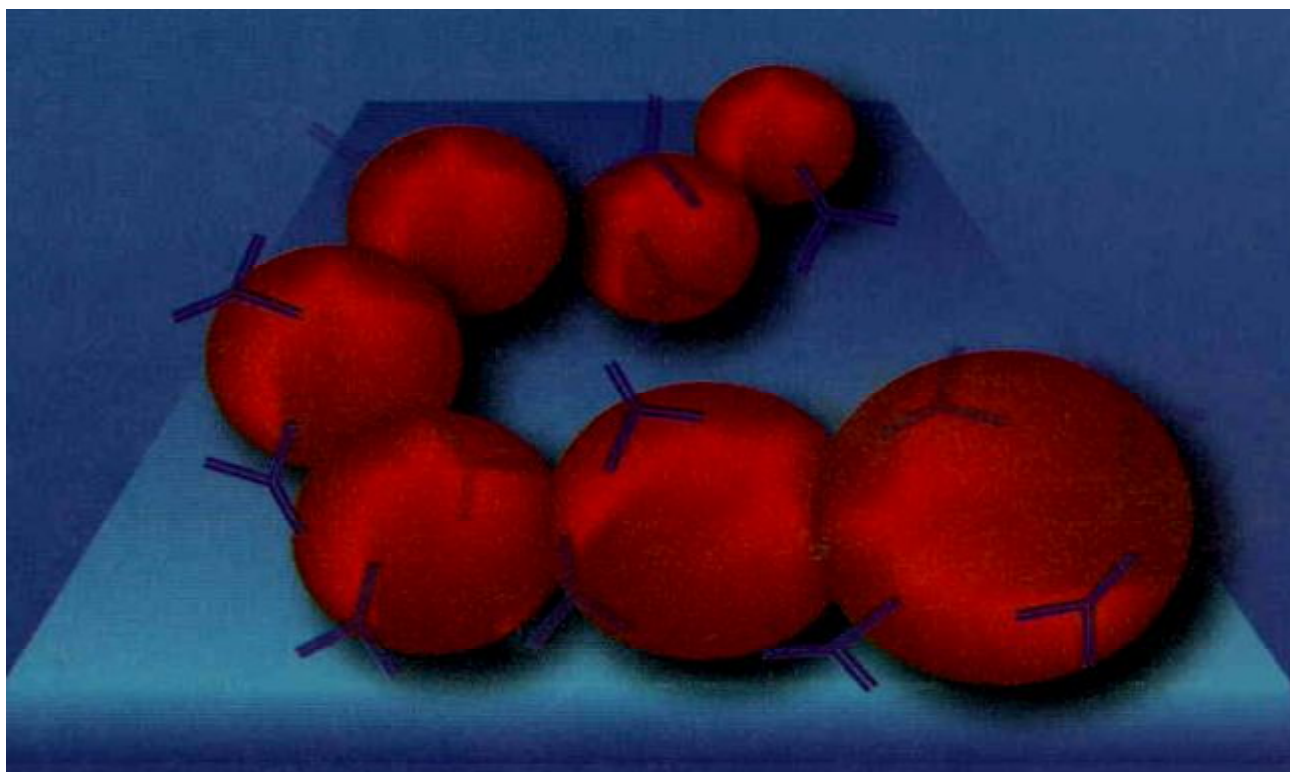




**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”
CENTRUL NAȚIONAL DE TRANSFUZIE A SÎNGELUI**

GHID ÎN IMUNOHEMATOLOGIE



Chișinău, 2015

**Aprobat de Consiliul de Experți al Ministerului Sănătății al Republicii Moldova
(proces verbal nr.2. din 28.05. 2015)**

**Aprobat prin Ordinul Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr. 465 din 11.06.2015
Cu privire la aprobarea Ghidului în imunohematologie**

Elaborat de colectivul de autori:

Lucia Andrieș	dr. hab. în științe medicale, profesor universitar USMF "Nicolae Testemițanu"
Svetlana Cebotari	directorul Centrului Național de Transfuzie a Sîngelui, dr. în transfuziologie
V. Sîrbu	Redactor

Recenzenți oficiali

A. Vișnevschi, șeful Catedrei medicină de laborator al USMF "Nicolae Testemițanu" dr. hab. șt. med., profesor universitar

S. Ghinda, șeful Laboratorului de alergologie și imunologie al IMSP Institutul de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc", dr. hab. în medicină, profesor cercetător

