funcție. Molecula C4A poartă Ag Rodgers, iar C4B – Ag Chido, fiecare din aceștia, fiind adsorbiți de eritrocitele persoanelor purtătoare ale acestei gene.

Moleculele clasei I sunt situate pe suprafața celulelor nucleare (limfocite, granulocite, monocite, celule tisulare), a trombocitelor și în număr minor - pe suprafața eritrocitelor mature.

Ag HLA sunt specificate cu cifre care urmează după litera ce indică seria HLA (de exemplu, HLA-A1, HLA-B8). Dacă Ag este incomplet studiat, se adaugă prefixul „w” (exemplu, HLA-Dw7), iar pe măsura identificării Ag el se exclude. Acest prefix este păstrat și pentru Ag locusului C pentru excluderea erorilor legate de simbolizarea complementului, diferențierea AgBw4 și Bw6 de alte produse ale alelelor în cultura de limfocite mixte.

Numărul specificităților antigenice HLA-A și HLA-B sunt amplasate nu în ordinea respectivă, deoarece aceste semnalmente au fost specificate, când încă nu era cunoscut faptul, că produsele presupuse ale unei gene pot fi codificate real de 2 loci genici.

Moleculele clasei II sunt prezente permanent pe limfocitele B, pe celulele monocitar/macrofagale, iar la stimulul respectiv - și pe limfocitele

T, pe alte celule. În literatura de specialitate descrierea acestor Ag poate fi întâlnită prin utilizarea sub alte denumiri: antigene ale complexului major de histocompatibilitate, antigene de transplant, antigene tisulare.

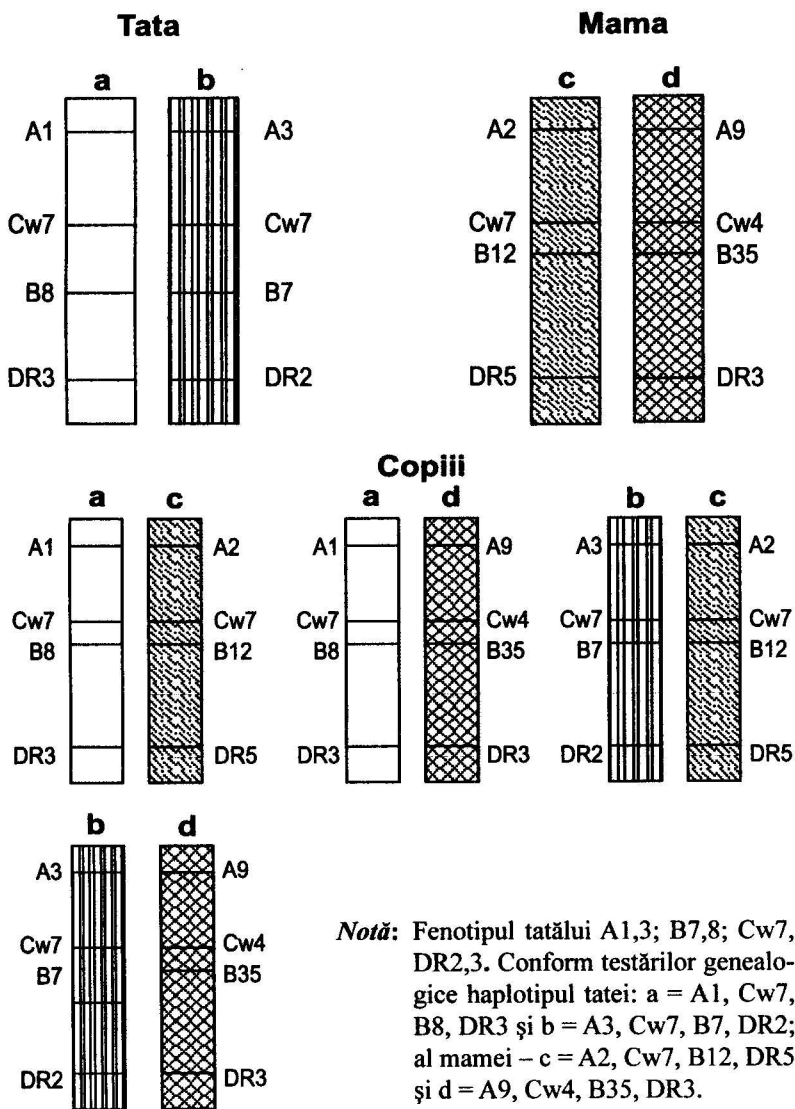
Sistemul antigenic HLA este de un mare polimorfism, iar diversitatea extremă a moleculelor HLA este asigurată de multitudinea alelelor caracteristică unora din genele sistemului HLA. S-a estimat în acest sens, că din combinarea diferitor alele ale genelor HLA poate rezulta o cifră de peste  $100 \times 10^6$  diverse fenotipuri, haplotipurile fiecărui individ fiind practic unice.

Moleculele purtătoare de Ag HLA dețin un rol decisiv în prezentarea antigenelor. Recunoașterea imunologică a diferențelor structurale ale Ag HLA este probabil etapa primară în rejectarea țesutului transplantat. După influența ce o dețin asupra viabilității și persistenței transplantelor solide de organ Ag HLA cedează ca forță doar Ag sistemului AB0, iar la transplantul măduvei osoase dețin poziția prioritară. Ag HLA și anticorpii respectivi au implicații majore în complicațiile posttransfuzionale, în rezistența imunodependentă a trombocitelor, în reacția transfuzională nonhemolitică febrilă, în afecțiunea pulmonară acută dependentă de transfuzii și în boala posttransfuzională „transplant anti-gazdă”.

Tipizarea Ag HLA se efectuează și în cadrul studiilor asupra receptivității organismului la diverse maladii, pentru descifrarea rudeniei și în practica medicinei legale. Analiza regiunii HLA la nivel molecular a majorat importanța Ag de acest sistem la selectarea donatorului pentru transplantul de măduvă osoasă, în diagnosticul diferențial și în cadrul screening-ului dirijat.

Fiecare om posedă 2 copii ale cromozomului 6 și, respectiv, 2 haplotipuri HLA, câte unul de la fiecare din părinți. Perechea de haplotipuri ale unui om se numește genotip. Produsele genetice, exprimate formează fenotipul individului. Grație faptului că genele HLA sunt autozomi și alelele lor interacționează după tipul codominant, diferite fenotipuri prezintă astfel expresia comună a ambelor haplotipuri. Pe fig. 10 este redat schematic scenariul de moștenire a haplotipurilor.

Figura 10. Exemplu de moștenire a haplotipurilor



Copilul acestui cuplu poate avea una din combinațiile posibile ale haplotipului, cu condiția că *crossing-over*-ul nu se realizează.

Fiecare copil moștenește câte un cromozom și, respectiv, câte un haplotip de la fiecare din părinți. Deoarece la fiecare din părinți cromozomul 6 este prezent în 2 variante, copilul poate avea 1 din cele 4 combinații ale haplotipurilor (fără a lua în considerație recombinarea). Acest caracter de moștenire este important în selectarea donatorului posibil pentru prelevarea organelor și țesuturilor de trasplantat printre membrii familiei. Doi sibiși pot avea seturi antigenice HLA identice, dar probabilitatea ca asta să se realizeze real nu va atinge niciodată 100%.

Cu toate că pentru fiecare cromozom sunt expresiate produsele antigenice ale genelor respective, pentru fiecare locus rezultatele pozitive pot fi numai pentru un Ag, cel absent fiind notat ca „blank”. O astfel de situație apare când individul respectiv este homozigot după alela care determină absența acestui Ag, în caz de expresiere a Ag, pentru care lipsește antiserul respectiv, în caz de rezultat falsnegativ (eroare tehnică) sau în rare cazuri - la prezența genei 0. Indicarea fenotipului „blank” se specifică deseori prin „x”, „y” sau „-” (de exemplu, A1, x : B7,40 sau A1, -: B7,40).

Pe zona HLA se poate observa uneori fenomenul de *crossing-over*, când cromozomii în timpul meiozei sau gametogenezei fac schimb de fragmente, ce conțin material genetic legat. Astfel de fragmente recombinante se transmit destul de frecvent copilului în calitate de noi haplotipuri. Frecvența *crossing-over*-ului este dependentă direct de distanța dintre gene. De exemplu, locusurile HLA-A, -B, -DR sunt amplasate una lângă alta și frecvența *crossing-over*-ului este de 0,8% pe fragmentul A-B și de 0,5% - pe fragmentul B-DR. În cercetările genealogice și testele pentru stabilirea rudeniei este necesar să se ia în calcul și recombinările posibile. Unele combinații alelice pot fi înregistrate cu o frecvență majoră, inclusiv la indivizii diferitor rase.

Antigenele HLA de clasa I (HLA-A, -B, -C) au MM de cca 56 kD și sunt prezentate de 2 lanțuri: lanțul glicoproteic greu  $\alpha$  și lanțul ușor, reprezentat de microglobulina  $\beta_2$ , codificată de una din genele cromozomului 15. Lanțul  $\alpha$  traversează membrana celulară, pe când microglobulina  $\beta_2$  nu este legată de membrană, dar formează legături necovalente cu lanțul  $\alpha$ . Partea extracelulară a lanțului  $\alpha$  constă din 3 domenii, 2 dintre care sunt amplasate distal și constituie fragmentele variabile, iar structura lor este determinată de diferite alele ale clasei I. Moleculele clasei I sunt amplasate practic pe toate celulele eucariote și pot fi depistate pe trombocite și doar

o cantitate minoră rămân pe suprafața eritrocitelor mature, unele alotipe fiind mai exprimate.

Variantele moleculare ale Ag de clasa I au fost identificate ca aloantigene eritrocitare și denumite Bennett-Goodspeed (Bg). Ag denumite inițial Bg<sup>a</sup>, Bg<sup>b</sup>, Bg<sup>c</sup> actualmente sunt specificate sub denumirea de HLA-B7, -B17 și -B28. Pe trombocite sunt exprimate, în special Ag A și B, sunt slab prezentate antigenele C, iar cele ale clasei II sunt absente.

Ag clasei II HLA-DR, -DQ și -DP au masa moleculară (MM) de cca 63 kD și prezintă 2 lanțuri glicoproteice diverse -  $\alpha$  și  $\beta$ , fiecare din acestea traversând membrana celulară. Două domenii ale ambelor lanțuri sunt amplasate extracelular și conțin fragmente variabile. Moleculele HLA de clasa II se situează pe limfocitele B, T-activate, pe monocite, macrofage, pe celulele dendritice, hemopoietice, endoteliale și pe unele celule tumorale.

Domeniile terminale care conțin fragmentele variabile și epitopii antigenici ale acestor molecule formează fragmentul de legare a peptidelor. Moleculele determinate de diverse gene *HLA* posedă secvențe aminoacide unice și, respectiv, formează fragmente de legare a peptidelor, care reacționează cu peptidele diferitor clase. Aceste fragmente sunt necesare pentru activitatea funcțională a moleculelor HLA. Diversitatea majoră a acestor molecule este asigurată de existența multiplelor alele caracteristice pentru unele gene ale sistemului dat. S-a calculat, de exemplu, că diferite combinații de alele ale genelor *HLA* ar asigura existența a  $100 \times 10^6$  fenotipuri, haplotipurile fiecărui individ, fiind unice.

Unii epitopi s-au dovedit a fi comuni pentru câteva Ag. Anticorpții anti-epitopii dați sunt capabili să interacționeze cu grupa de Ag respectivă, manifestând reacții încrucișate la testarea serologică. Identificarea lor este posibilă prin utilizarea antiserului de specificitate restrânsă.

Ulterior unele din aceste Ag s-au dovedit a fi complexe. De exemplu, Ag B12 s-a delimitat în HLA-B44 și HLA-B45, fiecare reacționând cu serul anti-HLA-B12. Pentru specificarea Ag individuale, care fuseseră primar depistate în componența altor grupuri, deseori se practică indicarea numerică a Ag parentală în paranteze, de exemplu HLA-B44 (12).

Ag comune „public” prezintă niște fragmente cu variabilități minore ale moleculei HLA. În seria Ag HLA-B sunt 2 Ag „public” bine studiate: HLA-Bw4 și HLA-Bw6. HLA-Bw4 este prezent de asemenea și pe unele molecule determinate de locusul A. Fiecare moleculă de clasa I posedă în

paralel cu specificitățile caracteristice și unul din cele 2 Ag „public”. De exemplu, celulele purtătoare ale Ag HLA-B44 manifestă reacții pozitive și cu HLA-Bw4. Aceste Ag sunt de valoare clinică, deoarece pacienții care contactează cu Ag HLA non-proprii pe fond de sarcină, în caz de transfuzii sau transplantări, pot secreta Ac față de Ag respective. Ac anti-Ag „public” pot interacționa identic cu multipli aloanticorpi.

### ***Funcția biologică a antigenelor HLA.***

Molecula HLA se intrică cu rol decisiv în fenomenele intra- și intercelulare, care se regăsesc la originea răspunsului imun. În procesul de sinteză și transport pe suprafața celulelor antigen-prezentatoare a moleculelor HLA se realizează calea care conduce la interacțiunea lor cu peptidele. Proteinele extracelulare sunt scindate în peptide nu prea mari, care urmează a fi transportate pe suprafața celulei de molecule HLA de clasa II. Peptidele de geneză intracelulară se localizează pe moleculele clasei I. Fiind amplasate pe suprafața celulei, moleculele HLA influențează interacțiunea intercelulară atât la etapa aferentă, cât și la cea eferentă a răspunsului imun.

Moleculele clasei II au un rol important în recunoașterea Ag non-proprii. Proteinele străine sunt fagocitate de celulele antigenprezentatoare și scindate în fragmente peptidice nu prea mari. Ulterior aceste fragmente prin intermediul sistemului endozomal sunt amplasate pe suprafața internă a fragmentului de legare peptidică, format din domeniile exterioare ale lanțurilor  $\alpha$  și  $\beta$  ale moleculelor HLA de clasa II. Când astfel de molecule de clasa II sunt transportate pe suprafața celulei, aceasta poartă peptida non-proprie în configurația recunoscută de alte celule ale organismului. Dacă limfocitul CD4 pozitiv poartă un receptor corespunzător fragmentului peptidic dat, atunci între Ag și celula T care l-a recunoscut se stabilesc legături strânse și specifice grație configurației Ag și prezenței moleculei de clasa II.

Moleculele de clasa I sunt antrenate în derularea etapei imune aferente, când se realizează distrucția celulelor purtătoare de Ag non-proprii. Pe fondul infecțiilor virale peptidele non-proprii ale virionului, care se situează intracelular, se amplasează pe fragmentul de legare a peptidelor moleculelor HLA de clasa I și în componența acestuia sunt transportate pe membrana celulară pentru prezentare. Celulele CD8 pozitive, receptorii



antigenici care corespund fragmentelor peptidice virale și sunt capabile să le recunoască în contextul moleculei de clasa I, se leagă specific cu celulă infectată. Legarea lor activează proprietățile citotoxice ale limfocitelor T, care în cazul dat atacă celula infectată și o distruge cu dezvoltarea ulterioară a reacțiilor inflamatorii. Limfocitele T interacționează cu Ag numai în cazul când Ag prezentat corespunde receptorului celulei T și este prezentat în contextul fragmentului de legare a peptidei moleculei HLA corespunzătoare. O asemenea restrângere este numită „MHC - activitate restrictivă” sau „MHC - restricție”.

Aloimunizarea cu Ag HLA se poate dezvolta pe fond de sarcină, la transfuzii sanguine sau în transplantul de organe, deoarece Ag MHC ale donatorului prezintă în cazul dat Ag non-propriei. Conform unor date, etapa aferentă a imunității (recunoașterea țesutului străin de către organismul recipientului) depinde de contactul cu celulele donatorului care poartă semnalmente costimulatoare. Cu toate acestea, etapa eferentă (răspunsul imun al pacientului la Ag donatorului) deseori este dirijată contra Ag de clasa I ale donatorului. De exemplu, sinteza de Ac anti-HLA anti-Ag de clasa I, dezvoltată pe fondul transfuziilor trombocitare care expresează doar moleculele clasei I. Prezența în componentul transfuzat a leucocitelor purtătoare de Ag de clasa I și II este urmată de fenomenul de aloimunizare. Posibilitatea imunizării poate fi minorizată prin utilizarea componentilor sanguini ce conțin mai puține leucocite sau prin prelucrarea masei cu raze ultraviolete care dereglează structura moleculelor costimulatoare și supresează activitatea celulelor antigen-prezentatoare.

### **Testarea antigenelor HLA.**

Metodele de apreciere a Ag HLA se împart în 3 grupe: *serologice, citologice și analiza ADN*. Metoda standard pentru identificarea Ag HLA-A, -B, -C, -DR și -DQ este testul microlimfocitotoxic. Pentru testare sunt utilizate limfocite cu expresia variabilă a Ag, care pot fi relativ ușor obținute din sângele periferic prelucrat cu un anticoagulant (heparină) și, spre deosebire de granulocite, acestea asigură o bună reproductivitate. Cu același scop pot fi utilizate limfocitele splinei și ale ganglionilor limfatici. Serurile pentru tipizarea HLA sunt obținute de regulă de la femeile cu nașteri multiple, care în perioada gravidității au contactat cu celulele fetale purtătoare ale determinantelor HLA paterne. Pot fi utilizate și antiserurile monoclonale murine.

Serurile anti-HLA cu specificitatea cunoscută se introduc în godeurile microplanelor și în fiecare godeu se adaugă suspensia limfocitară ( $1-2 \times 10^6$  celule/ml). Dacă limfocitele conțin Ag corespunzător, Ac prezenți în ser se leagă cu Ag respectivi. Ulterior se adaugă complementul și la prezența unei cantități suficiente de Ac fixați pe membrana limfocitului, este activat sistemul complementului cu formarea complexului membrano-atacant, care conduce la limfocitotoxicitate. Aprecierea destrucției membranei celulare se face prin suplimentarea unui colorant (eozin, tripan blau), care nu pătrunde în celula intactă (ce nu a fixat Ac și componenții complementului), ci numai în cea alterată. Pot fi utilizați și coloranți fluorescenți, fapt confirmat la microscopie.

