

КРЪСТОСАНА СЪВМЕСТИМОСТ (КРОСМАЧ РЕАКЦИЯ) МИКРОИМУНОЕНЗИМЕН МЕТОД; ТВЪРДОФАЗОВ МЕТОД

Д-р Жанина Йорданова Иванова дм,



Основни принципи

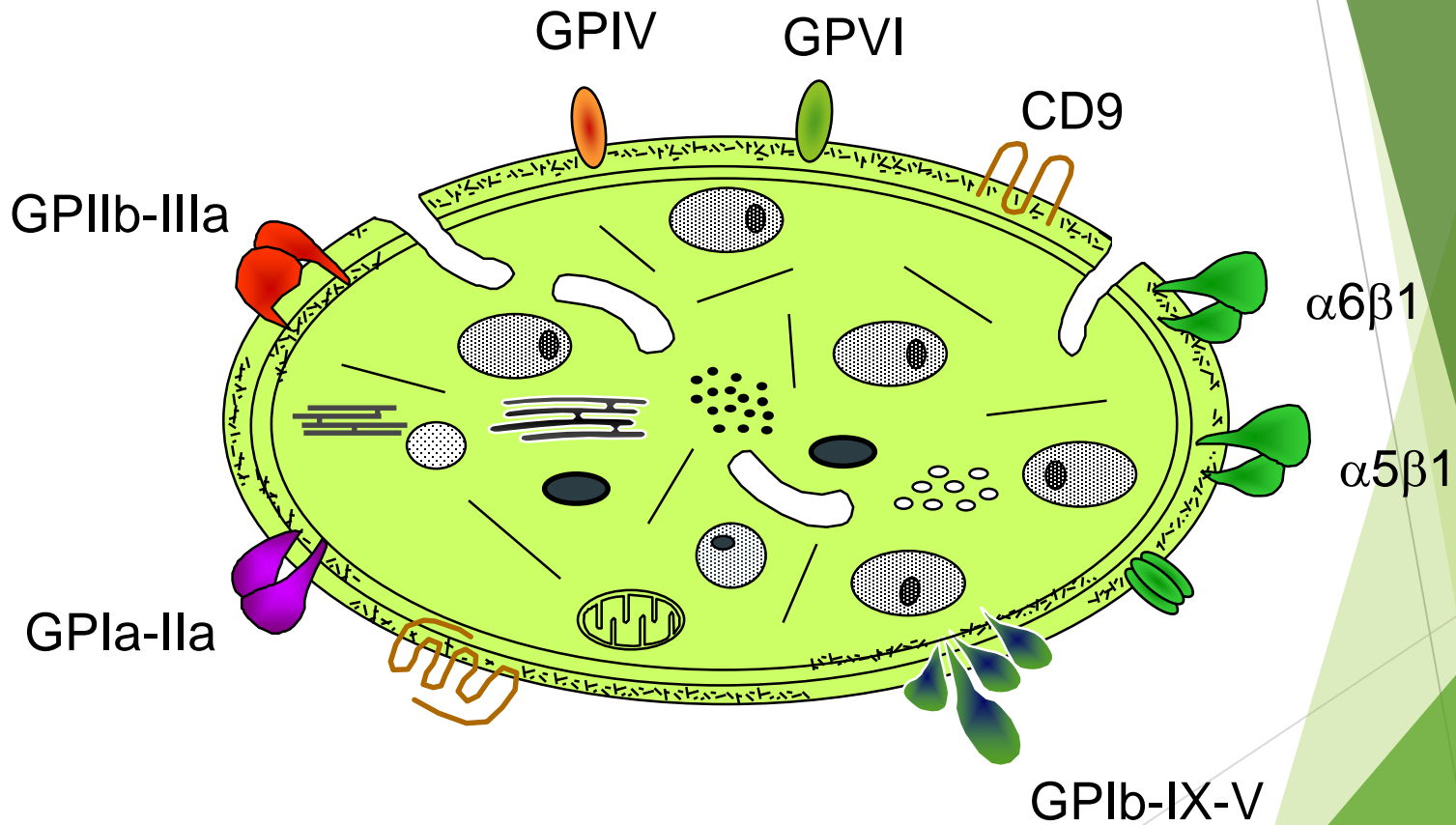
- ▶ Тромбоцитни антигени:
 - ▶ общи и специфични
 - ▶ номенклатура на специфичните алоантигени
 - ▶ разпространение
 - ▶ структура
- ▶ Тромбоцитни алоантитела:
 - ▶ при трансфузии и
 - ▶ при бременност