Valentina Stratan, șefa Laboratorului de imunologie și imunogenetică al IMSP Institutul Oncologic, dr. în biologie, conferențiar cercetător

CUPRINS

Abrevieri.....	5
Introducere.....	7
Capitolul 1. Caracteristica organelor, țesuturilor și celulelor sistemului imun. Mecanisme de realizare a imunității congenitale și adaptive.....	8
Capitolul 2. Caracteristica generală a antigenilor și anticorpilor	19
Capitolul 3. Interacțiunea antigenilor eritrocitare cu anticorpii. Metode de testare...	41
Capitolul 4. Antigenile eritrocitare ale sistemului AB0 și caracteristica anticorpilor acestui sistem.....	53
Capitolul 5. Sistemul antigenic eritrocitar Rhesus.....	72
Capitolul 6. Sistemul antigenic eritrocitar Kell.....	85
Capitolul 7 Sistemul antigenic MNS	87
Capitolul 8. Sistemul sangvin Lewis	91
Capitolul 9. Sistemul sangvin P și Globoside	94
Capitolul 10. Sistemul sangvin Lutheran (LU)	96
Capitolul 11. Sistemul sangvin Kidd (JK).	98
Capitolul 12. Sistemul sangvin Duffy (Fy).....	100
Capitolul 13. Sistemul sangvin I.....	102
Capitolul 14. Alte sisteme sangvine eritrocitare.....	104
14.1 Sistemul sangvin Diego (DI).....	104
14.2 Sistemul sangvin YT.....	105
14.3 Sistemul sangvin XG.....	105
14.4 Sistemul sangvin Scianna (SC)	106
14.5 Sistemul sangvin Dombrock (DO).....	107
14.6 Sistemul sangvin Colton (Co)	107
14.7. Sistemul sangvin Landsteiner-Wiener (LW).....	108
14. 8. Sistemul sangvin Chido-Rodgers (CH/RG).....	109
14.9. Sistemul sangvin Gebrich (GE).....	109
14.10. Sistemul sangvin Cromer (CROM).....	110
14.11. Sistemul sangvin Knops (KN).....	110
14.12. Sistemul sangvin Indian (IN).....	111
14.13. Sistemul sangvin Kx.....	111
14.14. Sistemul sangvin Ok.....	111
14.15. Sistemul sangvin Raph (RAPH).....	111
14.16. Sistemul sanvuin JMH.....	111
14.17. Sistemul de antigene eritrocitare GIL.....	111
Capitolul 15. Sistemul antigenic granulocitar și trombocitar.....	112
Antigenile granulocitare.....	112
Capitolul 16. Algoritme pentru diagnostic de laborator al complicațiilor posttransfuzionale și al bolii hemolitice a nou-născutului	115
Capitolul 17. Biosecuritatea și biosiguranța în laboratorul imunohematologic.....	129
Bibliografie.....	136

ABREVIERI

Ac -	anticorp
AcMo -	anticorp monoclonal
ADCC -	citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi (<i>Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity</i>)
AFP -	alfa - fetoproteină
Ag -	antigen
AHA -	anemia hemolitică autoimună
ADN-	acid dizoxiribonucleic
APC -	celulă prezentatoare de antigen (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
BHNN -	boala hemolitică a nou-născutului
C -	complement
CAA -	complex antigen-anticorp
CD -	clasă de diferențiere
CI -	complexe imune
CIC -	complexe imune circulante
CMV-	virusul citomegalic
CR -	receptor de complement (<i>Complement Receptor</i>)
DAF -	factorul de accelerare a degradării
Fab -	fragment variabil al imunoglobulinelor (<i>Fragment Antigen Binding</i>)
Fc -	fragment constant, cristalizabil al imunoglobulinelor
H -	lanțul greu al imunoglobulinelor
HSV –	virusul herpetic simplu
HLA -	antigeni leucocitari umani
HTI -	hipersensibilitate de tip imediat
HTÎ -	hipersensibilitate de tip întârziat
IFN -	interferon
ICAM -	moleculă de adeziune intracelulară (<i>Intracellular Adhesion Molecules</i>)
Ig -	imunoglobulină
IgA -	imunoglobulina de clasa A
IgE -	imunoglobulina de clasa E
IgG -	imunoglobulina de clasa G
IgM -	imunoglobulina de clasa M
IL -	interleukine
kDa -	kilodalton
L -	lanțul ușor al imunoglobulinelor
LB -	limfocit B
LPS -	lipopolizaharid
LT -	limfocit T
MA -	maladii autoimune
MAC -	complexul de atac al membranei (<i>Membrane Attack Complex</i>)
MHC -	complexul major de histocompatibilitate (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
mIg -	imunoglobulină membranară
NA -	aloantigenii neutrofilelor

NK -	celulă spontan ucigașă (<i>Natural Killer</i>)
NO -	oxid nitric
PAF-	factorul de aglutinare a trombocitelor
PG -	prostaglandine
PMN -	leucocite polimorfonucleare
RA -	reacția de aglutinare
RHA -	reacția de hemaglutinare
RPL -	reacția de polimerizare în lanț
SI -	sistemul imun
Soluție LISS -	soluție salină cu putere ionică scăzută
TAD -	testul antiglobulinic direct (Coombs)
TAG-	testul antiglobulinic
TAI -	testul antiglobulinic indirect (Coombs)
Tc -	limfocit T-citotoxic
Th -	limfocit T-helper
TNF -	factorul de necroză tumorală

Introducere

Cercetările ultimilor decenii cu utilizarea metodelor performante au soldat cu stabilirea mecanismelor inedite în genetica grupelor sangvine, elaborarea unei clasificări internaționale a antigenilor eritrocitari, stabilirea particularităților structurale individuale ale acestora în mostrele sangvine cu importanță majoră clinică în diverse situații dificile.

De importanță majoră sunt datele de interpretare clinică asupra rolului diferitor antigeni și anticorpi în complicațiile posttransfuzionale, conflictul dintre mamă-făt și stările imunopatologice aparente în diverse maladii. Elaborarea anticorpilor monoclonali, precum și a metodei de testare în gel ale antigenilor și anticorpilor au condus la minorizarea erorilor în aprecierea grupelor sangvine și profilaxia complicațiilor posibile.

Elaborarea unei politici noi în managementul securității transfuzionale în țară noastră conține aspecte noi, inedite în tipizarea structurilor antigenice eritrocitare, anticorpilor antieritrocitari de diversă geneză cu rol important în apariția stărilor imunopatologice și este în concordanță cu prevederile directive ale Comunității Europene ce va contribui la performanța acestui compartiment important pentru imunohematologie. Algoritmele de diagnostic elaborate de Dr. S.Cebotari constituie un compartiment de valoare clinică aplicativă în testarea grupelor sangvine, realizarea măsurilor de profilaxie și tratament în instituțiile medico-sanitare.

Ediția acestui ghid este dedicată tuturor medicilor, care în activitatea sa apelează la testarea grupelor sangvine, discifrarea mecanismelor imune în diverse situații clinice și de laborator, realizarea procedeeleor terapeutice etc.

Capitolul 1. Caracteristica organelor, țesuturilor și celulelor sistemului imun. Mecanisme de realizare a imunității congenitale și adaptive

Sistemul imun (SI) al organismului uman conține toate componentele de apărare, aparente la diferite etape evolutive (factorii congenitali nespecifici și cei dobândiți antigen-specifici). Factorii congenitali (celulele rezidente ale diferitor organe și țesuturi, cele sangvine, endoteliale, moleculele circulante și secretate) acționează fără participarea mecanismelor de recunoaștere și memorizare a structurilor antigenice străine, prezentând reacții stereotip la orice stimul în cazul invaziei sau lezării. Factorii adaptivi sunt capabili să recunoască și să memorizeze particularitățile moleculare de structură a stimulului antigenic.

Componentele specifice ale SI includ limfocitele T și B, anticorpii (Ac). Pentru realizarea funcțiilor sale specifice limfocitele T și B sunt dotate cu receptori multipli de recunoaștere a antigenului (Ag), care interacționând cu „non-propriul”, induc activarea, proliferarea și diferențierea lor. Din interacțiunea directă a antigenului cu receptorii limfocitelor prin intermediul diferitor citokine secretate poate rezulta apariția unei clone antigen-reactive cu dezvoltarea reacțiilor imune. În procesul de realizare a mecanismelor de apărare, factorii nespecifici și cei imuni specifici cooperează și interacționează între ei. Sistemul limfoid (substratul morfologic a SI) care produce factorii imuni specifici realizează imunitatea, cooperând cu alte sisteme (nervos central, endocrin) ale organismului.

Imunitatea adaptivă este concretă și specifică la un anumit antigen, formează memoria imunologică, se intensifică la contactul repetat cu Ag respectiv. Specificitatea de grad înalt se caracterizează prin complementaritate (afinitate) majoră și legarea intensivă (aviditate) a moleculelor și receptorilor. Această variantă a imunității este dependentă de produsele limfocitelor B (anticorpi) și T, care dispun de receptori specifici la antigen. Practic toate interacțiunile moleculelor cu receptorii sunt bazate pe capacitatea de adeziune, care se realizează prin legături necovalente ale moleculelor. Imunitatea adaptivă este de geneză clonală: fiecare limfocit T și B exprimă un receptor specific numai la un Ag. Limfocitul „naiv” este precursorul genetic identic al clonei celulare descendente, deoarece interacțiunea lui cu Ag conduce la proliferare.

Imunitatea este un fenomen biologic complex ce rezultă în urma reacțiilor dintre limfocite și factorii umorali. Recunoașterea Ag și răspunsul imun sunt dependente de proprietățile acestuia și se realizează pe diferite căi, dar, de regulă, prin cele care includ reacțiile de interacțiune în lanț molecular-celulare, a căror etapă finală este sinteza de Ac și de limfocite T imune.

Baza celulară și moleculară a imunității este organizată într-un sistem complex, care dispune de organe limfoide centrale și cele periferice, diseminate în tot organismul, la nivelul cărora celulele își desfășoară activitatea lor efectoare (tab. 1).

Organe, celule și mediatori solubili ai sistemului imun uman

Organele limfoide		Celule		Mediatorii solubili cu funcții de apărare	
Centrale	Periferice	Limfocite	APC		
Timus	Splina	T	Macrofagele și celulele dendritice	Directe	Indirecte
Măduva osoasă	Ganglionii limfatici	B		Imunoglobulinele	Limfokinele
		Celulele NK, K		Complementul	Monokinele
	Formațiunile limfoide asociate structurilor organismului				

Nota: APC – celule prezentatoare de antigen; NK – celule natural killer

Organele limfoide centrale (timusul și bursa lui Fabricius la păsări sau echivalentul bursei la mamifere – măduva osoasă) sunt cele de suport ale hematopoiezei și limfopoiezei, unde celula stem pluripotentă proliferază, iar descendenții ei sunt dotați cu spectrul specific de receptori de membrană și instruiți în recunoașterea structurilor proprii ale organismului de cele străine lui.

Timusul este populat de celule precusoare ale limfocitelor T (pro-timocite) derivate din celulele stem limfoide, care se maturează sub influența hormonilor timici secretați de celulele epiteliale. La nivelul rețelei epiteliale din zona medulară sunt celule bogate în antigeni HLA de clasa II, care instruiesc precursorii limfocitari să facă distincție între „propriu” și „străin”. Limfocitele instruite în timus constituie clasa celulelor T-dependente sau limfocitele T cu atribute majore și multiple în apărarea imună.

Timusul crește în greutate sub influența hormonilor săi și a celor tiroidieni și scade odată cu vârsta, sub influența hormonilor sexuali, glucocorticosteroizilor etc. Creșterea lui continuă până la 12-15 ani, după care involuează, dar nu dispare complet, menținându-și funcțiile secretorii. Atimia congenitală este însoțită de grave alterări imune incompatibile cu viața și alterează răspunsul imun față de Ag timodependenți, rejectia grefelor etc., dar nu și față de Ag timoindependenți.

Splina are două țesuturi distincte: pulpa roșie, formată din corzi mărginite de macrofage, unde sunt distruse eritrocitele, și pulpa albă, bogată în țesut limfoid sub forma unor manșoane poziționate în jurul unei arteriole centrale, cu macrofage și limfocite T dispuse periarteriolar (aria timodependentă), și limfocite B dispuse periferic, formând nodulii limfatici sau foliculii splenici (corpusculii Malpighi). În zonele T și B există zone „marginale” la nivelul cărora funcționează macrofage specializate, care împreună cu celulele dendritice, prezintă antigenul limfocitelor B.

Ganglionii limfatici formează o rețea de aglomerări limfoide dispuse în punctele-cheie ale organismului. Ca organizare structurală, ganglionul limfatic este absolut identic cu splina, în sensul că are arii T și B-dependente și zone medulare, în care se distinge un amestec de celule B, T, macrofage, celule dendritice, NK și unde se face cooperarea celulară cu realizarea răspunsului imun. În zona medulară predomină plasmocitele și celulele fagocitare. În sindroamele de agamaglobulinemie zonele medulară și corticală sunt practic depopulate de celulele B.

Țesutul limfoid necapsulat, format din aglomerări difuze de celule limfoide dispersate sub mucoasa tractului digestiv, respirator, urogenital este acoperit cu țesut epitelial cu permeabilitate pentru Ag și pentru moleculele de sIgA. Circulația limfocitelor asigură supravegherea imună a organismului.

Sângele este considerat de către unii autori ca substrat periferic al SI, deoarece în el se găsesc practic toate componentele celulare și moleculare ale acestuia: limfocitele T și B, monocitele, granulocitele și chiar celulele stem.

Imunitatea congenitală asigură rezistența nespecifică a organismului la diferiți antigeni. Ea include factori celulari și umorali, care apreciază starea mecanismelor nespecifice de apărare, în special la etapele primare. Macrofagele și complementul cooperează cu celulele SI și, astfel, participă în realizarea răspunsului imun specific.

Factorii celulari ai imunității congenitale (granulocitele PMN, monocitele-macrofage, celulele natural-killer și dendritice, trombocitele etc. în majoritatea cazurilor sunt primare în legarea antigenului. Cu toate că legarea are caracter neimun, receptorii acestor celule și adezinele posedă elemente de specificitate, interacționând cu anumite grupări chimice native ale antigenului (glicoproteine și glicolipide, lipopolizaharide etc.). Un grup dintre acești receptori, legând patogenul, intensifică endocitoza cu fagocitarea și scindarea enzimatică a Ag, alții induc sinteza de citokine. Lipopolizaharida (LPS), care atașează proteina-ligand serică a acesteia, se leagă cu receptorul CD14 al monocitelor-macrofage, astfel activându-le. Complexul LPS + proteină induce expresia receptorului funcțional activ pentru IL-8 de pe neutrofile și intensifică migrarea lor.

Polimorfonuclearele (PMN) asigură „prima” linie de apărare a organismului, având ca forme celulare neutrofile, bazofile și eozinofile (microfage). Ele posedă molecule HLA de clasa I și antigeni organo-specifici caracteristici țesutului mieloid.

Neutrofilele conțin aloantigenii NA, NB, NC, NE, V (az) care pot fi testați în reacția de aglutinare a leucocitelor cu utilizarea izoanticorpilor. Antigenii NA1 și NA2 pot induce sensibilizarea persoanelor care nu posedă acești Ag la transfuzia sângelui (0,12% din cazuri) și reacții posttransfuzionale. Femeile NA-negative multipare la imunizarea cu Ag NA fetală secretă anticorpi care pot induce neutropenia aloimună a nou-născutului.

Neutrofilele leagă IgG și IgE prin intermediul receptorilor Fc γ și Fc ϵ , aparenti după activarea lor, și astfel interacționează cu Ag și alergenii. Influențate de Ag solubili, neutrofilele degranulează și elimină enzime și mediatori. Ele pot liza celulele acoperite

de anticorpi, legându-se prin receptorii săi Fc de fragmentele acestor imunoglobuline (citotoxicitatea dependent de anticorp).

Eozinofilele dispun și ele de receptori de membrană Fc pentru IgG, IgE (CD23), receptori pentru componentele complementului C3a, C3b, C4b și C5a, pentru factorul de aglutinare a trombocitelor (PAF) etc. După activare, în special prin IgE, eozinofilele secretă mediatori preformați și metabolizează lipidele de membrană cu sinteza de prostaglandine și leucotriene. Ele pot fi activate și de către complexe imune, iar la degranulare vor elimina diverse enzime, histamină, serotonină, PAF, prostaglandine, leucotriene, multiple citokine care vor contribui la stabilirea stării de hipersensibilitate.

Bazofilele și mastocitele intervin, în special, în reacțiile alergice de tip imediat, datorită numărului major de receptori membranari pentru IgE. La legarea încrucișată a ultimilor ele degranulează cu eliberarea mediatorilor activi (histamină, serotonină, PAF, prostaglandine, leucotriene, factori chemotactici, heparină etc.) care participă în realizarea manifestărilor clinice ale alergiei. În afara de IgE, principalul Ac sensibilizant, mastocitele mai pot fi degranulate de către IgG4, conconavalina A, dextrani, ACTH, diverși polimeri etc.

Sistemul fagocitar mononuclear (monocitele sangvine, macrofagele fixe și circulante), posedă un spectru major de receptori pentru imunoglobuline, componentele complementului, citokine și chemokine, pentru moleculele străine (receptori TLR - (*Toll line receptors*, MSR etc). Ele realizează două funcții importante: recunoașterea, fagocitoza, procesarea Ag străin cu eliminarea lui (profesie fagocitară), sau prezentarea Ag procesat limfocitelor (funcția de celule antigen-prezentatoare). În distrucția materialului fagocitat participă enzimele lizozomale, produsele toxice ale activării sistemului oxidativ (superoxid anionul, hidrogenul peroxid, singlet oxigenul etc.), proteinele cationice (catepsina G etc.) cu acțiune asemănătoare antibioticelor, oxidul nitric (NO[•]). Macrofagele, în special cele activate, secretă multiple citokine și mediatori: IL-1, -3, -6, -8, -10, -12, -15, -18, TNF- α , PG, IFN, factori ai complementului, enzime etc. Funcția reglatoare a macrofagelor se manifestă prin expresia acțiunii lor asupra Ag sau altor componente ale SI.

Astfel, macrofagele fagocitează non-propriul și îl elimină din organism, anulându-i efectele nocive. Prin digestie moderată intracitoplasmatică creează „stocuri” de epitopi, care realizează un anumit prag de concentrație și permite declanșarea reacțiilor imune (se evită toleranța de „zonă joasă”); prin reținerea Ag la nivelul fagolizozomilor și eliberarea lor treptată, se evită „sufocarea” limfocitelor de către stimulul antigenic în exces (toleranța de „zonă înaltă”). Asupra celorlalte componente a SI acționează prin eliberarea de mediatori solubili, precum și prin intervenția unor subpopulații de macrofage cu funcții supresoare care intervin direct în mecanismele de reglare.

Celulele natural killer (NK) și subpopulația celulară K reprezintă o linie importantă și primordială de apărare a organismului, pe care-l ajută să rejeteze celulele modificate sau chiar alogrefele. Eleucid fără restricția MHC, celulele tumorale, în special cele de origine medulară (leucemice). Posedă receptori Fc γ , dar n-au receptori pentru C și Ig de suprafață. Ele recunosc și leagă spontan ținta pe care o ucide în câteva ore prin activarea proceselor litice. Activarea lor este dependentă de o serie de factori, cum ar fi determinismul genetic, vârsta, unele citokine, medicamente, alimente, boli, stres etc.

Trombocitele participă în reacțiile imune. Posedă receptori pentru imunoglobuline (IgG, IgE), componentele complementului (C1q, C3), pentru laminină (CD29, CD46), trombină (CD42d), factorul Willebrand (CD42b), trombospodină (CD36), fibrinogen (CD61, CD51), collagen (CD29, CD49), selectina CD62P etc. Dispun de antigeni HLA și organo-specifici Zw (P1A), Ko (Sib), BAK, Yuk (Pen), Br. La contactul cu acești antigeni se pot secreta anticorpi cu apariția reacțiilor posttransfuzionale la indivizii care nu posedă antigenii respectivi. Complexele imune, factorii de activare a complementului și trombocitelor induc agregarea trombocitelor și eliminarea mediatorilor (histamină, serotonină, prostaglandine, leucotriene, lizozim, enzime lizozomale, lizine β , factori de stimulare a fagocitozei și chemotactismului leucocitelor, de activare a sistemului chininic și coagulant etc). Poseda proprietăți de adeziune (selectina P, CD62P) la endoteliul alterat și alte celule, de aglutinare, de agregare, de secreție a mediatorilor și factorilor trombocitari. În afară de participarea în coagularea sângelui și în inflamație, mediatorii și factorii trombocitari modifică reacțiile imune.

Celulele dendritice (DC) sunt o populație heterogenă de celule mobile prezente în toate țesuturile și în sânge (1% din totalul leucocitelor sangvine). Proprietățile de referință ale acestora sunt:

- legarea, procesarea și prezentarea Ag proteice și lipoglicoproteice limfocitelor T CD4, CD8 (cele interdigitale) și LB (cele foliculare);
- secreția și eliminarea citokinelor, chemokinelor care mobilizează și activează alte leucocite;
- inducerea autotoleranței limfocitelor T în timus și în organele periferice;
- participarea în reacțiile alergice și autoimune la activarea patologică;
- participarea în imunitatea antitumorală;
- eliminarea celulelor moarte prin legarea lor de receptorul pentru vitronectină.

Celulele endoteliale și epiteliale conțin multiple molecule de adeziune, care sunt intens exprimate după activare (selectinele P și E), receptori pentru integrine ICAM - 1 și 3, receptori pentru chemokine, pentru IL-1, -3, -4, -6, TNF- α , IFN- γ , C1q. În răspunsul autoimun și în inflamație, endoteliul elimină citokina IL-1. La infectarea cu diverse virusuri (HSV tip I, al gripei, CMV etc.) și la acțiunea citokinelor pe endoteliu, apar receptori pentru IgG, C3b, se intensifică expresia moleculelor HLA de clasele I și II etc.

Imunitatea locală a pielii și mucoaselor este influențată de dependențele dintre celulele epiteliale, dendritice, limfoide, macrofage.

Factorii umorali ai imunității congenitale includ sistemul complementului, lizinele β , fibrinogenul, macroglobulina α_2 , lizozimul, IFN etc. Ei sunt prezenți în sânge, limfă, lichidul articular, lichidul cefalorahidian, precum și în diferite secreții – salivă, lacrimi, lapte, spută etc. și acționează imediat și spontan.

Complementul (C) este un sistem complex de proteine ale serului sangvin (peste 30 la număr) multe dintre care sunt proenzime. Sinteza și secreția lor sunt asigurate de hepatocite și macrofage. Activarea sistemului complementului poate evolua pe cale clasică, lectinică și alternativă, sub formă de reacții în lanț cu reglarea procesului prin 7 proteine responsabile. Produsele scindării se semnifică prin a și b, cele activate – printr-o linie deasupra numărului componentului C. Posedă multiple efecte biologice, dintre care mai importante sunt: opsonizarea, chemotactismul și liza Ag non-proprie. Prin opsonizare se intensifică fagocitoza acestuia de către celulele fagocitare, prin liză (celulară etc.) are loc distrugerea lor, iar prin unele componente, eliberate în cursul activării, atrage celulele fagocitare la locul reacției – (chemotactism) cu amplificarea răspunsului imun.

Sistemul C în anumite condiții are și efecte negative:

- se poate fixa pe mastocite, trombocite sau PMN, ceea ce are drept rezultat eliberarea de histamină și creșterea permeabilității vasculare cu apariția consecutivă a șocului anafilactic;
- poate favoriza precipitarea complexelor Ag-Ac (CAA) la nivelul peretelui vascular (fenomenul Arthus) cu o gamă largă de manifestări grave.

Calea clasică de activare a C (fig. 1) este indusă de complexul Ag-Ac în prezența ionilor de Ca^{++} și Mg^{++} , de regulă pe suprafața celulelor-țintă. Complexul Ag-Ac se leagă cu C1q (domeniile $C_{\mu 4}$ pentru IgM și $C_{\gamma 2}$ – pentru IgG). Complexul format activează proteinazele C1r și C1s. Reglatorul acestei etape este inhibitorul C1, deficiența acestuia conduce la activarea spontană a C, care se manifestă prin edemul angioneurotic.