Deoarece HLA-DR și HLA-DQ sunt expresiate pe celulele B și nu sunt prezente pe limfocitele T-neactivate, testarea acestor Ag necesită prelucrarea prealabilă a suspensiei limfocitare pentru a majora astfel numărul de limfocite B. Celulele B pot fi recoltate din populația mixtă, prin fracționare cu utilizarea unui tifon de nailon care adăunează celulele B, sau folosind mărele de magnet conjugate cu Ac anti-limfocitele B. Concomitent se vor monta și testele martor care să estimeze calitatea testului. Concluzia despre identificarea unui Ag concret se emite numai în baza rezultatelor de cercetare cu câteva antiseruri, deoarece nu toate serurile posedă calități monospecifice stabile suficiente pentru a fi utilizate separat. Diversitatea imensă a sistemului HLA, repartiția neuniformă a Ag printre diferite grupe de rasă, nesiguranța antiserului biologic și a celulelor vii testate, precum și dificultățile dependente de prezența Ag split, cu reactivitate încrucișată (GREGs), a Ag „public” creează greutăți în tipizarea corectă a Ag HLA.

Tehnica de lucru pentru montarea testului microlimfocitotoxic se expune detaliat în „Tehnici imunologice” (Chișinău, 1994).

Proba microlimfocitotoxică poate fi utilizată pentru testarea mostrelor serice cu celulele – țintă. Acest test de rutină presupune testarea serului recipientului presupus cu limfocitele donatorului posibil, iar pentru majorarea sensibilității se utilizează una din variantele probei microlimfocitotoxice cu folosirea reagentului antiglobulinic. Astfel de reagenți care recunosc lanțurile  $\kappa$  sau  $\lambda$  ale Ac anti-HLA, pot determina transformarea unor reacții necitotoxice în citotoxice. Se impun deci măsurile de precauțiune pentru a se evita rezultatele falspozitive. Testul antiglobulinic se utilizează

cu succes în metoda „cross-mutch” în transplantul de organe. Suplimentar la aceasta se poate utiliza flaucitometria.

Intensitatea imunizării cu Ag HLA poate fi apreciată prin testarea serului pacientului cu un panel din 30-60 și mai multe celule-țintă. Procentul de celule ale panelului la interacțiunea cu care recipientul a format Ac citotoxici se numește nivelul PAR (panelul anticorpilor reactanți). Aprecierea PAR (nivelul aloimunizării) furnizează informații utile la studierea reacției posttransfuzionale nonhemolitice febrile, a refractarității trombocitelor și la pregătirea pacienților care sunt în așteptarea organului de transplant prelevat de la cadavru.

Un astfel de screening al Ac anti-HLA apreciază nu numai prezența, dar și specificitatea acestora.

### **Metodele citologice**

*Metoda cultivării mixte de limfocite* utilizată pentru selecția donatorilor vii de măduvă osoasă și rinichi este utilă în aprecierea deferenților de structură a sistemului HLA, care este imposibilă prin testele serologice. Ea relevă, în special, diferențele genetice ale locusurilor de clasa II care codifică Ag HLA-DP, - DQ și -DR. Alelele HLA-DR, după cum se presupune, joacă un rol esențial la aprecierea reactivității culturii limfocitare mixte. În ultima situație limfocitele diferitor indivizi sunt cultivate împreună și au posibilitatea de recunoaștere a Ag străin HLA-D și de a răspunde la el printr-o reacție de proliferare. La finisarea cultivării (5 – 7 zile) după includerea în celule a timidinei radioactive se apreciază nivelul de sinteză a ADN. Cu cât proliferarea este mai intensivă, cu atât mai activ celulele vor îngloba timidina.

Cu ajutorul acestui test au fost acumulate date noi despre diferențele ce disting regiunea HLA-D, dar interpretarea acestora rămâne un moment dificil. Celulele pot recepționa și reacționa slab la stimuli: astfel celulele pacienților cu leucemie sunt capabile să prolifereze spontan, iar la cei cu dereglări imune acestea nu reacționează la stimulente. Montarea inexactă a metodei de asemenea influențează rezultatele reacției. Pentru operarea transplantului de măduvă osoasă alogenă se impune aprecierea compatibilității după Ag MHC de clasa II, iar estimarea gradului de compatibilitate după aceste Ag uneori necesită utilizarea altor metode, cum ar fi cercetarea ADN genelor de clasa II.

**Metoda bazată pe analiza ADN** are unele priorități față de testele serologice și citologice: este de sensibilitate și specificitate majoră, necesită un volum minor al probei, cercetarea se realizează rapid (până la câteva ore), nu se impune utilizarea celulelor vii și nici prezența Ag pe suprafața celulelor.

Dacă metoda serologică poate identifica numai 15 Ag HLA-DR, atunci metoda analizei ADN permite testarea a peste 100 alele DRB1.

### **Testarea în baza PCR**

Metoda dată a majorat potențialul de tipizare a HLA, iar cu ajutorul PCR se poate obține un număr major de copii ale unui anumit fragment al ADN. Există mai multe variante ale testului, dar 2 din ele sunt mai uzuale.

**Sondele oligonucleotidice.** Prima metodă este bazată pe utilizarea sondelor oligonucleotide site-specifice. Utilizarea acestei metode presupune obținerea produselor PCR, care ulterior sunt transferate pe membrană și sunt incubate cu sondele oligonucleotide site-specifice marcate. Astfel, fragmentele nu prea mari ale ADN hibridizează cu secvențele complementare și permit identificarea alelelor concrete sau ale unui grup de alele. Metoda permite tipizarea locusurilor clasei II ce sunt de informativitate înaltă specifică. Uneori rezultatele obținute prezintă dificultăți de interpretare, un alt inconvenient al metodei este necesitatea utilizării mai multor filtre și realizarea unor hibridizări multiple.

### **Tehnica ce utilizează primeri cu secvențe specifice**

Metoda folosește primeri cu secvențe specifice (PSS), complementare anumitor secvențe de ADN. Această tehnică, denumită proba de amplificare alelospecifică sau PCR – PSS este de specificitate înaltă la amplificarea în PCR, dar nu în timpul hibridizării. Considerând secvențele complementare PSS după prezența ADN amplificat, putem concluziona despre prezența alelei respective.

Primerii secvențiali specifici și sondele oligonucleotide pot fi utilizate concomitent pentru obținerea informației corecte despre alele.

### **Importanța clinică a sistemului HLA**

Ag sistemului HLA și Ac anti aceste Ag sunt de mare valoare în multe situații la transfuzii (aloimunizarea și refractaritatea trombocitelor, reacția

transfuzională nonhemolitică febrilă, în afectarea acută a pulmonilor dependentă de transfuzii, în maladia de postgrefare). Ag HLA sunt de imunogenitate înaltă. În sarcină sau la transfuzii de sânge recipienții cu o mai mare probabilitate vor sintetiza Ac anti-HLA comparativ cu alte diverse Ag.

### **Refractaritatea trombocitelor**

Frecvența aloimunizării și refractaritatea trombocitelor la pacienții care au suportat transfuzii repetate de componente celulare constituie 30-60%. Stare de refractaritate se consideră absența majorării numărului de trombocite la recipienții care au primit trombocite corect păstrate. Rezistența trombocitelor este determinată de prezența septicemiei, de temperatura înaltă, de coagularea intravasculară diseminată, de consumul unor medicamente, de hipersplenism, destrucția complement dependentă sau de combinațiile acestor stări, de asemenea și de reacțiile imune.

Refractaritatea imunodependentă a trombocitelor este mai frecvent indusă de formarea Ac anti-Ag HLA, dar poate fi provocată și de Ac anti-Ag specifice trombocitelor. De obicei, aloimunizarea HLA este indusă de Ag clasei I, dar poate apărea și la leucocitele sângelui transfuzionat.

Numărul de leucocite pentru aloimunizarea anti-HLA nu este stabilit și, posibil, diferă la diferiți recipienți. După unele date această cantitate ar fi aproximativ de  $5 \times 10^6$ , dar la persoanele sensibilizate anterior prin sarcină sau transfuzii contactul chiar și cu o cantitate mai mică de celule alogene poate induce reacția anamnestică a anticorpogenezii.

Ac anti-HLA secretați ca răspuns la transfuzii pot avea specificitate atât față de Ag celulelor donatorului, cât și față de aloantigenele „public”. Specificarea lor exactă este dificilă. Integral, testarea intensității aloimunizării este posibilă prin aprecierea Ac în serul pacientului. Pacienții cu trombocite refractare și cu nivele înalte de Ac sunt aloimunizați la un spectru major de Ag și transfuzia de trombocite în cazul lor poate fi ineficientă. Trombocitele HLA identice obținute prin metoda trombocitoforezei pot fi utile în unele cazuri. Date fiind dificultățile de selectare a donatorului compatibil cu recipientul după cele 4 Ag, pentru obținerea trombocitelor HLA identice se utilizează diferite metode. Mai frecvent sunt utilizate trombocitele donatorilor parțial compatibili, apreciate în testul serologic prin reacție încrucișată, chiar dacă la acești recipienți răspunsul *in vivo* poate fi neadecvat.

Un alt principiu folosit la selectarea donatorului urmărește corespunderea Ag „public”. Compatibilitatea concomitentă după Ag HLA și cei trombocitari poate majora eficacitatea transfuziilor practicate la pacienții refractari. Selectarea numărului suficient de donatori testați după HLA este dificilă. S-a constatat astfel, că este nevoie de minimum 1000 donatori pentru a efectua transfuzii rezultative la pacienții aloimunizați cu Ag HLA. Tipizarea Ag HLA de clasa I la pacienții refractari și pasibili de aloimunizare trebuie efectuată la stadiile precoce ale maladei, când în sângele periferic circulă suficiente cantități de limfocite pentru tipizarea corectă a HLA. Chimioterapia intensivă face imposibilă obținerea unei cantități suficiente de celule pentru tipizarea HLA. La pacienții aloimunizați cu Ag HLA se constată frecvent răspunsul la trombocitele compatibile după testul de reactivitate încrucișată.

Metoda „cross-mutch” face posibilă aprecierea statutului de compatibilitate a donatorului atât pentru Ag HLA, cât și pentru cei trombocitari.

**Reacția transfuzională nonhemolitică febrilă (RTNF).** Ag HLA, ca și cei granulocitari și trombocitari, se implică în patogenia RTNF. Ac recipientului, reacționând cu Ag inoculate, eliberează citochine (de exemplu, IL-1) capabile să inducă reacție febrilă. În cazul efectuării cercetărilor serologice poate deveni necesară utilizarea mai multor metode și celele-țintă de la un număr major de donatori diferiți.

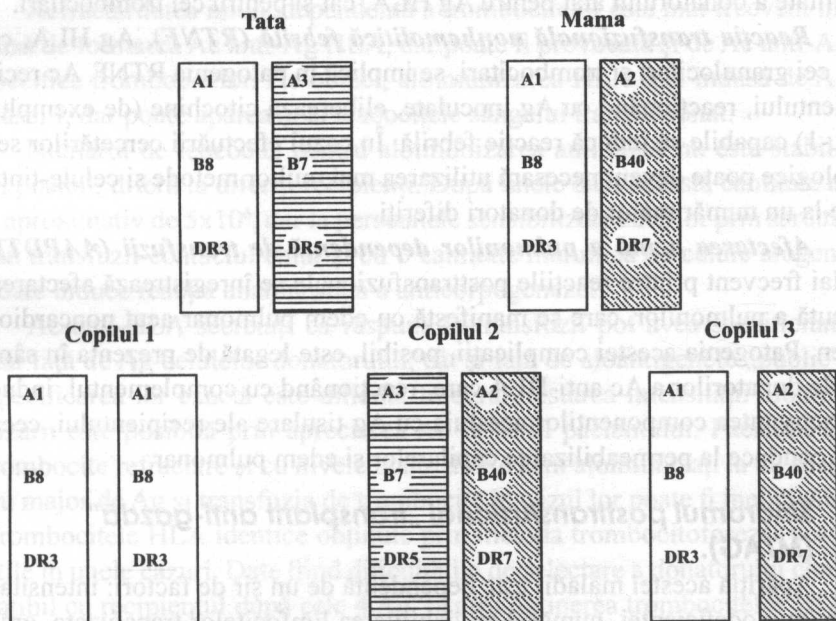
**Afectarea acută a pulmonilor dependentă de transfuzii (AAPDT).** Mai frecvent printre reacțiile posttransfuzionale se înregistrează afectarea acută a pulmonilor, care se manifestă cu edem pulmonar acut noncardiogen. Patogenia acestei complicații, posibil, este legată de prezența în sângele donatorilor a Ac anti-HLA care, reacționând cu complementul, induc reactivitatea componentelor acestuia cu Ag tisulare ale recipientului, ceea ce conduce la permeabilizarea capilarelor și edem pulmonar.

### **Sindromul posttransfuzional „transplant anti-gazdă” (MTAG).**

Apariția acestei maladii este dependentă de un șir de factori: intensitatea imunodeficienței, numărul și viabilitatea limfocitelor transfuzate, gradul de compatibilitate dintre donator și recipient după Ag HLA. Transfuziile componentelor sanguini de la rude pacienților cu MTAG a demonstrat importanța majoră a Ag HLA la această maladie.

Pe figura 11 sunt redată condițiile în care posibilitatea apariției maladiei devine majoră. Unul din haplotipurile parentale este comun, astfel că fiecare al 4-lea copil al respectivului cuplu va moșteni unul și același haplotip de la ambii părinți. În cazul prezentat copilul 1 va fi homozigot după haplotipul HLA comun ambilor părinți. Transfuzia de sânge prelevat de la un asemenea individ unui recipient fără rudenie cu acesta nu ar avea consecințe. Dar dacă sângele copilului 1 este transfuzat rudelor lui heterozigote după acest haplotip (ambii părinți și copilul 3), atunci Ag limfocitelor inoculate nu sunt recunoscute ca străine și celulele nu sunt eliminate. Celulele donatorului recunosc, însă, Ag HLA non-proprie ale recipientului, care sunt activate, proliferază și în final atacă celulele gazdei.

**Figura 11. Haplotipurile HLA în cadrul familiei cu risc de MTAG asociat cu transfuzii**



Pentru evitarea acestei situații se recomandă ca toți componenții celulari obținuți de la rude până la transfuzie să fie iradiați. Alte mostre sangui-

ne ale donatorilor special selectate cum ar fi trombocitele HLA identice de asemenea pot spori riscul apariției MTAG.

### **Reacțiile transfuzionale hemolitice**

Incompatibilitatea după HLA tot poate deveni cauza micșorării viabilității eritrocitelor la pacienții cu Ac față de asemenea Ag ca Bg<sup>a</sup> (B7), Bg<sup>b</sup> (B17) și Bg<sup>c</sup> (A28), care sunt expresiate neesențial pe eritrocite. O astfel de incompatibilitate uneori nu este observată la tipizarea obișnuită.

### **Testarea HLA și transplantarea**

Testarea HLA are o importanță majoră în transplantul de organ. Diferite tipuri de transplant necesită investigații diverse pentru studiul compatibilității.

### **Transplantul medular**

Este cunoscut faptul că diferențele pentru sistemul HLA prezintă o barieră severă pentru transplantul cu succes al măduvei osoase. Identitatea și compatibilitatea după Ag HLA între donator și recipient sunt necesare pentru grefarea cu succes a transplantatului și prevenirea MTAG, dar regrefarea și/sau MTAG rămân în continuare fenomene tipice pentru recipientul de substanță medulară, indiferent de intensitatea și calitatea terapiei imunosupresive.

Variantele de donator și recipient sunt testate la Ag HLA-A, -B, -C, -DR și -DQ cu scopul de a obține compatibilitate după 5 Ag. Tipizarea ADN se efectuează pe mostrele donatorului și ale recipientului pentru aprecierea compatibilității optime a regiunilor clasei II. Cu toate că sibișii identici sunt cei mai buni donatori pentru transplantul medular, mai frecvent se apelează la donatorii neînrușiți, identificați în cadrul programelor naționale ale donatorilor de măduvă osoasă.

### **Transplantul renal**

Compatibilitatea după Ag sistemului AB0 este cel mai important factor ce asigură viabilitatea transplantului renal. O excepție remarcabilă face rinichiul donatorilor A<sub>2</sub>, care funcționează la recipienti la fel de bine ca și cel al donatorilor renali 0, dat fiind faptul că Ag ABH sunt exprimați divers pe toate celulele organismului. Deosebit de importantă este expresia Ag ABH



pe celulele endoteliale, deoarece sistemul vascular al transplantului deseori regrefează mai activ.

Atât donatorul, cât și recipientul sunt testați la Ag AB0, HLA-A, -B și -DR. De regulă, se testează și Ag HLA-C și -DQ. Până la intervenția chirurgicală se procedează testarea încrucișată serologică (cross-mutch) a recipientului cu limfocitele donatorului. Pentru „cross-mutch” este necesar să se utilizeze metode mai sensibile cu majorarea perioadei de incubație etc. Deoarece sinteza de Ac anti-HLA este un fenomen dinamic, serul pentru testare se poate obține în 45 min până la operație și apoi congelat până la testare.

Transplantul renal este contraindicat la incompatibilitatea în „cross-mutch” a limfocitelor T și B, iar serul pacienților care așteaptă transplantul renal de la cadavru se va testa lunar pentru a estima intensitatea aloimunității prin aprecierea Ac.

În transplantul de rinichi prelevat de la rude vii se utilizează alte principii. Dacă sunt posibili câțiva donatorii vii, se efectuează cultura mixtă a limfocitelor recipientului și donatorului. Transplantul renal în condiția când perechea donator-recipient denotă o reactivitate joasă în acest test va rămâne viabil mai mult timp decât la cei cu reactivitate majoră. Compatibilitatea după Ag HLA asigură persistența mai durabilă a transplantului.

### ***Transplantarea altor organe solide***

În caz de transplantare a ficatului, gastrului, pulmonului sau cordului la selectarea donatorului imunologic se testează compatibilitatea donatorului și recipientului după sistemul AB0, HLA-A, -B și -DR, se practică și testarea încrucișată a limfocitelor. Dar restricțiile de timp deseori nu permit efectuarea „cross-mutch” și tipizarea HLA până la intervenția chirurgicală. Nivelul de compatibilitate se corelează cert cu viabilitatea transplantului după operație.

### ***Stabilirea rudeniei***

Testarea sistemului HLA este utilă și în aprecierea rudeniei grație polimorfismului Ag HLA, dezvoltării lor suficiente imediat după naștere, frecvenței minore a haplotipurilor în diverse populații. Testarea Ag HLA permite stabilirea corectă a paternității în 93% de cazuri, cercetarea eritrocitelor va crește acest indice până la 95%, iar aprecierea enzimelor eritrocitare și a proteinelor serice va ridica probabilitatea testului la peste 99%. În

acest caz se apreciază frecvența haplotipurilor în locul genelor. Important este să se considere diferențele de rasă caracteristice (frecvența majoră a haplotipurilor HLA) și fenomenul de recombinare. Mai frecvent la testarea părinților se examinează Ag HLA-A și -B, deoarece aprecierea altor Ag este costisitoare și/sau creează dificultăți de interpretare.

Tot mai frecvent la testarea părinților se utilizează analiza ADN, în care se apreciază restricția fragmentelor ADN ce sugerează caracterele moștenite.

### ***HLA în practica medicinei legale***

Metodele bazate pe analiza ADN permit identificarea indivizilor în prezența unor probe biologice minore de lichid sau țesut (peri, celule epiteliale, spermatozoizi). Având posibilitatea de a utiliza un spectru larg de markeri genetici, mai frecvent sunt tipizate totuși alelele HLA-DQ $\alpha$ , grație disponibilității setului respectiv. Este cunoscut că 6 alele diferite DQ $\alpha$  apreciază 21 genotipuri diverse DQ $\alpha$ .

### ***HLA și maladiile***

Există interdependențe recunoscute între fenotipul HLA și posibilitatea de manifestare a diferitor maladii. Este posibil ca câteva mecanisme să relaționeze sistemul HLA cu maladia, în special cu cele pentru care a fost stabilit (sau se presupune) rolul răspunsului imun la microorganisme:

- Genele care determină Ag HLA sunt concomitent și genele ce controlează răspunsul imun, deoarece la legarea Ag HLA non-proprii se realizează interacțiunea dintre Ag și celulele T;
- Structura antigenică a unor molecule poate avea identitate cu unii virioni și este capabilă să modifice răspunsul imun la aceste viruși;
- Unele Ag HLA prezintă receptori pentru virioni.

Studiile au stabilit corelații clare între un șir de maladii și moleculele HLA, dar utilizarea profilului HLA pentru anumite persoane cu risc de apariție a maladiei permite doar relevarea unor interdependențe statistice. Excepție constituie unele maladii genetice induse de expresia genelor legate de locusul HLA: deficiența hidroxilazei 21, hemocromatoza idiopatică și deficiența C2/C4. Pentru aceste maladii s-a demonstrat interdependența absolută dintre apariția maladiilor și moștenirea anumitor gene și haplotipuri.

Tipizarea HLA are o importanță redusă în majoritatea maladiilor, deoarece corelarea morbidă descrisă nu este absolută, fiind adesea falspozitivă sau falsnegativă. O strânsă relaționare s-a demonstrat pentru spondilita anchilozantă și Ag HLA -B27 la rasa albă. Peste 90% de indivizi de rasă albă suferinzi de spondilită anchilozantă sunt purtători de Ag HLA-B27. Pe de altă parte, specificitatea acestui fenomen este destul de joasă: numai la 20% dintre persoanele cu Ag HLA-B27 va apare respectiva maladie. În familiile marcate de această maladie prezența Ag HLA-B27 nu poate fi criteriu unic de apreciere a predispoziției pentru spondilita anchilozantă, deoarece corespondența nu este absolută. Aprecierea Ag HLA-B27 este mai utilă pentru diagnosticul diferențial dintre artrita reumatoidă juvenilă și spondilita anchilozantă.

Gradul de asociere a Ag HLA cu diferite maladii este specificat ca fiind un risc relativ.

În exemplul dat indicele ce caracterizează riscul relativ sugerează că persoanele HLA-B27 pozitive pot dezvolta spondilită anchilozantă cu o probabilitate de 149 ori mai înaltă decât cei cu teste negative la Ag HLA-B27. Alte Ag HLA ce comportă riscuri majore de îmbolnăvire sunt Ag HLA-DR2 – pentru narcolepsie și HLA-27 – pentru sindromul Reiter.

## CAPITOLUL VIII

---

### SISTEMUL ANTIGENIC GRANULOCITAR ȘI TROMBOCITAR

#### **Antigenele granulocitare**

Granulocitele mature posedă antigene specifice care includ NA1 și NA2, NB1 și NB2 – produse ale locusului doi, NC1, ND1 și NE1, 9a și o serie de Ag înrudite denumite antigene granulocitare umane (*human granulocyte antigens, HGA*): HGA-3a, -3b, -3c, -3d și -3e. Anticorprii anti-Ag ai seriei HGA3 nu posedă proprietăți de aglutinare și uneori asociază reacții posttransfuzionale febrile și neutropenii.

Antigenele 5a și 5b s-au dovedit a fi independente de alte sisteme și sunt considerate a fi produsele alelice ale aceleiași gene. Anticorprii care recunosc aceste Ag, de regulă, sunt aglutinine. Acestea pot fi depistate la femei în postgraviditate, în reacțiile transfuzionale febrile.

Concomitent granulocitele conțin antigenele HLA care pot fi depistate prin leucoaglutinare cu serul respectiv. Serul care conține Ac limfocitotoxici specifici și cu activitate majoră uneori poate manifesta reacții negative cu granulocitele chiar în testele de granulocitotoxicitate.

Pentru detecția anticorpilor pe suprafața granulocitelor se utilizează testul de aglutinare în tuburi, microplanșe sau în capilare în prezența EDTA, folosind serul inactivat prin încălzire. Pentru testarea Ac inaglutinabili pot fi utilizate metode de legare superficială cu ser, în care antiglobulina este conjugată cu fluoresceină sau imunoglobulină conjugată cu enzime.

#### **Antigenele trombocitare**

Trombocitele sanguine au o structură antigenică destul de complexă. Ele includ antigene tisulare generale și trombocitare specifice, conțin antigene caracteristice eritrocitelor (AB0, Rh-Hr, M N,P, Le<sup>a</sup>,Kell, Daffy, etc.) și sunt slab manifeste pe suprafața plachetelor. De exemplu, antigenul A pe hematii se depistează în 34% cazuri, de vreme ce pe trombocite - doar în 24%. Antigenele trombocitare sunt prezente în cantități majore în trombocite, dar pot fi depistate și în alte celule. Ele prezintă glicoproteine mem-

branare. Specificitățile și frecvența fenotipurilor antigenelor trombocitare umane este elucidată în tab. 49.

Tabelul 49

**Nomenclatura și frecvența fenotipurilor de antigene trombocitare umane**

Sistemul antigenic	Glicoproteina prezentă	Alte denumiri	Antigenele	Alte denumiri	Frecvența fenotipului, %	
					Rasa albă	Japonezi
HPA - 1	GP III a	ZW, PI <sup>A</sup>	HPA - 1a	ZW <sup>a</sup> , PI <sup>A1</sup>	97,9	99,9
			HPA - 1b	ZW <sup>b</sup> , PI <sup>A2</sup>	26,5	3,7
HPA - 2	GP I b	Ko <sup>b</sup> , Sib	HPA - 2a	Ko <sup>b</sup>	99,3	-
			HPA - 2b	Ko <sup>a</sup> , Sib <sup>a</sup>	14,6	25,4
HPA - 3	GP II b	Bac, Lek	HPA - 3a	Bac <sup>a</sup> , Lec <sup>a</sup>	87,7	78,9
			HPA - 3b	Bac <sup>b</sup>	64,1	-
HPA - 4	GP III b	Pen, Yuk	HPA - 4a	Pen <sup>a</sup> , Yuk <sup>b</sup>	99,9	99,9
			HPA - 4b	Pen <sup>b</sup> , Yuk <sup>a</sup>	0,2	1,7
HPA - 5	GP I a	Br, Hc Zav	HPA - 5a	Br <sup>b</sup> , Zav <sup>b</sup> ,	99,2	-
			HPA - 5b	Br <sup>a</sup> , Zav <sup>a</sup> , Hc <sup>a</sup>	20,6	-

**Notă:** „-” nu au fost efectuate cercetări

Glicoproteinele GPIa, Ib, Ic, IIa, IIb, IIIa, IIIb sunt Ag membranare trombocitare. prezintă lanțuri polipeptidice cu câteva legături disulfidice interne. Cele de tip *Ib*, *Ic* și *IIb* constau dintr-un lanț mare ( $\alpha$ ) și unul mic ( $\beta$ ), conjugate prin legături disulfidice.

Aloantigenele trombocitare sunt imunogene. Transfuziile, sarcinile repetate pot provoca apariția de izoanticorpi antitrombocitari. Incompatibilitatea fetomaternală prin anticorpi antitrombocitari este demonstrată clinic, hematologic și imunologic. Ele se implică în apariția purperei posttransfuzionale și trombocitopenice aloimune neonatale. Sensibilitatea la Ag HPA-A1 (PI<sup>A1</sup>) este cauza complicațiilor posttransfuzionale și a purperei neonatale în 70 % de cazuri. Anticorpilor anti - HPA-5b, -4a, -4b și 3a (Br<sup>a</sup>, Pen<sup>a</sup>, Pen<sup>b</sup>și, respectiv, Bac<sup>a</sup>) de asemenea pot fi cauza purperei aloimune neonatale.

Purpura trombocitopenică poate apărea și la prezența autoanticorpilor antitrombocitari: se pot pune în evidență aglutinine antitrombocitare sau lizine. Plasma acestor bolnavi produce trombocitopenie, dacă este injectată unui individ sănătos.

Purpura trombocitopenică prin autoanticorpi la nou născut se întâlnește în cazurile când mama suferă de o purpură trombocitopenică cu anticiorpi antitrombocitari. Traversarea și aparența acestora în circulația sanguină provoacă trombopenie la făt.

Purpura trombocitopenică asociată cu alte afecțiuni imunologice poate fi constatată în anemiile hemolitice dobândite. Aici se încadrează purpurile trombocitopenice prin sensibilizări alergice. Produsele incriminate sunt: chinina, chinidina, sedormidul, derivații antipirinei etc. Remediul farmaceutic sau alergenul joacă rol de haptent în reacția antigen-anticorp. El se fixează pe proteinele de pe suprafața trombocitelor sau a plasmiei, constituind un complex antigenic împotriva căruia organismul produce anticorpi.

Pentru cercetarea tromboaglutininelor se prepară o suspensie de trombocite normale prin recoltarea sângelui de la un individ sănătos pe anticoagulant (segestren  $\text{Na}_2$  - 1 g, clorură de sodiu -0,75 g, apă distilată -100 ml; se utilizează o parte de amestec pentru 9 părți de sânge). Sângele recoltat se centrifughează 15 min la 800 tur/min la 4°C. Plasma supernatantă este bogată în trombocite. Pentru prepararea plasmiei de la bolnav sângele se recoltează în condiții identice, cu centrifugarea la 3000 rot/min timp de 30 min la 4°C. Plasma bolnavului este lipsită de trombocite.

Reacția se realizează în eprubete prin amestecul a 0,2 ml plasmă de bolnav cu 0,2 ml suspensie de trombocite și incubarea ulterioară pe parcursul a 90 min la temperatura camerei. Concomitent se utilizează proba martor cu plasmă normală lipsită de trombocite. Rezultatele se examinează la microscop.

Cercetarea serului bolnavului la tromboaglutinine se efectuează după coagularea sângelui la 37°C și centrifugarea lui. Serul se inactivează 30 min la 56°C, apoi acesta este decalcificat prin suplimentarea unui volum de soluție oxalat de sodiu M/10 pentru 9 volume de ser. Ulterior serul este absorbit cu sulfat de bariu. Astfel serul tratat se amestecă în părți egale cu suspensie de trombocite preparată conform procedurii descrise anterior: 0,2 ml ser cu 0,2 ml suspensie celulară. Se incubează pe parcursul a 90 min la temperatura camerei și se examinează la microscop. În paralel se lucrează cu un ser normal ca martor. Utilizarea serului tratat dă posibilitatea decelării mai sigure a anticorpilor antitrombocitari. Se recomandă ca eprubetele și pipetele folosite pentru recoltarea și pipetarea sângelui să fie prelucrate cu silicon.

# CAPITOLUL IX

## ALGORITME PENTRU DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL COMPLICAȚIILOR POSTTRANSFUZIONALE ȘI AL BOLII HEMOLITICE A NOU-NĂSCUTULUI

Transfuziile sanguine pot fi însoțite de diverse reacții și complicații de genезă imună și neimună. Reacțiile posttransfuzionale nu induc dereglări severe și de durată, pe când complicațiile au manifestări clinice severe și prezintă risc pentru viața pacientului. Complicațiile de genезă imună sunt rezultatul conflictului dintre componentele sanguine ale donatorului și cele ale recipientului (tab. 50). Complicațiile neimune pot rezulta prin transfuzia eritrocitelor hemolizate, a sângelui infectat cu virioni și bacterii, prin dereglările metabolice induse de transfuzii, prin ignorarea tehnicii transfuzionale etc. Aceste complicații pot fi de caracter imediat (apar în momentul transfuziei sau se pot iniția pe parcursul a câtorva ore postprocedurale) sau tardiv (apar peste câteva zile, luni sau ani).

Tabelul 50

### Clasificarea complicațiilor posttransfuzionale de genезă imună

Reacții de tip imediat	Reacții de tip întârziat (tardive)
Hemolitice	Hemolitice
Febrile nehemolitice	Aloimune
Urticarie	Trombocite nonrespondente
Anafilactice	(refractare)
Insuficiență pulmonară acută dependentă de transfuzie	Maladia „transplant anti – gazdă”
	Imunomodulatorie

De regulă, *complicațiile și reacțiile hemolitice imediate și tardive* apar în urma hemolizei eritrocitelor donatorului, care este indusă de Ac recipientului. Mult mai rar acestea sunt suscitade prin fenomenul de alterare a hematiilor recipientului de către anticorpii donatorului. Acest proces se observă la transfuzia plasmei care conține Ac anti-Ag eritrocitare ale recipientului.

*Reacțiile imune nonhemolitice transfuzionale* nu sunt însoțite de hemoliză, dar sistemul imun participă la declanșarea lor prin acțiunea Ac specifici anti-Ag leucocitare, granulocitare, trombocitare. Evoluția acestor reacții este lejeră.

*Reacțiile febrile nehemolitice* sunt rezultatul interacțiunii dintre Ac plasmei recipientului și Ag prezente pe limfocitele, granulocitele și trombocitele donatorului. Uneori acestea sunt provocate și de citochinele eliberate din leucocite în timpul păstrării sângelui de donație. Este important în cazul dat să excludem și alte cauze care ar fi putut provoca creșterea temperaturii pe parcursul a 8 – 24 ore (maladii respiratorii, reacții septice). Aceste fenomene pot fi observate la recipientii care au în anamneză transfuzii sau sarcini multiple. Se înregistrează la 20% din transfuziile de trombocite și la un caz din 130-400 transfuzii sanguine.

*Urticaria* este consecința reacției alergice la unele substanțe prezente în plasma donatorului și se caracterizează prin erupții urticariene, prurit aparent peste 15-20 minute după transfuzie.

*Reacțiile anafilactice* apar la imunodeficiența de IgA și au la origine reacția Ac anti-IgA cu manifestări locale pe tegument și mucoase afișate după inocularea mediilor hemotransfuzionale în cantități mici. Pot apărea și alte manifestări (tuse, insuficiență respiratorie, spasm bronșic). Se înregistrează rar (1 caz la 20000 – 50000 transfuzii). Consecințele clinice pot fi grave – șoc și chiar exitus.

*Insuficiența pulmonară acută dependentă de transfuzie* este indusă de Ac anti-leucocitari sau anti-neutrofilele transfuzionate care induc activarea sistemului complementului, agregarea granulocitelor și blocarea patului microcirculator pulmonar. Alterarea capilarelor determină dereglarea microcirculației în pulmoni. Apare, de obicei, peste 2 ore după transfuzie. Se întâlnește rar (1 caz la 10000 transfuzii).

*Aloimunizarea* la Ag eritrocitare, leucocitare, trombocitare se dezvoltă după transfuziile repetate de sânge care conține Ag absente la recipientii. Transfuzia primară, de regulă, evoluează fără manifestări de incompatibilitate, dar cu sinteză de Ac, care la transfuziile ulterioare vor incita reacții și complicații posttransfuzionale de tip hemolitic sau nehemolitic.

Alosensibilizarea la Ag eritrocitare apare mai frecvent la transfuzia sângelui integru sau a componentelor sanguine și crește odată cu majorarea numărului de transfuzii.



Aloimunizarea la Ag leucocitare se produce în 20-70% cazuri de transfuzii sanguine din care nu s-au extras în prealabil leucocitele și la majoritatea femeilor multipare.

*Refractaritatea la transfuzia trombocitelor* se manifestă prin absența majorării numărului de trombocite la recipientii de transfuzii trombocitare în rezultatul interacțiunii Ac recipientului cu aloantigenele trombocitare, eritrocitare AB0, leucocitare HLA de clasa I, prezente pe trombocite și care induc alterarea celor din urmă.

*Reacția transplant anti-gază* dependentă de transfuzie apare în cazul când limfocitele T ale donatorului reacționează cu Ag gazdei (recipientului), care sunt recunoscute ca non-proprie. Pot apare și Ac. Fenomenele suscitade se manifestă prin anemie, erupții, diaree, splenomegalie, icter, febră, scăderea masei corporale. Severitatea reacției este dependentă de gradul de diferență a Ag HLA ale donatorului de cele ale recipientului. Este înregistrată la pacienții cu statut imun deficient, dar probabilitatea apariției va crește la transfuziile repetate cu sânge prelevat de la membrii familiei ce au fenotip HLA identic sau similar. Complicațiile posibile sunt septicemia și hemoragiile cu letalitate în 90% cazuri.

Pentru profilaxia complicațiilor se recomandă prelucrarea sângelui donatorului cu raze ionizante pentru inactivarea limfocitelor.

*Efectul imunomodulator al transfuziilor* se manifestă prin acțiunea lor imunosupresivă asupra organismului recipient, din care derivă capacitatea scăzută de recunoaștere a Ag non-proprie. Aceasta poate crește frecvența de apariție a tumorilor, infecțiilor la pacienții ce beneficiază de hemotransfuzii. Mecanismul apariției acestei complicații nu este cunoscut definitiv, dar se definește de către Ag leucocitare. În scop profilactic se recomandă extragerea leucocitelor donatorului din mediile hemotransfuzionale.

Important este și faptul ca medicul, în fiecare caz, să aprecieze necesitatea transfuziei sanguine, luând în calcul coraportul efectului clinic așteptat și riscul apariției complicațiilor.

Analiza comparativă a reacțiilor și complicațiilor hemolitice acute și tardive este elucidată în tabelul 51.

Reperarea și descifrarea mai multor complicații posttransfuzionale poate fi dificilă, mai ales în absența manifestărilor clinice, prezentă fiind doar hipertermia. Cantitatea insuficientă de material pentru cercetare recoltat pretransfuzional poate de asemenea complica analiza de laborator respec-

tivă. Mostrele recoltate de la fiecare pacient trebuie păstrate pentru a tipiza Ag eritrocitare și a se confirma specificitatea Ac care au indus complicațiile posttransfuzionale. Tipizarea mostrei sanguine recoltate după transfuzie este insugestivă deoarece conține și hematiile donatorului.

Tabelul 51

**Reacțiile și complicațiile hemolitice acute și tardive  
(evaluare panoramică)**

Criteria	Acute, de tip imediat	Tardive
Insemne clinice	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hipertermie, febră, dureri în locul injecției, tahicardie, dureri în regiunea lombară;</li> <li>Evoluție rapidă (primele ore);</li> <li>Consecințe grave;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hipertermie</li> <li>Apariție peste 5–7 zile după transfuzie</li> <li>Minorizarea hemoglobinei și hematocritului</li> <li>Icter slab manifest</li> </ul>
Complicațiile principale	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sindromul coagulării intravasculare coagulate</li> <li>Insuficiență renală</li> <li>Șoc</li> <li>Deces</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Complicații neesențiale</li> <li>Reacții mai puțin grave</li> </ul>
Cauzele	<p>Interacțiunea Ag și Ac cu:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>hemoliză intravasculară și activarea sistemului complementului (mai frecvent prin incompatibilitatea AB0)</li> <li>hemoliză extravasculară în rezultatul interacțiunii cu macrofagele (mai frecvent incompatibilitatea Rh)</li> </ul>	<p>Interacțiunea Ag cu Ac</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Recipientii au Ac în concentrații minore sau Ac nu se depistează</li> <li>Specificitatea Ac la Ag Rh, Duffy, Kidd</li> </ul>
Frecvența înregistrării	1:25000 transfuzii	1:2500 transfuzii
Rezultatele investigațiilor de laborator	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hemoglobina liberă a plasmei majorată;</li> <li>Bilirubina serică majorată;</li> <li>Haptoglobina scăzută;</li> <li>Hemoglobinurie;</li> <li>Testul antiglobulinic Coombs direct pozitiv sau negativ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Testul antiglobulinic direct pozitiv;</li> <li>Screening-ul Ac după transfuzie pozitiv;</li> <li>Hemoglobina, hematocritul scăzut;</li> </ul>
Tratamentul	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tratamentul sindromului coagulării intravasculare diseminate, al hipotoniei</li> <li>Dializă - în caz de insuficiență renală;</li> <li>Mentținerea vascularizării adecvate a rinichilor;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transfuzii eritrocitare fără Ag anti-Ac recipientului;</li> <li>Nu este necesar un tratament suplimentar;</li> </ul>
Măsuri profilactice	<ul style="list-style-type: none"> <li>Implementarea sistemului de profilaxie a erorilor la marcarea și identificarea mostrelor sanguine;</li> <li>Asigurarea calității de realizare a cercetărilor imunohematologice asupra sângelui donatorului și recipientului.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anamneză riguroasă transfuzională și obstetricală.</li> </ul>

Mostra recoltată până la transfuzie poate deveni necesară pentru compararea nivelului bilirubinei și haptoglobinei până și după transfuzie.

Pentru elucidarea cauzelor complicațiilor posttransfuzionale în cazul suspectării acestora, sunt necesare:

- controlul posibilelor erori tehnice antetransfuzionale (marcarea corectă a sângelui donatorului, dacă nu cumva au fost încurcate tuburile cu mostrele sanguine ale recipientilor, efectuarea și interpretarea corectă a probei de compatibilitate, controlul apartenenței AB0);
- recoltarea mostrei sanguine și de urină a recipientului cu aprecierea vizuală a prezenței hemolizei în ser sau plasmă prin compararea probelor obținute de la recipient până și după transfuzie. Colorarea în roz sau roșu a serului după transfuzie cu absență până la transfuzie indică distrucția eritocitară și prezența hemoglobulinei libere. Este important să excludem colorarea serului în urma unor eventuale alterări mecanice ale eritrocitelor prin erori tehnice de recoltare a sângelui. În cazul dat este necesară o nouă mostră a sângelui recipientului. La intervalul de 5-7 ore după hemoliză în plasma recipientului apar produsele degradării hemoglobinei – bilirubina, care induce o colorare galbenă sau cafenie. Dispariția bilirubinei poate fi constatată deja peste 24 ore în cazurile când funcția ficatului nu este dereglată;
- Cercetarea mostrei urinare în reacțiile hemolitice acute atestă prezența hemoglobinei libere și absența mioglobinei sau eritrocitelor;
- Mostrele sanguine ale recipientului până și după transfuzie, resturile mediilor hemotransfuzionale utilizate se testează din nou pentru a se verifica apartenența de grup sanguin după sistemul AB0, Rh a recipientului și a donatorului până la transfuzie;
- efectuarea probei de compatibilitate individuală a sângelui donatorului cu serul recipientului recoltat până la transfuzie cu utilizarea testului antiglobulinic și a metodei utilizate (pentru comparație) până la transfuzie;
- testarea repetată a mostrelor donatorului și recipientului recoltate până la transfuzie cu aprecierea apartenenței AB0 și Rh;
- testarea Ac anti-Ag eritocitare în serul recipientului recoltat până și după transfuzie. Important de menționat este faptul absorbției Ac pe eritrocitele incompatibile în complicațiile posttransfuzionale cu diminuarea lor în serul mostrei recoltate posttransfuzie;

- testarea Ac de pe suprafața hematiilor prin utilizarea testului antiglobulinic Coombs direct în mostra recipientului recoltată după transfuzie. Reacția pozitivă indică absorbția Ac pe eritrocitele incompatibile ale donatorului și existența conflictului imun (cu condiția că recipientul și donatorul n-au avut rezultate pozitive până la transfuzie);
- eluția Ac de pe eritrocitele mostrei sanguine recoltată după transfuzie cu cercetarea eluatului cu un panel de eritrocite pentru tipizare în cazul manifestărilor clinice de complicații posttransfuzionale și în absența auto- și aloanticorpilor depistați în sângele recipientului. În cazul reacțiilor tardive traduse cu anemie aparentă la intervalul de 5–7 zile post-hemotransfuzie este indicată reacția Coombs directă cu eritrocitele recipientului. Rezultatul pozitiv indică prezența Ac absorbiți pe hematiile recipientului. Cercetarea eluantului de pe aceste eritrocite poate stabili specificitatea Ac și cauza apariției complicației posttransfuzionale tardive.
- tipizarea eritrocitelor donatorului și ale recipientului după Ag importante clinic oferă posibilitatea aprecierii specificității aloantigenului care a indus incompatibilitatea. Aprecierea necorespunderii profilului antigenic al eritrocitelor donatorului și recipientului sugerează necesitatea cercetării ulterioare a specificității aloanticorpilor din sângele recipientului. Tipizarea mostrei sanguine a recipientului recoltată după transfuzie este neinformativă grație prezenței în aceasta a Ag donatorului.

Profilaxia complicațiilor posttransfuzionale este bazată, în mare măsură, pe cercetarea și selectarea corectă a sângelui pentru transfuzie după Ag eritrocitare ale sistemului AB0, Ag D ale sistemului Rh -, în dependență de prezența sau absența Ac la recipient.

Dacă la recipient n-au fost depistați Ac anti-Ag eritrocitare pentru transfuzie se utilizează sângele compatibil după sistemele AB0 și Rh. În cazul depistării Ac la recipient, transfuzia sanguină este posibilă cu o mostră sanguină a donatorului compatibilă după sistemele AB0 și Rh care nu conține Ag ce pot reacționa cu Ac recipientului.

Efectuarea probei individuale la compatibilitate este obligatorie în toate cazurile. La hemotransfuziile de urgență cercetarea Ac se efectuează după transfuzie pe mostra recipientului recoltată până la transfuzie.

**Maladia hemolitică a nou-născutului și fătului** apare la sinteza Ac materni anti-Ag eritrocitare fetale, care, traversând bariera placentară, ajung în fluxul sanguin al copilului și induc hemoliza eritrocitelor acestuia.

Posibilitatea apariției Ac la mamă este dependentă de fenotipul fătului, imunogenitatea Ag, cantitatea eritrocitelor fetale care au pătruns în circuitul matern. Cantități minore de sânge fetal pot ajunge în fluxul sanguin matern și în sarcina cu evoluție normală, dar aceasta este insuficient pentru inducția sintezei de Ac la mamă. Imunizarea femeilor poate avea loc în perioada gravidității (1%) și la naștere (16%). Riscul hemoragiilor transplacentare crește în toxicoza gravidelor, la cercetarea acestora în intervenția cezariană, avorturi (spontane și terapeutice), amniocenteză, la recoltarea mostrelor sanguine de la făt, la decolarea manuală a placentei.

Se implică cu rol major în inducția MHNN Ac incompleți IgG care traversează bariera placentară și ajung în circuitul sanguin al fătului. Anticorpilor subclaselor IgG1 și IgG3, fixându-se pe eritrocite, induc hemoliza acestora. De menționat, că cantitatea de Ac necesară pentru hemoliza *in vivo* poate fi mai mică decât cea pentru detecția Ac *in vitro* la utilizarea testului antiglobulinic Coombs direct. De aceea rezultatele testării autoanticorpilor uneori pot fi negative în prezența tabloului clinic de MHNN. Nivelul IgG la făt și severitatea MHNN este dependentă de concentrația Ac materni.

Până la 24 săptămâni de sarcină transferul de IgG este lent, deoarece se observă rar apariția MHNN în această perioadă, riscul ei sporind ulterior. La naștere nivelul IgG la făt este mai mare decât la mamă, iar hemoliza este maximală.

Destrucția eritrocitelor fetale sensibilizate cu Ac evoluează lent, dar progresiv, în special în ficat. Macrofagele ficatului, având receptori pentru fragmentele Fc IgG, realizează destrucția eritrocitară fetală.

Hemoliza intensivă și anemia stimulează formarea progresivă a eritroblaștilor și apariția lor în sângele fătului și nou-născutului. Dar uneori chiar în cazurile severe eritroblastoză poate fi absentă.

Hemoliza eritrocitelor induce hiperbilirubinemia. În perioada intrauterină bilirubina se află în stare liberă, trece prin placentă și este neutralizată de enzima ficatului, ceea ce diminuează intensitatea bilirubinemiei fătului. Post-natal transferul bilirubinei libere în fracțiune conjugată în hepatocite evoluează lent grație funcției enzimactice insuficiente a nou-născutului și astfel concentrația bilirubinei libere în sânge crește rapid. Apariția hiperbilirubiniei

va induce icterul pielii și mucoaselor, poate și encefalopatia bilirubinică grație fixării ei în celulele nervoase bogate în lipide (bilirubina liberă este solubilă în grăsimi) cu alterarea nucleilor subcorticali și tronculari ai encefalului. Majorarea concentrației bilirubinei libere induce alterarea tuturor țesuturilor nou-născutului datorită edemului mitocondriilor, dereglării proceselor de fosforilare oxidativă și descreșterii nivelului de fosfați energetici.

Pătrunderea în organismul fătului a unei cantități majore de Ac poate induce alterarea capilarelor cu apariția edemului fetal și al placentei, în rezultatul cărora produsul concepțional va pieri.

*Algoritmul de investigație imunoematologică a gravidelor* include anamneza obstetricală și transfuzională, testarea grupei sanguine după sistemele ABO și Rh, aprecierea prezenței Ac anti-Ag sistemului Rh, a altor antigene eritrocitare clinic importante: atât a celor cu apartenență Rh- negativă cât și Rh- pozitivă (screening-ul Ac). În tabelul 52 este prezentată importanța Ag eritrocitare și Ac în declanșarea MHNN.

Tabelul 52

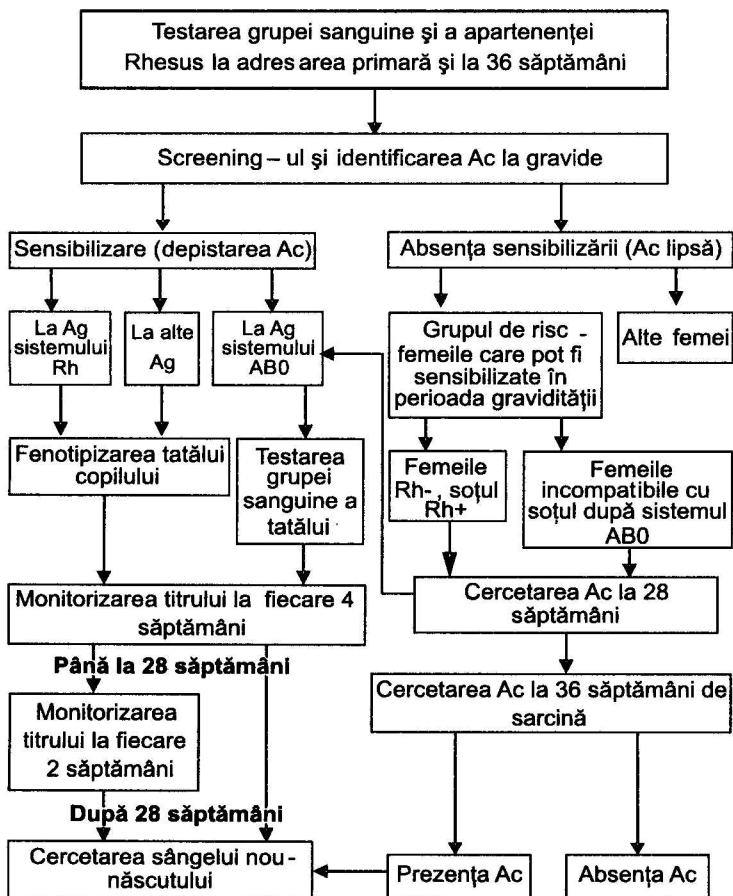
#### Importanța Ag eritrocitari și Ac în apariția MHNN

Sistemul antigenic eritrocitar	Ac frecvent includ MHNN	Ac pot induce MHNN	Ac nu induc MHNN
ABO	Anti-A, -B		Anti-A <sub>1</sub>
MNS	Anti-S, -s, -U	Anti-M	Anti-N
P			Anti-P <sub>1</sub>
Rhesus	Anti-D, -c, -C, C <sup>w</sup> , -E, anti-e, anti-G		
Lutheran		Anti-Lu <sup>a</sup> , -Lu <sup>b</sup>	
Kell	Anti-K, -k	Anti-Kp <sup>b</sup>	
Levis			Anti-Le <sup>a</sup> , -Le <sup>b</sup>
Duffi	Anti-Fj <sup>a</sup>	Anti-Fy <sup>b</sup>	
Kid		Anti-Jk <sup>a</sup> , -Jk <sup>b</sup>	

Dacă screening-ul Ac a dat rezultat pozitiv, este necesară identificarea Ac. În cazul când la gravidă se pot depista Ac IgM cu specificitate anti-Ag care pot induce MHNN, de aceea este necesară monitorizarea Ac, dat fiind pericolul de apariție a Ac de clasa IgG, care au importanță clinică în apariția MHNN comparativ cu IgM, care nu pot transborda placenta (MM mare) și nu induc patologia respectivă.

Cercetarea algoritmică a femeilor gravide este elucidată în figura 12.

**Figura 12. Algoritmul de investigare a gravidelor**



După investigația primară la prezența Ac gravidele vor fi repartizate în 3 grupe:

- sensibilizate;
- nesensibilizate;
- cu risc major de aloimunizare (cu apartenență sanguină Rh-negativă și cu soț Rh-pozitiv, cu anamneză complicată, gravidele grupa sanguină a cărora nu corespunde cu a soțului: 0-A, 0-B, A-B și, respectiv, B-A.

Până la 28 săptămâni de gestație, gravidele sensibilizate la Ag eritrocitare cu importanță clinică, se testează pentru controlul titrului de Ac o dată în lună, după 28 săptămâni – o dată în 2 săptămâni.

Monitorizarea titrului Ac anti-Ag sistemului ABO se efectuează la adresarea primară și la 28 săptămâni de sarcină. Ulterior testarea titrului de Ac se realizează o dată în lună pentru gravidele la care s-a constatat creșterea titrului Ac sau care au mai născut copii cu MHNN. Severitatea MHNN dependentă de sistemul ABO nu se corelează cu titrul, de aceea nu este necesară cercetarea Ac anti-Ag ABO după modelul de investigații reglementate pentru Ac anti-Ag sistemului Rh.

Gravidele nesensibilizate din grupul cu risc major de aloimunizare sunt investigate la a 28-a și 36-a săptămână de gestație și pe parcursul unei luni după naștere. La detecția aloanticorpilor cercetările ulterioare se practică ca la gravidele sensibilizate.

Femeile la care cercetările de screening nu au detectat Ac se vor investiga repetat la a 36-a săptămână de sarcină.

Gravidele ce dețin variantele antigenice D se testează pentru aloanticoni asemenea gravidelor cu apartenență sanguină Rh-negativă. La necesitate li se efectuează testarea Ac de subclasele IgG materne.

*Controlul imunohematologic al nou-născutului* pentru diagnosticul MHNN include:

- Testarea grupei sanguine și a apartenenței Rh, care permite excluderea sau confirmarea posibilității conflictului imun feto-matern. De menționat că nou-născuții, cărora le-au fost efectuate transfuzii intraumbilicale, deseori la naștere sunt tipizați ca fiind D-negativi sau slabpozitivi, deoarece până la 90% de hematii ale acestora sunt de originea donatorului;
- Nou-născuții cu MHNN și copiii născuți de la femeile sensibilizate și cu risc major sunt examinați prin testul antiglobulinic direct cu eritrocitele proprii. Este importantă utilizarea reagentului anti-IgG monospecific și nu a celui polispecific. Rezultatul pozitiv indică prezența aloanticorpilor fixați pe hematiile nou-născutului;
- Testarea Ac IgG anti-Ag sistemului Rh și altor grupe sanguine de importanță clinică în serul matern și al nou-născutului;
- Testarea Ac IgG anti-A și anti-B în serul sanguin matern la diferențele de grup sanguin matern și fetal după sistemul ABO. Rezultatul



pozitiv denotă despre conflictul imunologic mamă și nou-născut după Ag eritrocitare ale sistemului ABO;

- Cercetarea eluatului obținut de pe eritrocitele nou-născutului oferă posibilitatea de a aprecia specificitatea Ac care au indus distrucția eritrocitelor și de a selecta eritrocitele compatibile de donație. Există multe metode de realizare a eluatului Ac de pe suprafața eritrocitelor, dar 2 din ele nu necesită reagenți suplimentari.

**Metoda eluției la cald** prevede spălarea de 3-4 ori a eritrocitelor cercetate cu soluție fiziologică prin centrifugare la 1000tur/min pe parcursul a 3 min. Se amestecă cantități egale de eritrocite și sol. de 0,9% NaCl, care se întrețin la temperatura de 56°C timp de 10 min, apoi se centrifughează 2 min la viteza de 3000 tur/min, iar supernatantul se transferă rapid într-un tub curat (eluat) și se cercetează la prezența Ac.

**Tehnica LUI** prevede tripla spălare a 0,5 ml eritrocite cercetate cu sol. NaCl de 0,9% prin centrifugare la 1000tur/min – 3 min, înlăturarea supernatantului; în tub se introduc 3 picături de soluție NaCl de 0,9%, se închide cu dop, apoi se rotează în așa fel, încât peretele intern al eprubetei să se acopere cu eritrocite; se congelează la temperatura -20 -70°C timp de 10 minute în poziție orizontală (la necesitate păstrarea mostrelor în condițiile date este posibilă până la 2 luni). Decongelarea conținutului tubului se efectuează sub jet de apă, se centrifughează la 1000 tur/min timp de 2 min, eluatul se transferă într-un tub curat și se cercetează la prezența Ac.

Conflictul imun mamă-făt are unele particularități în dependență de diferențele sistemelor antigenice eritrocitare.

Așadar, Ac anti-A și anti-B prezintă un amestec de IgM și IgG naturale și imune, ce rezultă din imunizarea cu Ag identice A și B, care se conțin în peretele membranelor al bacteriilor. Posibil că acestui fapt i se datorează procentul major de înregistrare a MHNN la primii născuți, dependența de incompatibilitate după sistemul ABO comparativ cu sarcina incompatibilă după Ag sistemului Rh. Ag ABH aparenti precoce pe suprafața eritrocitelor și a țesuturilor embrionare sunt o țintă pentru Ac materni anti-A și anti-B de clasa IgG. Prin aceștia pot avea loc dereglări ale organogenezei fătului și moartea lui embrionară precoce. MHNN dependentă de sistemul ABO, deși este aparent frecventă, mai rar este de variante severe. Icterul și anemia se înregistrează cu frecvența de 1 caz la 30-150 nașteri, pe când formele severe – de 1 caz la 3000 nașteri.

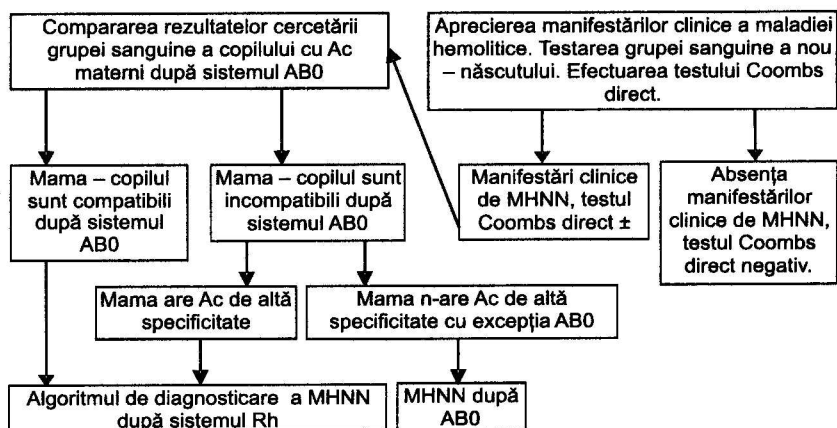
MHNN se apreciază numai la 10-20% cazuri de incompatibilitate materno-fetală după sistemul AB0, fiind înregistrată de 40 ori mai frecvent la mamele cu grupa 0 comparativ cu cele de grup A și B.

Formele severe de MHNN după sistemul AB0 sunt înregistrate mai rar grație inhibiției Ac anti-A și anti-B materni de concentrația majoră de Ag solubile A și B fetale în țesutul placentei, din plasma sanguină fetală și lichidul amniotic. Dar structura Ag A și B ale fătului se diferă de cea a adulților și hematiile fetale vor lega un număr minor de Ac, chiar dacă sunt numeroase. Serurile gravidelor conțin Ac IgG2 anti-A și anti-B. Deoarece receptorii Fc ai celulelor țesutului leagă mai eficient IgG1, nici chiar titrele mari de IgG2 anti-A și anti-B nu induc MHNN severă. Iată de ce în unele cazuri la nou-născut se observă testul antiglobulinic direct, dar MHNN este absentă. Dar pot fi și cazuri, când testul antiglobulinic este negativ chiar în prezența MHNN, ceea ce se poate datora prezenței Ac IgG3 anti-A, -B în cantitate mai mică decât nivelul de testare prin TAG.

TAD nu este informativ pentru diagnosticul MHNN după sistemul AB0. Eluatul de pe eritrocite a nou-născutului activ reacționează cu eritrocitele A și B ale donatorilor chiar la TAD negativ.

Diagnosticul de laborator al MHNN generată de Ag sistemului AB0 este prezentat în figura 13.

**Figura 13. Algoritm de diagnosticare a maladii hemolitice a nou-născutului după sistemul AB0**



MHNN dependentă de incompatibilitatea AB0 se poate constată numai fiind prezenți următorii factori:

- Existența Ac AB0 anti-Ag nou-născutului în serul matern;
- Manifestările clinice de MHNN;
- Serul matern nu conține Ac de altă specificitate, cu excepția celor anti-A și B.
- Eluatul de pe eritrocitele fetale conține Ac anti-A sau anti-B. Există corelație între activitatea Ac din eluat și intensitatea MHNN. TAGD este întotdeauna pozitiv în formele severe.

**MHNN dependentă de incompatibilitatea materno-fetală** după Ag eritrocitare de sistemul Rh este rezultatul imunizării cu Ag respective la transfuzii și în timpul sarcinii. Imunogenitatea Ag s-ar afișa în următoarea succesiune – D > c > E > C > e.

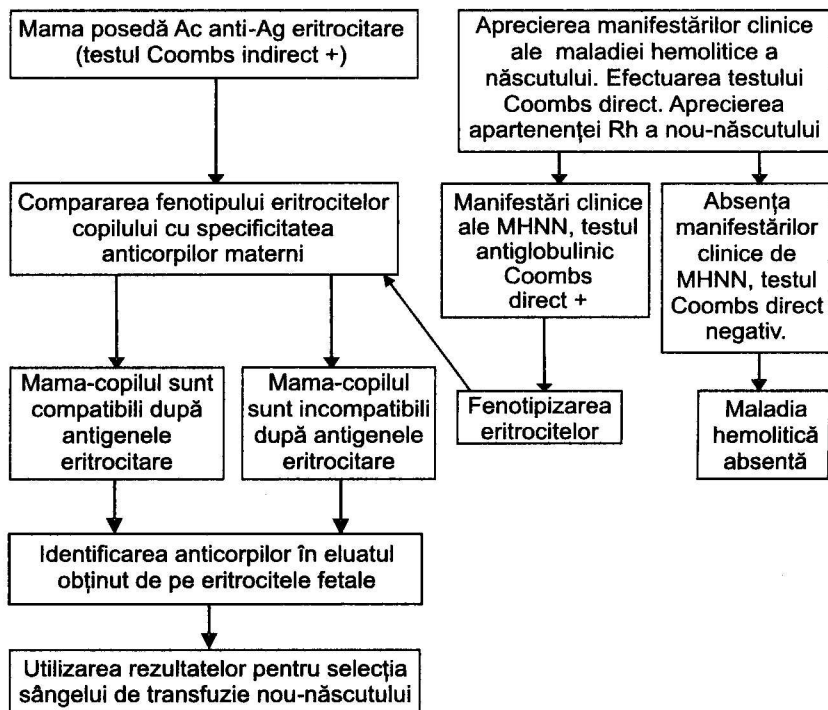
În 95% cauza MHNN severe este Ag D. Uneori sensibilizarea apare și la prima graviditate, iar altă dată după 4-5 sarcini.

Unele date demonstrează faptul că incompatibilitatea după Ag AB0 reduce posibilitatea imunizării cu alte Ag eritrocitare. Ac anti-Ag sistemului Rhesus se referă la subclasele IgG1 și IgG3. Circa 50% copii cu MHNN fac o formă ușoară și nu necesită tratament. Alte 25% de copii se nasc vii, dar dacă nu sunt tratați imediat după naștere dezvoltă icterul nuclear cu consecințe nefaste pentru viață. Celelalte 25% vor muri intranatal prin hidropsis.

Ac anti-c induc MHNN de aceeași severitate ca și anti-D, care se poate finaliza cu hidrops, exitus. Ac anti-C, Ce, C<sup>w</sup> rar induc MHNN care să necesite tratament.

Algoritmul diagnosticului MHNN după Ag sistemului Rhesus și alte Ag eritrocitare clinic importante este redat pe în figura 14.

**Figura 14. Algoritmul de diagnosticare a maladii hemolitice a nou-născutului după sistemul antigenic Rh și alte Ag de valoare clinică**



Pe poziția unor criterii de confirmare a diagnosticului de MHNN după sistemele Rh și alte Ag de valoare clinică pot fi considerate următoarele evidențe:

- Manifestări clinice de maladie la nou-născut;
- Serul matern conține aloanticorpi cu specificitate constatată;
- Nou-născutul are Ag eritrocitar, iar serul matern conține Ac anti-Ag respectiv;
- TAGD la nou-născut pozitiv confirmă prezența aloanticorpilor pe eritrocitele lui;
- Cercetările eluatului de pe eritrocitele nou-născutului demonstrează că specificitatea lor corespunde specificității anticorpilor materni.

Profilaxia sensibilizării la Ag D este recomandată gravidelor Rh-negative cu risc de sensibilizare prin hematiile Rh-pozitive fetale. Ea va fi eficientă doar dacă imunoglobulina anti-D se inoculează până la sensibilizare și în doza adecvată (100-300mg).

*MHNN dependentă de Ac materni anti-Ag eritrocitare fetale de altă specificitate se înregistrează mai frecvent la incompatibilitatea după sistemul antigenic Kell (1:10000 – 1:20000 nașteri).*

Anticorpul anti-K aparține subclasei IgG1 și, mai rar, altor clase. Imunizarea are loc la hemotransfuzii și pe fond de graviditate. Există o corelație între titrul de Ac și severitatea MHNN: la titrul Ac <1:128 se observă o formă ușoară a maladiei, pe când la titre mai mari au loc manifestări severe ale maladiei. Dar au fost relatate forme severe de MHNN inclusiv la titrul 1:8. Ac anti-K *in utero* induc supresia eritropoiezei cu anemie fetală în absența majorării bilirubinei în lichidul amniotic și absența reticulocitozei în circulația fetală.

*Ac anti-Fy<sup>a</sup> și anti-Fy<sup>b</sup> induc MHNN de severitate medie, care este dependentă de titrul de Ac. Pot avea loc și evoluții letale.*

*Ac anti-Jk<sup>a</sup> activează complementul, se constată fenomenul „doză-efect”, de regulă cu evoluție moderată. Au fost înregistrate și cazuri severe.*

*Ac anti-M induc forme moderate de MHNN și au două particularități: TAD este slab manifest (+), pe când hematiile spălate spontan aglutinează în mediul coloidal, iar rezistența osmotică a eritrocitelor este majorată.*

*MHNN dependentă de Ac anti-N se întâlnește foarte rar. A fost descris un caz cu severitate medie.*

*Ac anti-S și anti-s induc MHNN severă, uneori cu sfârșit letal. MHNN indusă de Ac anti-U poate avea caracter grav și chiar fatal.*

Despre intensitatea hemolizei eritrocitelor copilului la naștere se concluzionează după conținutul majorat al bilirubinei indirecte în serul sanguin.

Nivelul bilirubinei serice de peste 340 μmoli/l indică transfuzii de substituție, iar în cazurile cu manifestări clinice certe se realizează hemotransfuzii și la o concentrație mai mică a bilirubinei.

La selectarea eritrocitelor pentru transfuzie se reiese din faptul că până la 3 luni de viață a nou-născutului toți Ac sunt de origine maternă și selecția componentelor sanguini pentru transfuzie se va efectua reieșind din specificitatea Ac materni.

În tabelul 53 este prezentată modalitatea de selectare a componentelor sanguini pentru transfuzie în cazul, când grupul sanguin AB0 matern și cel al nou-născutului nu coincid. Masa eritocitară nu trebuie să conțină Ac IgG ale sistemului AB0 sau se va prefera transfuzia de eritrocite spălate.

Tabelul 53

**Selectarea componentelor sanguini în incompatibilitatea feto-maternă după Ag sistemului AB0**

Mama	Nou-născutul	Masa eritocitară	Plasma
0	A	0	A
0	B	0	B
A	B	0	B
B	A	0	A
A	AB	A,0	AB
B	AB	B,0	AB

La incompatibilitatea mamei și copilului după Ag D se vor transfuziona eritrocite de grup sanguin 0 Rh-negative (tab. 54).

Tabelul 54

**Selectarea componentelor sanguini la incompatibilitatea „mamă-făt” după Ag eritrocitare de sistem Rh**

Mama	Ac materni	Nou-născutul	Masa eritocitară	Plasma
0 Rh-	anti-D	0, A,B,Rh+	0 Rh-	De același grup sanguin cu nou-născutul sau AB
A,B,Rh-	anti-D	0 Rh+	0 Rh-	
A Rh-	anti-D	B Rh+	0 Rh-	
B Rh-	anti-D	A Rh+	0 Rh-	

În incompatibilitatea feto-maternă după Ag eritrocitare ale altor sisteme clinic importante selecția individuală a sângelui se efectuează printre mostrele care nu conțin Ag față de care au fost depistați Ac cu impact cauzativ în apariția maladiei și care vor lua în considerație compatibilitatea maternă după sistemul AB0.

Dacă este imposibilă recoltarea sângelui matern pentru cercetările imunohematologice, atunci screening-ul și identificarea Ac anti-Ag eritrocitare se efectuează în serul nou-născutului. La suspecția MHNN concomitent se cercetează și eluatul obținut de pe eritrocitele nou-născutului. Testarea Ac se efectuează prin intermediul testului antiglobulinic.

# ANEXE

## INSTRUCȚIUNE pentru determinarea grupului sanguin după sistemul AB0

Grupul sanguin după sistemul AB0 se caracterizează prin diverse combinații ale proprietăților antigenice specifice eritrocitelor denumite *aglutinogene* și anticorpilor anti-antigenele eritrocitelor – *aglutinine*, circulante în plasma sanguină. Sunt cunoscute 2 aglutinogene de grup – A și B și două aglutinine – anti-A și anti-B. Diferite combinații ale aglutinogenelor și aglutininelor formează 4 grupe sanguine după sistemul AB0: 0, A, B, AB.

Pentru determinarea grupelor sanguine se folosesc seruri izohemaglutinante standard, reagenți ce conțin anticorpi monoclonali, seruri hiperimune de la animale imunizate cu eritrocite A și B umane, lectinele (reagenți preparați din extrasele plantelor care conțin proteine identice anticorpilor anti-A și anti-B) și eritrocitele standard.

Există două metode de determinare a grupelor sanguine după sistemul AB0.

1. Determinarea grupelor sanguine cu ajutorul serurilor izohemaglutinante standard sau cu reagenți ce conțin anticorpi monoclonali.
2. Determinarea grupei sanguine prin metoda încrucișată.

Prima procedură este preventivă și se efectuează în secțiile curative ale instituțiilor medicale sau de către grupul de pregătire a sângelui de la centrele și secțiile de transfuzie a sângelui.

Pentru a doua tehnică se utilizează eritrocite standard și ser izohemaglutinant standard sau reagenți cu anticorpi monoclonali. Metoda permite stabilirea prezenței sau absenței aglutinogenilor A, B și aglutininelor anti-A și anti-B.

Aprecierea rezultatului definitiv privind apartenența grupei sanguine după sistemul AB0 se emite numai după determinarea aglutinogenelor și aglutininelor prin metoda încrucișată, care este *obligatorie*.

Determinarea grupei sanguine se efectuează de un medic cu o pregătire specială în domeniul izoimunologiei.

Rezultatele investigărilor izoserologice efectuate bolnavilor se vor înscrie în fișa medicală a pacientului de staționar cu indicarea datei și semnătura persoanei care a efectuat această examinare.

La donatori grupul sanguin ABO se determină la fiecare donare, în două etape (*predonare* – când se utilizează seruri izohemaglutinante standard sau reagenți monoclonali și *postdonare* – prin metoda încrucișată). Rezultatele examinării donatorului și sângelui donat se documentează în cartela donatorului, fișa de evidență a rezultatelor examinărilor de laborator a sângelui donat cu indicarea datei și semnătura persoanei, care a efectuat această examinare.

Testarea grupei sanguine la donatori poate fi efectuată cu 2 serii de ser izohemaglutinant standard cu titrul de 1:32 și peste sau cu loturi diferite de anticorpi monoclonali.

**Principiul reacției** este bazat pe aglutinarea eritrocitelor de către anticorpii antieritocitari A și B cu formarea de hemaglutinate – grunji vizibili cu ochiul liber.

**Materiale necesare:** plăci cu godeuri din sticlă, metal, ceramică sau material plastic, pipete Pasteur, baghete din sticlă sau plastic, soluție izotonică (0,9%) de clorură de sodiu (soluție fiziologică), 2 serii de seruri izohemaglutinante standard de grup 0, A, B și AB, eritrocite standard de grup 0, A, B, anticorpi monoclonali anti-A, anti-B, anti-AB, taimer, etc.

*Condiții de efectuare a reacției și prepararea prealabilă a ingredientelor:*

1. Reacția de hemaglutinare se efectuează la temperatura 15-25°C într-o încăpere bine iluminată.
2. Flacoanele cu seruri standard se instalează într-un stativ cu 3 godeuri (sau în 2 stative la utilizarea a două serii de ser de fiecare grup). În godeul din stângă se instalează serul de grup 0, în mijloc – serul A și în cel din dreapta – serul de grup B. Separat se instalează serul de testare a grupei AB, utilizat ca control suplimentar. Acest set se completează cu un tub sau un flacon cu soluție fiziologică.

În fiecare flacon cu seruri standard se introduce câte o pipeta curată și uscată.

3. Pentru spălarea baghetelor de sticlă sau plastic și a pipetelor Pasteur se folosesc 2 pahare (150 ml) cu soluție fiziologică.



4. Sângele pentru cercetare se obține prin înțeparea degetului sau venepuncție. Prin venepuncție sângele, în volum 2-5 ml, se colectează în tuburi fără stabilizator (anticoagulant) marcate preventiv cu inițialele individului. Se poate utiliza și sângele colectat cu stabilizator (soluție 4% de citrat de sodiu 0,25 ml la 1 ml sânge). Tubul este lăsat la temperatura camerei timp de 20 min pentru formarea cheagului cu separarea serului. În cazul necesității de separare rapidă a serului, tubul cu sânge poate fi centrifugat la 1500-2000 tur/min timp de 10 min.

În unele cazuri se admite păstrarea sângelui pe parcursul a 48-72 ore la temperatura 4-8°C pentru cercetare ulterioară. Sângele pentru testare trebuie colectat până la transfuzie, deoarece transfuzia de sânge incompatibil sau a unui mare volum de componenți sanguini de la persoanele cu grupa 0 poate conduce la concluzii incorecte despre apartenența de grup sanguin.


























5. Pentru testarea aglutininelor anti-A și anti-B se utilizează eritrocite standard conservate de grupa 0, A, B, care înainte de utilizare se spală de 4 ori cu o soluție fiziologică prin centrifugare la 1000 tur/min curs de 10 min. Eritrocitele spălate în tuburi se instalează într-un stativ în ordinea următoare: începând din stânga grupa 0, A, B.

*Tehnica de lucru* se realizează în două variante: cu ajutorul serurilor izohemaglutinante standard, când se determină prezența sau absența aglutinogenelor și prin varianta încrucișată cu utilizarea eritrocitelor și serurilor izohemaglutinante standard sau a reagenților cu anticorpi monoclonali.

### **Determinarea grupelor de sânge cu utilizarea serurilor izohemaglutinante standard**

Pe planșe în partea dreaptă se indică numele, prenumele persoanei investigate, iar începând din partea stângă se notează simbolul specificității serurilor izohemaglutinante: 0 (anti-A+B), A (anti-B), B (anti-A). Sub fiecare simbol se depun câte 0,1 ml (o picătură mare) de ser izohemaglutinant standard de grupa corespunzătoare, pipeta fiind imediat repusă în flaconul respectiv. Cele două serii de seruri standard sunt aranjate în două rânduri una sub alta (fig. 15). Picăturile de sânge cercetate (0,01 ml) se depun cu o baghetă de sticlă/plastic alături de picătura de ser izohemaglutinant standard. Coraportul dintre picătura de sânge și volumul serului izohemaglutinant standard trebuie

**Figura 15. Testarea gupului sanguin prin utilizarea serurilor standard**

SERURILE ISOHEMAGLUTINANTE STANDARD UMANE					Grupul sanguin investigat
Seria	0 anti-(A+B)	A anti-B	B anti-A	AB Control	
1					0
2					
1					A
2					
1					B
2					
1					AB
2					

**Notă:**



Agglutinare absentă



Agglutinare prezentă

să fie 1:10. Picătura de sânge se amestecă cu cea de ser cu bagheta, folosind de fiecare dată alt bețișor pentru omogenizare. Se poate folosi și o singură baghetă, dar după amestecul fiecărei picături bagheta se spală în vasul cu soluție fiziologică și se șterge minuțios cu tifon. Picăturile obținute în urma omogenizării vor avea un diametru de cel puțin 1 cm. Ulterior planșa este agitată prin înclinarea repetată cu pauze de 1-2 minute între agitări. Reacția este monitorizată timp de 5 minute, grație posibilității unei hemaglutinări tardive, de exemplu, cu eritrocitele subgrupe  $A_2$ ,  $A_2B$  etc. După 3 minute în amestecul de picături se adaugă câte 0,05 ml soluție fiziologică, se omogenizează conținutul, apoi reacția este urmărită până la 5 minute.

**Controlul și interpretarea rezultatelor reacției.** Reacția de hemaglutinare poate fi pozitivă sau negativă. În cazul reacției pozitive în primele 10-30 secunde după amestecul reagenților apar aglutinate mici de culoare roșie, care conțin eritrocite aglutinate de anticorpi. Aglutinatele mici devin tot mai mari ca rezultat al aglomerării lor, iar picătura se decolorează spre margini. În cazul reacției negative amestecul rămâne omogen (colorat în roșu) fără semne de aglutinare. Rezultatul reacției cu serul izohemaglutinant standard al celor două serii utilizate pentru respectivul grup trebuie să coincidă. La cercetarea sângelui cu utilizarea serurilor izohemaglutinante standard putem obține 4 variante ale reacției (tab. 55).

1. Dacă serurile celor trei grupe au demonstrat reacție negativă, adică toate picăturile au rămas difuz colorate în roșu fără semne de aglutinare, atunci putem afirma, că sângele cercetat nu conține aglutinogene A și B și aparține grupei 0.
2. La apariția aglutinării cu serurile grupelor 0 și B și absența fenomenului în serul de grup A, putem afirma că sângele conține aglutinogenul A și aparține grupei A.
3. Reacția pozitivă cu serurile grupelor 0 și A, iar cea negativă cu serul grupei B ne permite să afirmăm, că sângele cercetat conține aglutinogenul B aparținând grupei B.

**Rezultatele posibile ale reacției de hemaglutinare specifică cu serurile izohemaglutinante standard**

Seruri izohemaglutinante de grup					Apartenența de grup sanguin
Seria	0 anti-A+B	A anti-B	B anti-A	AB control	
1	-	-	-		0
2	-	-	-		
1	+	-	+		A
2	+	-	+		
1	+	+	-		B
2	+	+	-		
1	+	+	+	-	AB
2	+	+	+		

**Notă:** \* Aprecierea apartenenței de grup sanguin cu 2 serii de seruri izohemaglutinante. Semnul “+” indică prezența aglutinării, iar semnul “-” absența ei.

4. Reacțiile pozitive cu serurile celor trei grupe indică faptul că sângele cercetat conține ambii aglutinogeni (A și B) și aparține de grupul AB. Dar în cazul dat, pentru excluderea aglutinării nespecifice a eritrocitelor cercetate, este necesar un martor suplimentar cu ser standard de grupul AB. Pentru aceasta pe planșă se depune 0,1 ml ser AB standard și se adaugă 0,01 ml din sângele cercetat. Aceste două picături se amestecă și reacția se monitorizează 5 minute, periodic agitând planșa. Numai absența aglutinării în această picătură și prezența ei în cele care conțin serurile standard 0, A și B permit aprecierea reacției ca fiind specifică, iar sângele cercetat este identificat ca fiind de grupul AB. Această variantă de testare a grupeii sanguine se folosește pentru investigații izoserologice în instituțiile medicale ca metodă prealabilă.

## Determinarea grupelor sanguine prin metoda încrucișată cu utilizarea serurilor izohemaglutinante și a eritrocitelor standard

Această variantă de testare a grupelor sanguine se practică pentru identificarea aglutinogenilor în eritrocitele sângelui cercetat prin intermediul serurilor izohemaglutinante standard și al aglutininelor de grup anti-A și anti-B în ser – cu ajutorul eritrocitelor standard. Se folosește pentru determinarea grupelor sanguine în laboratoarele instituțiilor medicale.

**Materialele necesare, condițiile și prepararea prealabilă a reagenților** sunt cele redată în compartimentul precedent.

**Tehnica de lucru.** Pentru cercetare se utilizează atât serul, cât și eritrocitele individului investigat. Pe planșă se notează numele și prenumele persoanei cercetate și simbolurile grupelor de sânge: 0 (anti-A+B), A (anti-B), B (anti-A).

Sângele pentru cercetare, în volum de 2-3 ml, prelevat prin venepuncție, este centrifugat la 1500 tur/min curs de 5-10 min pentru obținerea serului. Este posibilă și varianta de instalare în termostat (37°C) a sângelui timp de 10 min, după care se trece în frigider și se întreține la temperatura 2-8°C și apoi se separă cheagul de la peretele tubului.

Pe planșe, sub marcajul de grup sanguin, se picură câte 0,1 ml ser pentru cercetare, iar mai jos se picură câte 0,1 ml ser izohemaglutinant standard în câte 2 serii de fiecare grup, astfel obținând 6 picături amplasate în două rânduri câte 3, care sunt semnificate din stânga spre dreapta ca 0, A, B. Alături de picăturile serului cercetat se aplică câte 0,01 ml eritrocite standard ale grupelor 0, A, B, iar lângă serurile standard se picură câte 0,01 ml eritrocite ale persoanei investigate. Fiecare pereche de picături este amestecată cu o baghetă curată și uscată până la omogenizarea completă a picăturii. Periodic planșa se înclină, reacția fiind monitorizată curs de 5 min. În picăturile cu ser standard aglutinarea, ca regulă, apare peste 10-30 sec, pe când în picăturile unde se testează serul cu eritrocitele standard aglutinarea poate apare mai târziu (la sfârșitul minutului 5) datorită titrului minor de aglutinine în serul cercetat. Pe măsura apariției aglutinării, dar numai devreme de 3 min, în picăturile unde aceasta a apărut se adaugă câte o picătură (0,05 ml) de soluție fiziologică, se omogenizează și se urmărește reacția cu agitarea planșei până la 5 min.

Scenariul rezumativ al testărilor asupra aglutinogenelor și aglutinine-  
lor din sângele examinat este redat în tabelul 56.

Tabelul 56

**Aprecierea rezultatelor testării grupei sanguine cu utilizarea eritrocitelor și  
serurilor izohemaglutinante standard**

Eritrocite standard			Seruri izohemaglutinante standard			Apartenența de grup a sângelui cercetat
0	A	B	0 (anti-A+B)	A (anti-B)	B (anti-A)	
-	+	+	-	-	-	0
-	+	+	-	-	-	
-	-	+	+	-	+	A
-	-	+	+	-	+	
-	+	-	+	+	-	B
-	+	-	+	+	-	
-	-	-	+	+	+	AB
-	-	-	+	+	+	
<b>Controlul cu serul grupei AB – rezultat negativ “-”</b>						

**Notă:** \* Semnul “+” indică prezența aglutinării, iar “-” absența ei

**Controlul și interpretarea rezultatelor reacției.** Evaluarea rezultatelor  
obținute cu serurile și eritrocitele standard trebuie să corespundă, adică  
aglutinogenele și aglutininele constatate la cercetare aparțin aceluiași grup.  
Pot fi posibile 4 variante de rezultate ale reacției (tab. 56).

1. Reacția pozitivă a serului cercetat cu eritrocitele standard ale grupelor  
A și B indică prezența aglutininelor anti-A și anti-B, absența aglutino-  
genelor este marcată prin reacția negativă cu serurile standard izohe-  
maglutinante. Aceste fenomene sunt caracteristice grupei de sânge 0.
2. În cazurile când eritrocitele standard ale grupei B sunt aglutinate de  
serul cercetat, iar eritrocitele pacientului - de serurile standard izohe-  
maglutinante ale grupei 0 și B, grupa nativă de sânge este A.
3. Dacă cu ajutorul eritrocitelor standard se identifică aglutinina anti-A,  
iar cu serurile standard – aglutinogenul B, putem afirma că sângele  
cercetat aparține grupei B.
4. În caz că serul cercetat nu aglutinează eritrocitele standard ale celor trei  
grupe, iar cu ajutorul serurilor standard constatăm prezența aglutino-  
genelor A și B pe eritrocitele individului, atunci se prezumă prezența

grupeii de sânge AB. Pentru excluderea aglutinării nespecifice utilizăm serul de control al grupei AB. În cazul dat reacția va fi negativă.

### **Determinarea grupelor de sânge cu ajutorul anticorpilor monoclonali anti-A, anti-B și anti-AB**

Anticorpicii monoclonali sunt destinați pentru aprecierea grupelor sanguine în locul serurilor standard izohemaglutinante.

Testarea grupei sanguine se efectuează în sângele nativ cu și fără conservant, inclusiv și colectat din deget. Se utilizează metoda de hemaglutinare pe planșe. Pe planșă se indică numele, prenumele individului, simbolurile grupelor sanguine. Metodologia reacției cu anticorpi monoclonali este redată pe figura 16.

**Materialele necesare și condițiile de testare** sunt similare celor prezentate în compartimentul precedent, cu excepția utilizării reagenților cu anticorpi monoclonali.

**Tehnica de lucru.** Pe planșă se indică numele, prenumele celui investigat și specialitatea reactivelor, ulterior picurăm câte o picătură mare (0,1 ml) de reagenți cu anticorpi monoclonali anti-A, anti-B și anti-AB, alături aplicăm o picătură mică de sânge cercetat (0,03 ml), amestecăm picăturile cu baghete, omogenizăm conținutul picăturilor prin înclinarea planșei. În cazurile reacției pozitive constatăm o aglutinare a eritrocitelor după 3-6 sec, care sub formă de agregate roșii se adună rapid în aglutinate mari.






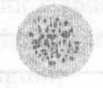






La reacția negativă picătura rămâne difuz colorată în roșu fără aglutinate, dar reacția se va urmări curs de 3 minute, fiind posibilă aglutinarea tardivă a eritrocitelor care conțin aglutinogene A și B slab exprimate.

**Controlul și interpretarea rezultatelor reacției.** Aprecierea și interpretarea rezultatelor reacției de hemaglutinare a eritrocitelor cu reagenții ce includ anticorpi monoclonali este redată în tab. 57.



În absența aglutinării cu anticorpicii monoclonali anti-A, anti-B și anti-AB se conchide lipsa aglutininogenelor A și B și apartenența sângelui cercetat la grupa 0.

Dacă s-a constatat hemaglutinarea cu anticorpicii monoclonali anti-A și anti-AB, se deduce prezența aglutinogenului A în eritrocite și deci apartenența sângelui cercetat la grupa A.

**Figura 16. Rezultatul reacției de hemaglutinare a hematiilor cu anticorpi monoclonali**

Reagenții monoclonali anti-eritrocitari			Grupul sanguin investigat
anti-A	Anti-B	anti-AB	
			0
			A
			B
			AB

**Notă:**

	Aglutinare absentă
	Aglutinare prezentă



**Interpretarea rezultatelor reacției de hemaglutinare  
cu reagenții monoclonali**

Rezultatul reacției cu anticorpii monoclonali			Apartenența de grup a sângelui cercetat
anti-A	anti-B	anti-AB	
-	-	-	0
+	-	+	A
-	+	+	B
+	+	+	AB

Aglutinarea eritrocitelor cu anticorpii monoclonali anti-B și anti-AB denotă prezența pe eritrocitele cercetate a aglutinogenului B și apartenența lor la sângele de grupul B.

Dacă eritrocitele aglutinează cu anticorpii monoclonali anti-A, anti-B și anti-AB, se constată prezența ambilor aglutinogeni (A și B) în eritrocitele cercetate și apartenența sângelui la grupa AB.

Pentru a exclude aglutinarea spontană nespecifică a eritrocitelor amestecăm o picătură mare de soluție fiziologică (0,1 ml) cu o picătură mică (0,01 ml) de sânge al pacientului. Absența aglutinării în această probă martor confirmă corectitudinea reacției. În cazul aglutinării spontane este necesară determinarea repetată a grupei sanguine, folosind eritrocitele pacientului după o spălare cu soluție fiziologică (centrifugare la 1500-2000 tur/min, curs de 5-10 min).

***Surse de erori.***

Cauzele diferitor erori în testarea grupei sanguine după sistemul AB0 pot fi de caracter divers: nerespectarea tehnicii reacției, calitatea insuficientă a ingredientilor utilizați și particularitățile individuale ale sângelui cercetat.

Printre cauzele erorilor tehnice mai frecvente se atestă:

- Marcarea incorectă a tuburilor cu sângele pentru cercetate de la diferiți indivizi;
- Amplasarea incorectă a serurilor izohemaglutinante sau anticorpilor monoclonali pe planșă, înregistrarea incorectă a rezultatelor testării;
- Nerespectarea tehnicii de cercetare:

- coraportul incorect al serului și eritrocitelor cercetate;
- utilizarea serurilor și reagenților cu termen expirat;
- reducerea termenului de monitorizare a reacției;
- efectuarea cercetării la temperatura de sub 15°C și de peste 25°C poate conduce la apariția reacției fals negative.

***Erorile definite de utilizarea reactivelor de calitate insuficientă:***

- aviditatea minoră a anticorpilor serurilor standard poate determina un rezultat fals negativ la identificarea aglutinogenelor și conchiderea incorectă despre apartenența de grup sanguin;
- spectrul redus al specificității anticorpilor anti-A al unor serii de reagenți monoclonali și seruri izohemaglutinante, care nu interacționează cu toate variantele antigenice A și definesc absența aglutinării cu unele mostre de eritrocite cercetate care conțin antigenul A.

***Erorile definite de particularitățile individuale ale antigenelor eritrocitare AB0:***

- cantitatea și amplasarea determinantelor antigenice pentru aglutinogenele A și B de pe eritrocitele diferitor indivizi variază, variantele lor reflectând astfel activitatea interacțiunii dintre eritrocite și anticorpii serurilor standard la testarea grupei sanguine;
- modificarea expresivității antigenice sau dispariția determinantelor antigenice eritrocitare (pacienții cu tumori și leucemie). Cauza posibilă a acestor modificări nu este elucidată complet, dereglarea sintezei transferazelor care asigură formarea determinantelor antigenice A și B ar avea un rol în acest proces.

***Rigorile ce se impun la testarea grupei sanguine:***

1. Utilizarea reagenților de calitate.
2. Recoltarea sângelui și aprecierea apartenenței de grup se efectuează dublu, operând de fiecare dată cu 2 serii de seruri sau anticorpi monoclonali.
3. Cercetarea trebuie realizată prin metoda încrucișată. Nu se admite utilizarea eritrocitelor A și B recoltate de la persoane sporadice, se utilizează numai eritrocite standard.
4. Utilizarea serului izohemaglutinant AB pentru controlul specificității reacției de aglutinare.

5. Sângele pentru cercetare se recoltează de la pacient până la hemotransfuzie, dat fiind faptul că transfuzia de sânge incompatibil sau a unui mare volum de componenți sanguini de la persoanele cu grupa 0 poate conduce la concluzii incorecte despre apartenența de grup sanguin.
6. Sângele pentru cercetare se recoltează până la transfuzia soluțiilor substituente de plasmă pentru excluderea erorilor induse de aglomerarea eritrocitelor în “stâlpușori numulari”.
7. Cercetarea atentă a diagnosticului pacientului.
8. Verificarea zilnică a calității reagenților utilizați cu înregistrarea rezultatelor.
9. Participarea în controlul extern al calității.

***Tactica aprecierii apartenenței de grup în cazurile aglutinării nespecifice și autoaglutinării:***

1. Testarea repetată a grupei sanguine cu utilizarea altor serii de eritrocite și seruri izohemaglutinante standard.
2. Aprecierea aglutinogenelor eritrocitare în hematiile spălate în prealabil cu soluție fiziologică.
3. Utilizarea obligatorie a serului standard AB.
4. Excluderea posibilității autoaglutinării.

Determinarea corectă a grupei sanguine atât la pacienți, cât și la donatori este una din verigele de suport în asigurarea securității și inofensivității transfuzionale.

## **INSTRUCȚIUNE** **pentru testarea apartenenței Rhesus**

Sistemul Rhesus conține 5 antigene eritrocitare: D, C, c, E, e, care pot fi testate prin utilizarea serurilor cu anticorpii respectivi. Antigenul "d", ipotetic, nu se apreciază. Există de asemenea și alte variante de antigene ale sistemului Rhesus: Dslab, Dvar., G etc. Frecvența înregistrării antigenelor sistemului Rhesus variază de la 30% până la 97,5% (D – 85%, C – 70%, c – 80%, E – 30%, e – 97,5%). Aceștia induc sinteza de anticorpi izoimuni. Imunogenitate majoră manifestă antigenul D, numit și factorul Rhesus. În 95% cazuri el este cauza maladiei hemolitice a nou-născuților la incompatibilitatea dintre mama-făt, precum și a complicațiilor posttransfuzionale severe. Persoanele care posedă antigenul D se referă la categoria Rhesus pozitiv, iar cei ce n-au acest antigen – la Rhesus negativ.

Diferite aranjamente ale antigenelor sistemului Rhesus formează 28 de grupe, dintre care 14 conțin factorul D (Rhesus-pozitivi), iar celelalte 14 nu conțin acest antigen, fiind Rhesus-negativi.

Testarea apartenenței Rhesus se efectuează de un medic cu o pregătire specială în domeniul izoimunologiei.

Pentru cercetarea recipienților se utilizează ser standard anti-D sau a reagentului cu anticorpi monoclonali anti-D cu evidențierea celor Rhesus-pozitivi (Rh+) și Rhesus-negativi (Rh-).

Spre deosebire de recipienți, testarea apartenenței de grup Rhesus la donatori se realizează în 2 etape: primar sângele donatorului se cercetează cu serul standard anti-D, ulterior cei care au demonstrat reacție negativă sunt cercetați suplimentar cu serurile standard anti-Rhesus, care conțin anticorpi anti-C, anti-E, -c, -e.

Anticorpii anti-C și anti-E pot fi prezenți în ser separat și în diverse combinații cu anticorpii anti-D, de exemplu: anti-D+C, anti-D+E sau anti-D+C+E. Donatorii Rhesus-negativi sunt cei care au dat rezultate negative cu toate serurile, adică nu conțin antigenele D, C, E.

Rezultatele examinării donatorului și sângelui donat se documentează în cartela donatorului, în fișa de evidență a rezultatelor examinărilor de laborator a sângelui donat cu indicarea datei și semnătura persoanei care a efectuat această examinare.

Rezultatele investigațiilor efectuate la bolnavi se vor documenta în fișa medicală a bolnavului cu indicarea datei și semnătura persoanei care a efectuat această examinare.

**Pregătirea prealabilă a reagenților.** Sângele pentru cercetare poate fi recoltat din deget sau venă. În ultimul caz se colectează în volum de 2-5 ml într-un tub marcat preventiv cu numele, prenumele celui investigat. Recoltarea materialului pentru investigație este posibilă cu sau fără utilizarea anticoagulantului. După coagularea sângelui pentru care nu s-a utilizat coagulant, la fundul tubului rămân eritrocite libere care ulterior sunt folosite pentru cercetare. La utilizarea soluției de 5% citrat de sodiu (0,25 ml la 1 ml sânge) eritrocitele, până la utilizare, se spală cu soluție fiziologică de 3 ori prin centrifugare la 1500-2000 tur/min, timp de 10 min. Pentru a putea opera cercetări ulterioare se admite păstrarea sângelui timp de 48-72 ore la temperatura 2-8°C. În perioada temperaturilor ridicate termenul de păstrare a sângelui pentru cercetare se reduce până la 24 ore.

Testarea apartenenței Rhesus se efectuează cu 2 serii diferite de seruri sau anticorpi monoclonali. Serul anti-Rhesus nu trebuie să conțină Ac anti-A, anti-B, indiferent de apartenența sângelui testat după sistemul AB0. Zilnic la fiecare testare este necesar un control al specificității și activității serului anti-Rhesus standard cu utilizarea eritrocitelor standard Rhesus-pozitive grup 0 sau de același grup sanguin după sistemul AB0 ca și sângele cercetat și eritrocitele standard Rhesus-negative. În prealabil eritrocitele sunt spălate cu soluție fiziologică până la absența urmelor de sânge în supernatant.

Din sedimentul de eritrocite spălate se pregătește o suspensie de 2%, pentru care se ia o picătură de eritrocite într-un tub marcat, care conține 49 picături de soluție fiziologică, se amestecă minuțios conținutul și se utilizează pentru cercetare.

Serurile standard anti-Rhesus pot conține anticorpi compleți și incompleți, care manifestă activitate diversă în anumite condiții, cea ce va defini și metoda de utilizare a serului standard (predestinația serului este indicată în instrucția de însoțire).

## Determinarea factorului Rhesus cu ser anti-Rhesus standard

Testarea factorului Rhesus se realizează în mediul salin și cu utilizarea gelatinei.

### Testul de aglutinare în mediul salin pentru determinarea factorului D cu ser anti-Rhesus standard

Testul de aglutinarea în mediu salin este eficient doar pentru investigarea serurilor ce conțin anticorpi anti-Rhesus compleți. Determinarea factorului Rhesus se efectuează cu două serii de ser anti-Rhesus standard, luându-se în considerație specificitatea de grup după sistemul AB0. Serul anti-Rhesus de grup 0 poate fi utilizat pentru determinarea factorului Rhesus în eritrocitele de grupul 0, serul de grupul A - pentru aprecierea factorului dat în hematiile grupelor 0 și A, serul anti-Rhesus de grupul B - pentru eritrocitele grupelor 0 și B, iar serul de grup AB - pentru determinarea factorului Rhesus în hematiile tuturor grupelor de sânge. Pentru controlul specificității și activității serului anti-Rhesus, ca martor sunt utilizate eritrocitele standard Rhesus-pozitive de grup 0 sau de grup identic cu grupul sanguin cercetat, precum eritrocite standard Rhesus-negative de grupul 0 sau de același grup cu sângele cercetat după sistemul AB0.

**Materiale necesare:** tuburi cu lungimea de 2-2,5 cm și diametrul de 0,5-0,6 cm, stative, 2 serii de ser standard anti-D cu anticorpi compleți, soluție fiziologică, sânge pentru cercetare, eritrocite standard Rh<sup>+</sup> și Rh<sup>-</sup> pentru control, termostat (37°C), centrifugă OPN-3, lupă 2-4× etc.

**Tehnica de lucru.** În stativ se montează 2 rânduri de tuburi (conform numărului de eritrocite pentru cercetare și câte 2 eprubete pentru proba martor). Stativul este acoperit cu o foaie de hârtie albă în care se fac găuri pentru instalarea tuburilor. Lângă fiecare pereche de tuburi pe hârtie se notează numele, prenumele individului cercetat. În toate tuburile primului rând se introduce câte 1 picătură de ser anti-Rhesus - prima serie, iar în tuburile din rândul doi - câte 1 picătură (0,1 ml) de ser anti-Rhesus - seria a doua. În toate tuburile perechi se adaugă câte o picătură de soluție fiziologică. În tuburile marcate corespunzător se introduce câte 1 picătură suspensie de 2% de eritrocite cercetate, iar în tuburile pentru control - câte 1 picătură suspensie de 2% eritrocite standard Rh<sup>+</sup> și Rh<sup>-</sup>. Conținutul tuburilor este

agitat minuțios, după care stativul va fi incubat în termostat la temperatura +37°C timp de o oră. După expirarea timpului de incubare tuburile pot fi lăsate la temperatura camerei pe 1,5-2 ore până la controlul rezultatelor.

**Controlul și interpretarea rezultatelor reacției** se efectuează cu ajutorul unei lupe la o sursă de lumină acoperită cu o sticlă mată. Se apreciază prezența sau absența aglutinării hematiilor ce se manifestă printr-un sediment de diferite forme. În cazul reacției pozitive sedimentul eritrocitar se repartizează într-un strat neuniform la fundul tubului, unde se disting structuri rugoase, spongioase, granulare. Marginea sedimentului este neregulată, uneori sunt suprapuse spre centru. În unele cazuri eritrocitele sunt amplasate în formă de coroană ondulantă, care spre partea centrală este mai pală. La reacția negativă sedimentul eritrocitar este prezentat printr-un strat uniform în formă de cerc cu marginile bine conturate. Diametrul acestuia la reacția negativă este întotdeauna mai mic decât la reacția pozitivă.

Eritrocitele care au fost aglutinate de anticorpii serului anti-Rhesus sunt apreciate ca Rhesus-pozitive, iar cele care n-au fost aglutinate cu acest ser sunt specificate ca Rhesus-negative. Ambele serii de ser anti-Rhesus trebuie să demonstreze rezultate identice. Probele martor confirmă specificitatea și activitatea serului anti-Rhesus, adică absența aglutinării cu hematiile Rhesus-negative standard ale grupului identic și prezența aglutinării cu eritrocitele Rhesus-pozitive de același grup sau de grupul 0.

În cazurile în care eritrocitele dau o reacție slab pronunțată, este necesară o cercetare suplimentară cu câteva serii de ser anti-Rhesus cu o activitate mai înaltă sau se utilizează o altă metodă. La determinarea factorului Rhesus la donatori este insuficientă diferențierea lor în Rhesus-pozitivi și Rhesus-negativi cu ajutorul serului anti-D. Sunt necesare cercetări suplimentare cu serurile anti-C și anti-E. Donatorii Rhesus-negativi sunt persoanele care au dat rezultat negativ cu toate serurile standard, adică eritrocitele lor nu conțin nici unul din antigenele enumerate. La utilizarea serurilor standard anti-C sau anti-E aglutinarea eritrocitelor indică prezența acestor antigene pe membrana hematiilor. Ca martor pozitiv se folosesc eritrocite standard care conțin respectivele antigene: C și/sau E.

**Controlul specificității.** Pentru realizarea controlului de specificitate și activitate în fiecare serie de eritrocite se vor include eritrocite de grupul 0 Rhesus-pozitiv și Rhesus-negativ standard.

## Testarea apartenenței Rhesus în reacția cu gelatină

**Principiul metodei.** Reacția de conglutinare cu gelatină este relevantă în cazul serurilor standard care conțin anticorpi anti-Rhesus incompleți. Determinarea factorului Rhesus se efectuează cu 2 serii de seruri anti-Rhesus standard. În acest caz se ține cont de specificitatea de grup a serului anti-Rhesus după sistemul AB0. Cu ajutorul serului anti-Rhesus grupa 0 se determină factorul Rhesus numai în eritrocitele de grupa 0, cu serul anti-Rhesus grupa A se determină factorul Rhesus numai în eritrocitele grupelor 0 și A, cu serul anti-Rhesus de grupa B se apreciază factorul Rhesus numai în eritrocitele grupelor 0 și B și cu serul anti-Rhesus grupa AB și cu cea "universală" se cercetează eritrocitele grupei AB și ale altor grupe. Ca martor se utilizează hematii standard Rhesus-pozitive de grup 0 sau de grupul corespondent celui cercetat și eritrocite standard Rhesus-negative, obligativ de grupa 0 sau identică sângelui cercetat.

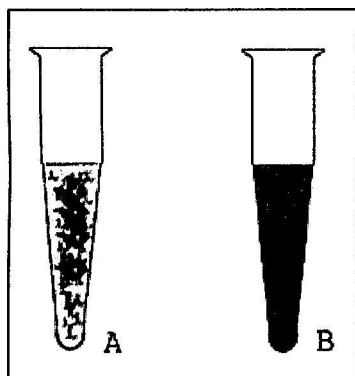
**Materiale necesare:** tuburi pentru centrifugare (10 ml), stative, sânge de examinat, hematii Rhesus-pozitive și Rhesus-negative standard, gelatină (10%), termostat sau baie de apă (46-48°C), ser anti-Rhesus (2 serii), baie de apă, soluție fiziologică (0,9%), lupă 2-4x, etc.

**Tehnica de lucru.** Într-un stativ se instalează trei rânduri de tuburi de centrifugare cu volumul de 10 ml (în fiecare rând, conform numărului de probe cercetate, și câte 2 eprubete suplimentar pentru martor). Se notează numele, prenumele pe toate 3 tuburi. În eprubetele se introduce câte o picătură (0,05 ml) de eritrocite pentru cercetare, iar în 3 eprubete pentru control câte o picătură (0,05 ml) de eritrocite Rhesus-pozitive standard, iar în celelalte 2 eprubete pentru control câte o picătură (0,05 ml) de eritrocite Rhesus-negative standard. În toate eprubetele adăugăm câte 2 picături (0,1 ml) soluție de 10% gelatină încălzită în prealabil la termobaie cu temperatura 40-48°C. În eprubetele din primul rând adăugăm câte 2 picături (0,1 ml) de ser anti-Rhesus - prima serie, iar în tuburile din rândul doi câte 2 picături (0,1 ml) de ser anti-Rhesus - seria a doua. Rândul trei este martor pentru o eventuală autoaglutinare. Conținutul tuburilor se agită, apoi se incubează în baia de apă la temperatura 46°C-48°C timp de 15 min sau în termostat la aceeași temperatură curs de 25-30 min. După expirarea incubării în eprubete se adaugă câte 8-10 ml soluție fiziologică și se agită prin rotirea tuburilor de 1-2 ori.



**Controlul și interpretarea rezultatelor.** Eprubetele se cercetează cu ochiul liber sau cu lupa (2-4x) și se constată prezența sau absența aglutinării eritrocitelor. În caz de reacție pozitivă aglutinatele apar sub formă de grăunțioare sau fulgi la fundul lichidului transparent și practic incolor fig.14.

**Figura 17. Aprecierea rezultatelor testării factorului Rhesus în proba cu gelatina**



*A* – rezultat pozitiv  
*B* – rezultat negativ

În cazul reacției negative lichidul este opalescent și colorat difuz în roz. Eritrocitele care au fost aglutinate de serul anti-D sunt apreciate ca Rhesus-pozitive, iar cele care n-au fost aglutinate cu același ser sunt Rhesus-negative. Rezultatele trebuie să fie identice cu ambele serii de ser anti-Rhesus, iar martorul trebuie să confirme specificitatea și activitatea serului anti-Rhesus, adică absența aglutinării cu hematiile Rhesus-negative standard de același grup și prezența aglutinării cu hematiile Rhesus-pozitive standard de același grup. În tuburile rândului trei (martor) nu trebuie să fie prezentă aglutinarea.

Prezența aglutinării în tuburile din rândul trei semnifică rezultatele false ale reacției și rezultatul pozitiv cu serul anti-D nu poate fi luat în considerație. În acest caz se recomandă spălarea eritrocitelor cercetate cu soluție fiziologică caldă pentru eluția autoanticorpilor și repetarea ulterioară a testului. În caz dubios se utilizează metoda aglutinării în mediul salin folosind serurile anti-Rhesus care conțin anticorpi compleți.

**Controlul specificității.** Pentru efectuarea controlului de specificitate și activitate în fiecare serie de eritrocite se vor include eritrocite de grup 0 Rhesus-pozitiv standard și Rhesus-negativ standard.

## **Testul de aglutinare cu reagenți monoclonali anti-Rhesus care conțin anticorpi compleți**

**Principiul reacției.** Este destinat pentru aprecierea antigenelor sistemului Rhesus: D, C, E cu utilizarea reagenților monoclonali anti-D, -C, -E standard.

**Tehnica de lucru** este una obișnuită. Pe placă picurăm câte o picătură mare (0,1 ml) de anticorpi anti-D (C și E), alături aplicăm o picătură mică de sânge (0,01 ml), amestecăm picăturile, omogenizăm (2 min). În caz de reacție pozitivă constatăm aglutinarea eritrocitelor, care sub formă de agregate roșii, se adună rapid în aglutinate mari. În cazul reacției negative amestecul rămâne difuz colorat în roșu, fără semne de aglutinare. Monitorizarea reacției se efectuează timp de 3 min, considerând posibilitatea aglutinării tardive a eritrocitelor.

**Controlul și interpretarea rezultatelor reacției.** În cazurile în care nu se constată aglutinarea cu anticorpii anti-D (C și E) putem afirma absența antigenului D (C și E) din sângele cercetat. Dacă aglutinarea apare cu anticorpii monoclonali anti-D (C și E), se constată prezența antigenului D (C și E) în sângele cercetat.

**Controlul specificității.** Pentru efectuarea controlului de specificitate și activitate, în fiecare serie de eritrocite se vor include eritrocite de grupa 0 Rhesus-pozitiv standard și Rhesus-negativ standard.

**Surse de erori.** La testarea factorului Rhesus pot avea loc rezultate fals-pozitive și fals-negative.

**Cauzele rezultatelor fals-pozitive:**

- Utilizarea incorectă a altui reagent;
- Serul conține anticorpi de altă specificitate;
- Coraportul picăturilor este incorect (o picătură prea mare de sânge);
- Pe eritrocitele cercetate sunt fixați anticorpi;
- Eritrocitele cercetate posedă capacitatea de poliaglutinare;
- Utilizarea serurilor cu termen expirat;

- Temperatura încăperii unde se efectuează reacția nu corespunde celei optime (+15-25°C),
- Nerespectarea termenului de monitorizare a reacției;

***Cauzele rezultatelor fals-negative:***

- Utilizarea incorectă a altui reagent;
- Calitatea insuficientă a reagenților standard;
- Maladii ce asociază diminuarea activității antigenice;
- Absența anticorpilor în tuburi;
- Agitarea prea intensivă a tuburilor;
- Utilizarea reagenților standard cu termen expirat de valabilitate;
- Nerespectarea regimului termic;
- Nerespectarea regimului de monitorizare a reacției.

## **INSTRUCȚIUNE** **pentru determinarea anticorpilor imuni** **după sistemul AB0**

Anticorpii imuni apar prin imunizare (transfuzii de sânge incompatibil după grupul sanguin AB0 și la gravide). La femeile gravide heterospecificitatea devine cauza maladiei hemolitice a fătului. - anticorpii imuni anti-A sau anti-B sunt prezenți permanent în sângele mamei la momentul nașterii copilului. De obicei anticorpii anti-A și anti-B sunt de titru înalt;

La transfuzia sângelui incompatibil după grupul sanguin anticorpii imuni anti -A și anti - B apar de obicei către a 5-7-a zi și ajung la titre maxime la a 15-25-a zi.

Anticorpii imuni anti -A și anti -B pot apare sub formă de anticorpi compleți și incompleți. Ei sunt activi la t 37°C, dar pot deveni mai activi (în titre mai crescute) dacă se aplică metoda de reacție în mediu salin. Ei se pot determina și în proba indirectă Coombs.

Anticorpii imuni sunt activi și rezistenți la încălzirea serului de până la t+70° C pe parcursul a 10 min. Cele mai demonstrative diferențieri dintre anticorpii normali (naturali) de cei imuni anti-A și anti-B se prezintă de comportamentul lor la acțiunea temperaturii înalte.

### **Determinarea anticorpilor imuni după sistemul AB0**

**Principiul reacției.** Aglutinarea eritrocitelor asupra cărora acționează anticorpii antieritocitari imuni se manifestă prin formarea de hemoaglutinate - grunji distinși cu ochiul liber. Reacția se desfășoară în soluție fiziologică, care se folosește pentru determinarea grupelor de sânge.

**Materiale necesare:** plăci cu godeuri din sticlă, metal, ceramică sau material plastic, pipete, baghete de sticlă, soluție fiziologică, eritrocitele standard de grupele A, B, timer, eprubete de 2-2,5 cm înălțime și cu fund rotund, termostat, baie de apă, centrifugă, stative etc.

**Tehnica de lucru.** Eritrocitele standard ale grupelor A și B sunt spălate de 2 ori cu soluție fiziologică de NaCl (0,9%) prin centrifugare la 1000 tur./min timp de 10 min, după care din sediment se prepară o suspensie de 2%. Serul de cercetat, în volum de 0,5-1ml, este diluat de 4 ori cu soluție

de 0,9% NaCl pentru a evita coagularea la încălzire; volumul obținut este repartizat egal în 2 tuburi: unul dintre acestea va fi încălzit la  $t$  70°C timp de 10 min. astfel avem ser nativ și ser încălzit, fiecare fiind diluat 1:4.

La cercetarea serului de grup A sau B în stativ se montează un șir de eprubete mici (12 buc), ale serului de grup 0 – două rânduri a câte 12 tuburi. Stativul este acoperit cu o foaie de hârtie în care se fac găuri pentru instalarea tuburilor. Pe hârtie se notează numele, prenumele și grupul sanguin al individului cercetat, grupul eritrocitelor standard și la fiecare tub – diluția serului în tub (1:4, 1:8, 1:16 etc. până la 1:8000). În toate tuburile fiecărui rând, începând cu al doilea, introducem 2 picături de soluție izotonică NaCl. După aceea în prima și a doua eprubetă ale fiecărui rând turnăm câte 2 picături de ser nativ cu diluția 1:4. În tubul 2 al fiecărui rând serul este amestecat cu soluție izotonică de NaCl, apoi 2 picături ale acestui amestec sunt transferate în al treilea tub, iar din al treilea după agitare – în patrulea etc. până la ultimul, din care eliminăm 2 picături. Astfel în tuburi am obținut diluții ale serului de la 1:4 până la 1:8000.

Pe un alt stativ sunt pregătite identic diluțiile serului încălzit (de regulă sunt suficiente 6 tuburi). În diluțiile serului din toate tuburile se adaugă câte o picătură din suspensia de 2% eritrocite de grup opuse standard: în cazul serului de grup B se folosesc eritrocitele A, în cazul serului de grup A – eritrocite B, iar în cazul serului de grup 0 într-un șir de eprubete se adaugă eritrocite de A, iar în alt șir de eprubete – eritrocite de grup B. Conținutul tuburilor este agitat după ce stativele sunt lăsate în repaus de 1 oră: cele cu ser nativ la  $t$  camerei, iar cele cu ser încălzit – la 37 °C timp de 1 oră.

Controlul rezultatelor este efectuat cu o lupă (6-8x) de asupra unei surse de lumină. În cazul reacției pozitive sedimentul apare sub aspect de ghemuri, neuniform, cu margini îndoite, uneori rulate spre interior. În reacția negativă sedimentul eritrocitar este repartizat uniform, la fundul tubului, în formă de cerc bine conturat. Prezența aglutinării semnifică existența Ac compleți, iar ultima diluție în care se constată – este titrul ei.

Titrul Ac în serul nativ se referă la aglutininele naturale anti-A și anti-B, titrul Ac în serul încălzit – la Ac imuni anti-A sau anti-B. În caz de reacție pozitivă în toate tuburile, examenul trebuie repetat cu diluarea ulterioară a serului. Rezultatul negativ în toate tuburile cu ser încălzit semnifică absența Ac imuni compleți.

## Determinarea anticorpilor incompleți prin testul Coombs indirect

La cercetarea serului de grup A și B în stativ se montează 6 eprubete: la cercetarea serului de grup 0 - 2 rânduri de eprubete câte 6 la număr. Eprubetele se numerotează. În prealabil stativul se acoperă cu o foaie de hârtie curată, unde se vor marca inițialele și grupul de sânge a indivizilor cercetați. În toate eprubetele, începând cu nr. 2, se picură câte 3 picături de soluție de NaCl 0,9%, apoi în eprubeta nr. 1 și nr. 2 - câte 3 picături de ser cercetat prealabil încălzit după care urmează diluarea lui, la fel cum se realizează în metoda salină, dar în volumul a trei picături.

În toate eprubetele cu pipeta se adaugă câte o picătură mică (0,01 ml) eritrocite de grup advers. Se amestecă serul cu eritrocite și stativul se introduce în termostat pentru 45 min la  $t+37^{\circ}\text{C}$ . Aceste condiții permit fixarea anticorpilor imuni de eritrocite. După incubare în eprubete se adaugă soluție de NaCl 0,9% până la 2/3 din eprubetă. Eritrocitele se amestecă și se pun la centrifugare, după care se separă lichidul supernatant. Procedura de spălare se repetă de 3 ori (folosind eprubete de 10 ml este suficientă dubla spălare).

După spălare în fiecare eprubetă se adaugă câte 3-5 picături de soluție NaCl de 0,9% pentru a se obține suspensie de eritrocite de 5%, din care ulterior se va separa câte o picătură ce se trece pe o placă albă. În fiecare picătură se adaugă câte o picătură de ser pentru proba Coombs și se amestecă cu bagheta de sticlă. Se urmărește rezultatul pe parcursul a 10 min, agitând periodic placa.

**Controlul reacției.** Se apreciază rezultatul după prezența sau absența aglutinării, care se observă cu ochiul liber. Rezultatele se înscriu pe hârtia de lângă fiecare eprubetă cu semnul plus (+) sau minus (-). Prezența aglutinării anunță prezența anticorpilor imuni incompleți, dar ultima diluție ne indică titrul acestora. În cazul când aglutinarea se observă în toate eprubetele, cercetarea se va repeta, iar diluțiile se vor continua. Un rezultat negativ în toate eprubetele certifică lipsa anticorpilor imuni în formă incompletă în serurile cercetate.

**Interpretarea rezultatelor.** La descrierea rezultatelor cercetărilor se determină trei forme de 3 anticorpi:

- anticorpi normali compleți – aglutininele termolabile;
- anticorpi imuni compleți – anti-A și anti-B termostabili;
- anticorpi normali incompleți – anti-A și anti-B termostabili

Rezultatul final se deduce după aprecierea rezultatelor tuturor cercetărilor:

- a) prezența anticorpilor imuni (termostabili) compleți sau incompleți denotă pătrunderea în organismul uman a antigenelor incompatibile după sistemul AB0. Titrul acestor anticorpi de obicei este mai mic decât al celor normali (naturali) și foarte rar aceștia ating indicatorul 1:8 pentru anticorpii imuni compleți și de 1:32 - pentru anticorpii imuni incompleți;
- b) prezența anticorpilor naturali compleți (de la 1:128 și mai mult în această metodă de cercetare) și lipsa anticorpilor imuni incompleți (termostabili) la momentul cercetării demonstrează starea de sensibilizare față de antigenele sistemului AB0 în organismul individului cercetat;
- c) lipsa anticorpilor imuni (termostabili) anti-A și anti-B la titrele de anticorpi normali compleți (de maximum 1:128 prin această metodă de cercetare) ne demonstrează că organismul individului la momentul cercetării nu prezintă starea de izoimunizare cu antigenele sistemului AB0.

## INSTRUCȚIUNEA

### cu privire la determinarea anticorpilor anti - Rhesus în serul uman

Anticorpii anti-Rhesus se referă la anticorpi imuni și apar în sângele persoanelor cu Rhesus apartenență negativă, numai în condiții care contribuie la formarea anticorpilor: inocularea sângelui Rh+ persoanei cu Rhesus apartenență negativă sau la gravide cu Rhesus apartenență negativă și făt Rhesus pozitiv.

Determinarea anticorpilor anti-Rhesus concomitent cu determinarea Rhesus apartenenței bolnavului și donatorului se efectuează pentru prevenirea transfuziei de sânge incompatibil după sistemul Rhesus și pentru a diagnostica boala hemolitică la nou-născuți.

Determinarea anticorpilor anti-Rhesus se efectuează și la prepararea materialului pentru pregătirea serului anti-Rhesus.

Deosebim anticorpii anti-Rhesus

1. După specificitate: *anti D, anti C, anti c, anti E și anti e.*
2. După formă: *compleți și incompleți.*

Specificitatea anticorpilor se testează cu unul din antigenii Rhesus, cu care reacționează. Forma anticorpului se depistează prin modul de interacțiune cu eritrocitele, ce conțin antigenul Rhesus specific.

Anticorpii compleți reacționează cu antigenul Rhesus al eritrocitelor, generând aglutinarea acestor eritrocite în reacția salină.

Anticorpii incompleți în aceste condiții numai sensibilizează eritrocitele, dar nu le aglutinează, această reacție nefiind vizibilă. Pentru aprecierea reacției între anticorpii Rhesus incompleți și eritrocite sunt necesare anumite condiții sau utilizarea serului antiglobulinic Coombs.

Diferite metode de determinare a anticorpilor anti-Rhesus necesită diferite condiții de temperaturi optime.

### **Metoda de apreciere a anticorpilor anti-Rhesus incompleți în ser cu folosirea gelatinei**

*Principiul metodei* este bazat pe aglutinarea eritrocitelor Rhesus pozitive de către Ac incompleți anti-Rhesus în mediul coloidal. Testul este folosit pentru identificarea Ac incompleți anti-Rhesus și la aprecierea titrului lor în serul pentru cercetare.



**Recoltarea sângelui** se poate realiza cu 2-3 zile înainte de cercetare în volum de 1-3 ml. Tuburile sunt numerotate cu indicarea numelui, prenumelui a grupei și apartenenței Rhesus. Eritrocitele de la fundul tubului sunt folosite pentru cercetare; dacă cantitatea lor este insuficientă, atunci e posibilă agitarea coagulatului pentru obținerea unei cantități suplimentare de eritrocite. Sângele poate fi recoltat și cu citrat de sodiu, dar în acest caz eritrocitele trebuie în prealabil spălate cu soluție fiziologică.

**Materialele necesare:** tuburi cu înălțimea de 2-2,5 cm și diametrul de 0,5-0,6 cm, stative, soluție fiziologică, sânge de cercetat, eritrocite standard Rhesus pozitive și Rhesus negative, termostat, centrifuga etc.

**Tehnica de lucru.** În stativ se instalează un șir de eprubete numerotate conform numărului tipurilor de eritrocite cu care va fi controlat serul pentru cercetare. În eprubete se introduce câte o picătură (0,05 ml) de eritrocite standard, câte 2 picături (0,1 ml) de gelatină (10%) care în prealabil a fost încălzită la temperatura de +46°C +48°C. Dacă soluția de gelatină este tulbure sau conține fulgi, sau pierde capacitatea de a se încheaga la temperatura de +4°C +8°C, ea nu poate fi folosită în cercetare. În toate tuburile se introduc câte 2 picături (0,1 ml) ser de cercetat, apoi tuburile se agită pentru amestecul conținutului și sunt incubate în baia de apă la temperatura de + 46-48°C timp de 10 minute sau în termostat timp de 45 minute. După aceasta în tuburi se introduc câte 5-8 ml soluție izotonică de NaCl. Conținutul se agită prin rotirea lor (1-2 ori).

**Rezultatul** se verifică după prezenta sau absența aglutinării eritrocitelor cu ochiul liber sau cu ajutorul lupei (2x).

Prezența aglutinării în tuburile cu eritrocitele Rhesus pozitive și absența în cele cu eritrocitele Rhesus negative și proprii indică prezența anticorpilor incompleți anti-Rhesus în serul cercetat.

Absența aglutinării cu toate felurile de eritrocite indică că anticorpii incompleți anti-D, C și E, de asemenea anti-c și anti-e n-au fost evidențiați.

## Titrare serului care conține anticorpi incompleți anti-Rhesus

În stativ sunt instalate 10 eprubete cu notarea diluției 1:2; 1:4; 1:8 etc. până la 1:1024, în care introducem câte 2 picături (0,1 ml) de soluție fiziologică. În primul tub introducem 2 picături (0,1 ml) ser de cercetat și după agitare transferăm 2 picături în al doilea tub, din al doilea în al treilea și așa mai departe până la ultimul tub din care aruncăm 2 picături. Astfel în tuburi obținem diluția serului de la 1:2 până la 1:1024. În toate tuburile adăugăm câte o picătură (0,05 ml) de amestec de eritrocite obținute de la 4-5 donatori Rhesus pozitivi și preparate după cum a fost expus mai sus, câte 2 picături (0,1 ml) de gelatină (10%) în prealabil încălzită până la fluidificare în apă caldă la temperatura de +46-48°C. Tuburile se agită și apoi se incubează în baia de apă la  $t$  45-48 °C timp de 10 minute sau în termostat timp de 45 minute. După aceasta în tuburi se adaugă câte 5-8 ml soluție fiziologică și se urmărește rezultatul reacției. Ultima diluție în care se observă aglutinarea este considerată ca titru al Ac incompleți anti-Rhesus identificați. Dacă se observă aglutinarea eritrocitelor în toate diluțiile serului, atunci titrul anticorpilor anti-Rhesus este mai mare de 1:1024. În acest caz cercetarea se repetă cu diluția serului în continuare.

**Testul Coombs indirect** este de asemenea utilizat pentru detecția Ac anti-Rh incompleți în serul de cercetat.

**Materiale necesare:** ser de cercetat, eritrocite standard de grup AB0 și Rh cunoscut (2 probe cu Rh- și 3 probe cu Rh+, ser antiglobulinic, soluție de Na Cl de 0,9%, eprubete, pipete Pasteur, centrifugă, termostat, stative etc. Eritrocitele standard sunt spălate de 3 ori cu o soluție fiziologică prin centrifugarea la 1000 tur/min timp de 10 min.

**Tehnica de lucru.** Într-un șir de tuburi numerotate se introduc câte 6 picături din serul de cercetat, la care se adaugă câte 1-2 picături din o suspensie standard (50-100%), în cele de cercetare – eritrocite Rh+ în cel mar-tor – eritrocite Rh-. Eprubetele se agită și sunt apoi incubate la 37 °C timp de 45 min. Dacă în serul de cercetat sunt Ac anti-Rh incompleți, atunci ei se vor fixa pe eritrocitele Rh+. După incubare în tuburi se adaugă soluție fiziologică (2/3 de tub); conținutul este amestecat și centrifugat de 3 ori la 1000tur/min timp de 10 min. Din sedimentul eritrocitelor se prepară o suspensie de 5% eritrocite cu soluție fiziologică care este utilizată ulterior în

reacție. O picătură din suspensia pregătită din fiecare tub este transferată pe o lamă de porțelan alb și la fiecare picătură se adaugă câte 1 picătură de ser antiglobulinic. Picăturile se amestecă cu o baghetă de sticlă; lama este agitată prin înclinări repetate, urmărindu-se timp de 20 min.

**Controlul reacției.** Prezența aglutinării în picăturile cu eritrocitele Rh+, absența ei la cele Rh- și eritrocitele proprii indică prezența Ac anti-Rh incompleți în serul de cercetat.

Aglutinarea are loc de obicei în primele 30-60 secunde, dar la un titru mic de anticorpi anti-Rh aceasta poate apare mult mai târziu. Absența aglutinării cu toate tipurile de eritrocite utilizate denotă lipsa Ac anti-Rh incompleți în serul cercetat.

**Fenomenul de „zonă”.** Utilizarea serurilor native sau a celor cu concentrații mari de Ac, dar insuficient diluate, poate să nu dea aglutinare cu eritrocitele Rh+. Pentru excluderea fenomenului de „zonă” serul trebuie diluat 1:18 sau 1:16, iar uneori și mai mult. În aceste diluții Ac anti-Rh devin activi și aglutinează eritrocitele Rh+.

#### **Surse de erori:**

- Prezența Ac compleți în ser (în cazul dat vom avea aglutinare în proba martor);
- Infectarea serului;
- Prezența urmelor de soluții de coloizi, a sărurilor de siliciu, care apar după frecarea puternică a suprafețelor de sticlă sau a tuburilor rău prelucrate;
- Contaminarea soluției fiziologice cu ioni de metale grele;
- Raportul necorespunzător dintre ser și eritrocite;
- Păstrarea îndelungată a hematiilor;
- Neglijarea perioadei de incubație.

## BIBLIOGRAFIE

1. **Andrieș Lucia, Olinescu A.** Compendiu de imunologie fundamentală. Chișinău, „Știința”, 1993, 463p.
2. **Austree D.J.** Blood-group active surface molecules on the human red blood cell. // *Vox Sang.* 1990, 58:1-20.
3. **Daniels G.L., Austre D.J., Dahr W. et al.** Blood Group Terminology 1995. ISBT working party on terminology for red cell surface antigens. // *Vox.Sang.* 1995, 69:265-79.
4. **Klein H.G.** Standards for blood banks and transfusion services, 17-th ed. Bethesda, MD:American Association of Blood Banks, 1996.
5. **Moulds J.M., Fawcett K.J., Garner R.J.** Scientific and technical aspects of the major histocompatibility complex. Arlington, VA: American Association of Blood Banks, 1989
6. **Olinescu A., Andrieș L.** Tehnici imunologice. Chișinău, „Știința”, 1994, 318 p.
7. **Pereșianu D., Saragea M.** Imunologia în teoria și practica medicinei. vol II. București, 1998, editura „B.I.C. ALL”, 1799 p.
8. Technical manual American Association of Blood Banks, 12-th edition, Maryland, 2000, 1055 p.
9. **Yamamoto F.L.** Review: Recent progress in the molecular genetic study of the histo-blood group ABO system. *Immunohematology*, 1994, 10:1-7.
10. Иммуносерология (нормативные документы). Москва, 1998, 184 с.
11. **Козинец Г.И., Макарова В.А.** Исследование системы крови в клинической практике. Москва, изд-во “Триада-Х”, 1998, 480 с.
12. **Рагимов А.А., Дашкова Н.Г.** Трансфузионная иммунология. МИА. Москва, 2004, 279 с.