Тромбоцитни алоантигени

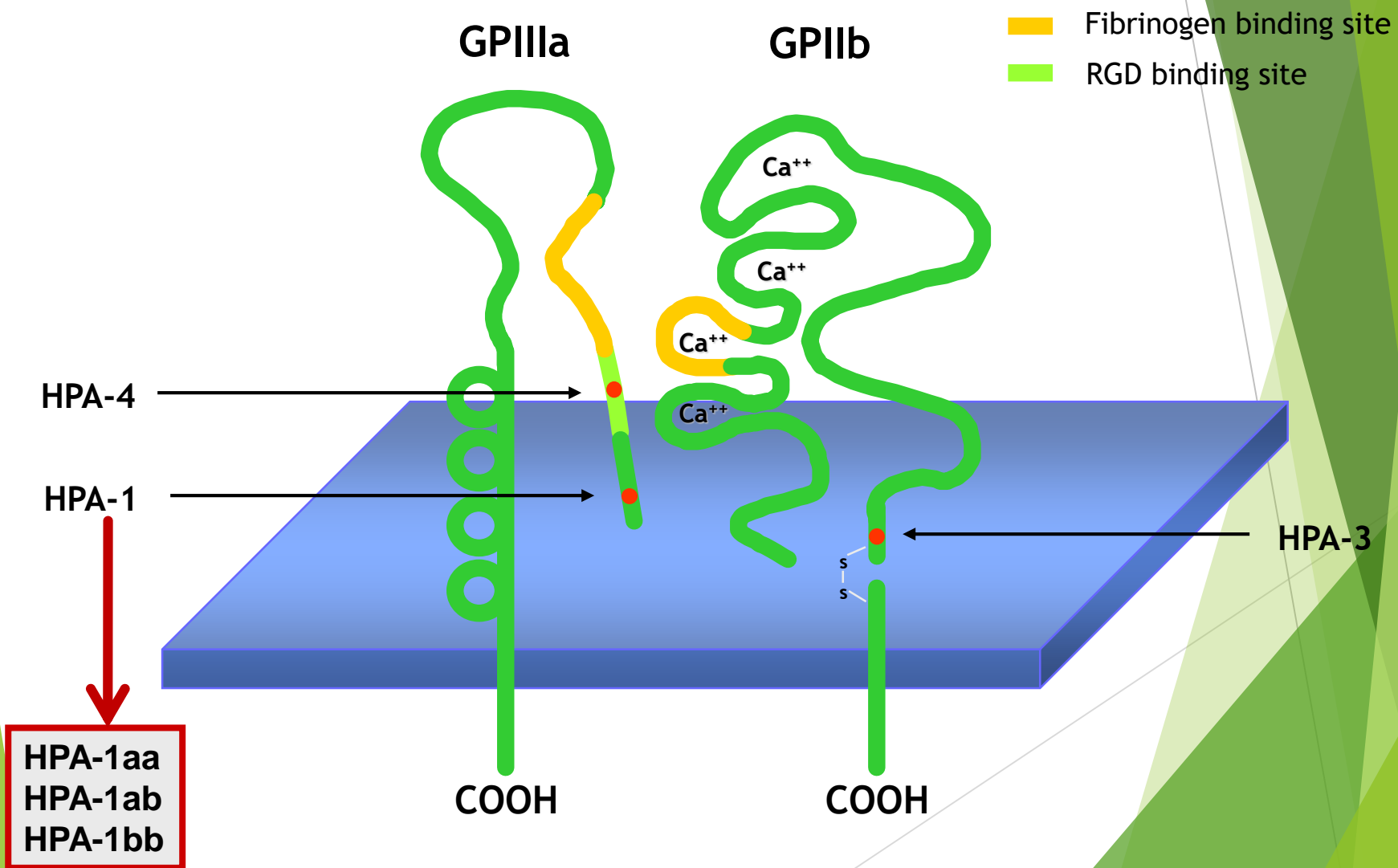
Две различни категории клинично значими тромбоцитни алоантигени:

1. « Общи алоантигени» - върху тромбоцитите и други кръвни клетки или тъкани (т.е. ABO система и HLA клас I антигени)
2. « Специфични тромбоцитни антигени» = HPA (Human Platelet Antigen) - изключително върху тромбоцитите

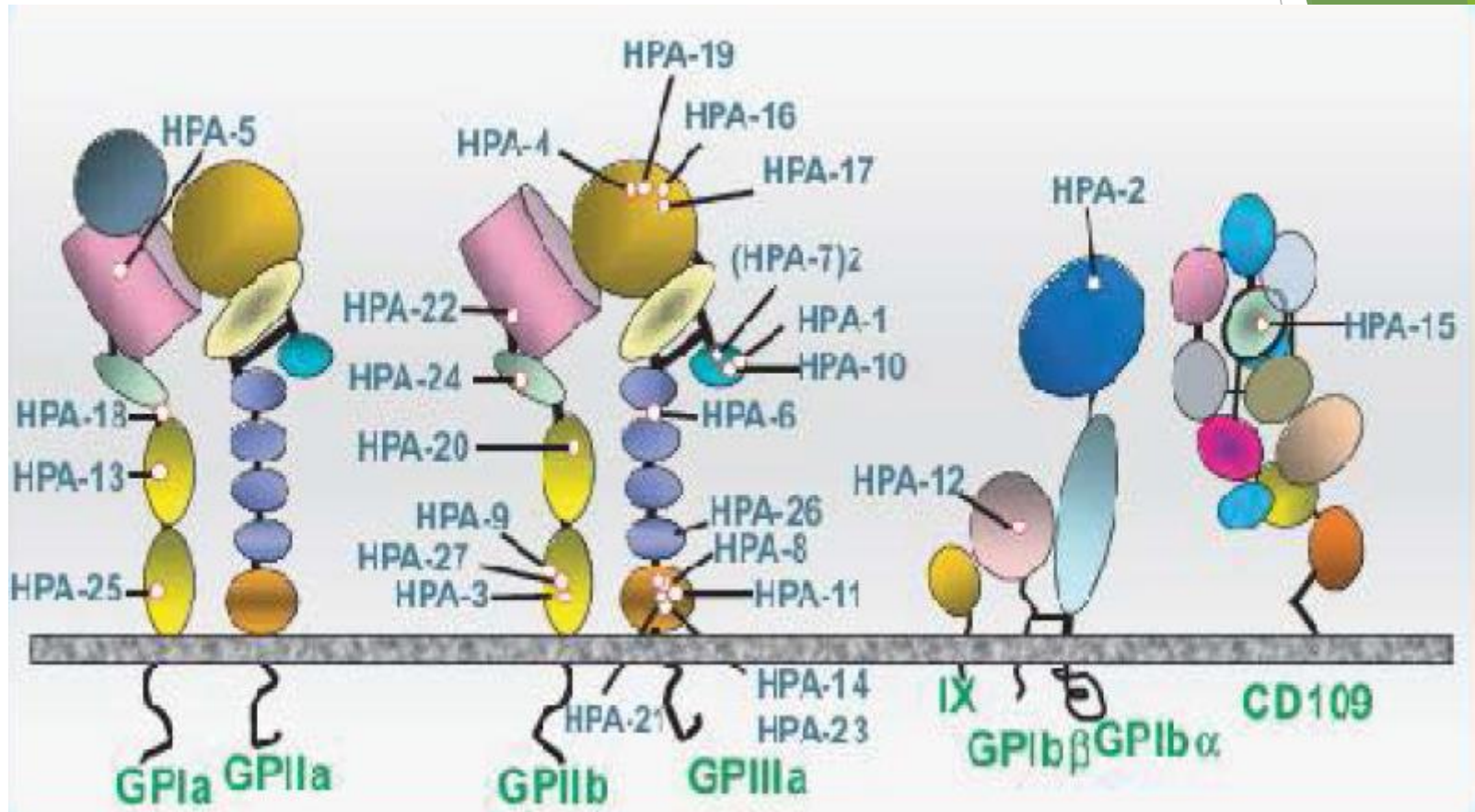
Тромбоцитна мембрана/ гликопротеини



Мембранни гликопротеини GPIIb-IIIa



Структура: HPA / Гликопротеины



Алоимунна тромбоцитопения

Тромбоцитните алоантитела са отговорни за:

- **NAIT** - неонатална алоимунна тромбоцитопения
- **PTP** - посттрансфузионна пурпура
- **PAIT** - пасивна алоимунна тромбоцитопения
- **TAIT** - свързана с трансплантация алоимунна тромбоцитопения

Тромбоцитните алоантитела могат да предизвикат:

- **PTR** - рефрактерност към тромбоцитни трансфузии

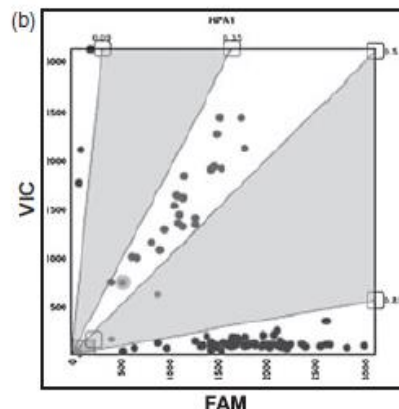
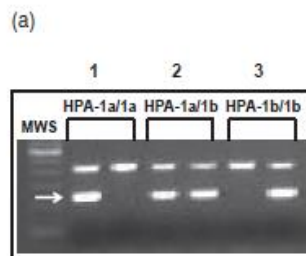
Методи на изследване

Тромбоцитни антигени

- ▶ Флоуцитометрия
- ▶ Имуноензимен метод (ELISA)
- ▶ ДНК типизиране (генотипизиране)

Тромбоцитни антитела

- ▶ Имунофлуоресцентен тест
- ▶ Имуноензимен тест (МАІРА - monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens)



КРОСМАЧ РЕАКЦИЯ

Чрез тромбоцитната кросмач реакция се определя съвместимостта с прилаганите тромбоцитни концентрати. Това е особено необходимо при пациенти с алоимунизация и неефективност на тромбоцитните трансфузии. Кросмачът с единични неподбрани донори на тромбоцити е от значение за осигуряване на трансфузии за алоимунизирани пациенти, които не са HLA типизирани ии при спешни случаи, докато се намери подходящ донор.

Микроимуноензимен метод

- ▶ Методът е като този за определяне на тромбоцитни алоантитела, с малки модификации. Към микротитърната плака се прикрепят изследваните тромбоцити, с последващо добавяне на блокиращ буфер за блокиране на неспецифичната реакция и инкубиране. След добавяне на изследваните серуми следват инкубиране и промивни процедури, добавяне на заешки анти-човешки IgG, конюгиран с алкална фосфатаза и промивания с блокиращ буфер. Добавя се р-нитрофенил фосфат, разтворен в диетаноламинов буфер и след инкубация реакцията се спира с 1N NaOH. Отчита се автоматично на апарат за микроELISA. Използват се 9 отрицателни и една положителна (HPA-1A) контрола за всяка плака.

Твърдофазов метод (Capture p)

Кросмачът се извършва в твърдофазова микросистема, като към всяко гнездо на микротитърната плака се добавят изследваните тромбоцити. След центрофугиране и промивни процедури се отстраняват несвързаните с дъното тромбоцити. Добавя се среда с ниска йонна сила и серум от пациента или контролен серум. След инкубация и промивания се добавят индикаторни клетки (еритроцити), покрити с анти-човешко IgG. Наличието на компактен бутон от еритроцити на дъното на гнездото означава отрицателна реакция. Положителният серум означава хомогенно свързване на еритроцитите към гнездата. Изследването на кросмач за подбор на съвместими тромбоцитни концентрати чрез този метод е бърз и се извършва за 1-2 часа.

Флоуцитометричен метод

Флоуцитометричният метод на изследване може да бъде използван освен за определяне на тромбоцитни антитела при алоимунизирани пациенти и за тромбоцитни повърхностни клетъчни маркери, но и за тромбоцитен кросмач. Принципът се основава на откриване на имуноглобулините, абсорбирани/свързани към тромбоцитната повърхност, като се счита, че повече алоантигенни или донор-несъвместими тромбоцити свързват повече имуноглобулини от плазмата на реципиента.

Пробите се инкубират с флуоресцентно маркирани (FITC маркирани F(ab)2) антитела, насочени срещу IgG, абсорбирани върху тромбоцитната повърхност. Високата степен на несъвместимост между донорските тромбоцити и плазмата на пациента се отчита като усилено свързване на F(ab)2-FITC антителата към донорските тромбоцити и сочи за неуспешна последваща трансфузия. Методът е бърз, точен и лесен за изпълнение, въпреки че има и някои ограничения.

Заклучение

- ▶ Тромбоцитна имунизация
- ▶ HLA антителата са широко распространени, транзиторни
 - ▶ пример: PLT рефрактерност
- ▶ HPA антителата са редки, персистиращи
 - ▶ примери: FNAT, РТР

БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО