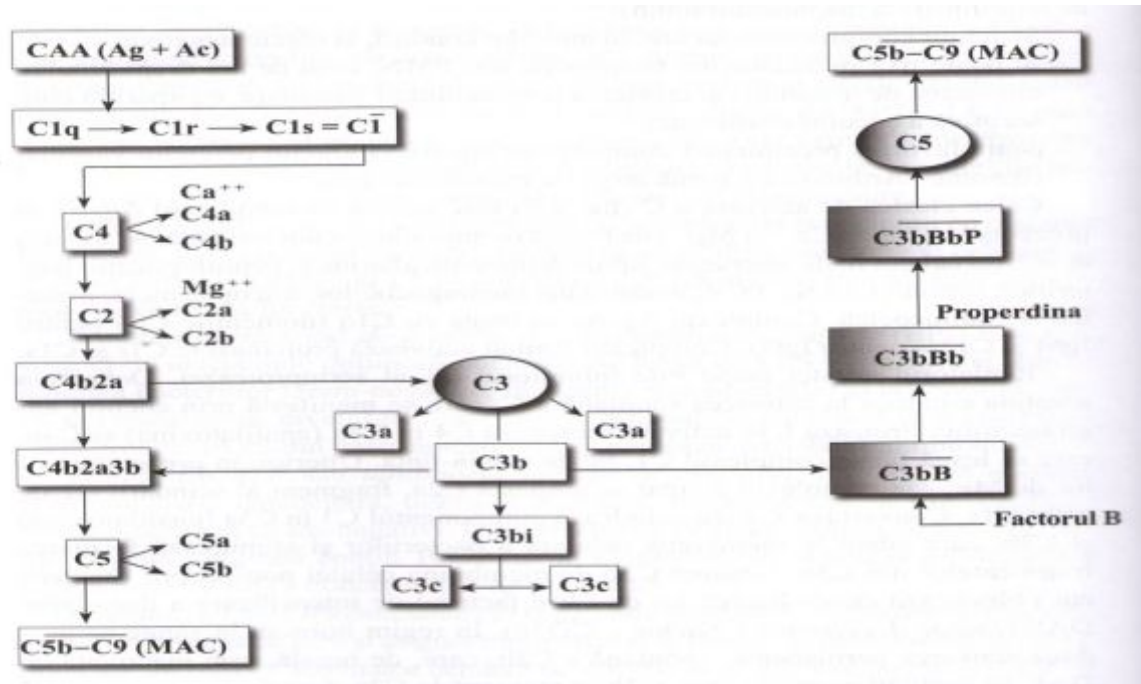


Figura 1. Analogia dintre calea clasică și cea alternativă de activare a complementului

Proteaza C1s activează scindarea C4 în C4a (anafilatoxină) și C4b, care se leagă fie de complexul C1, fie de celula-țintă. Ulterior, în prezența ionilor de Mg^{++} , la complexul format se atașează C2a, fragment al scindării C2 de către C1s. Convertaza C4b2a scindează componentul C3 în C3a (anafilatoxină) și C3b, care aderă la membrana celulară și stimulează formarea fragmentelor noi C3c, C3d (ultimul este mai stabil și se testează in vitro). Legarea C3b de membrana celulei non-proprie blochează catabolizarea lui de către factorul de intensificare a disociației DAF (*Decay Accelerating Factor*–CD55). În condiții normale, în sânge se produce activarea permanentă, spontană a C3b, care, de regulă, este inactivată de DAF. În cantități excesive însă, C3b se atașează la C2a, formând convertaza C5 (C4b2a3b). Acest complex macromolecular activează componentul C5 cu scindarea în C5a (anafilatoxină) și C5b. Ultimul leagă C6 și C7 cu formarea complexului (C5b,6,7), care se leagă de membrana celulei și atașează ulterior C8 și C9. Agregatele (C5b,C6-C9), denumite complexe membrano-atacante, se incorporează în membrana celulei-țintă, formând un canal transmembranar prin care în celulă pătrund ionii de Na și apa și ies ionii de K, proces ce determină liza celulară. Liza eritrocitelor favorizată de participarea C are caracter intravascular și este dependentă de clasa și cantitatea de Ac.

Calea lectinică de activare (fără anticorpi) este indusă de colectine, proteinele care leagă manoză. Etapele ulterioare sunt identice celei clasice. Calea alternativă de activare a C (fig. 1) este nespecifică, fiind indusă de polizaharida a LPS peretelui celulelor al bacteriilor (endotoxine), de imunoglobulinele agregate, remediile

medicamentoase etc. Ele stimulează scindarea C3 în C3a și C3b. Componentul C3b, fiind în exces, în prezența ionilor de Mg^{++} , se leagă cu factorul B seric (o protează serică inactivă). Complexul C3bB este scindat de factorul D (proteaza serică activă) în Ba și Bb. Complexul C3bBb este convertaza pentru C3 a căii alternative de activare, care intensifică scindarea C3. În condiții de normă el este instabil, dar poate fi stabilizat de properdină (proteina P), pe care o activează. Convertaza căii alternative scindează componentul C5 în C5a și C5b, etapele ulterioare de activare fiind identice celei clasice. În procesul de activare a C se formează fragmente biologic active - C4a, C3a, C5a (anafilatoxine) care induc eliberarea mediatorilor de către macrofage, de granulocite, degranularea mastocitelor. Clinic acest proces patologic se manifestă prin reacții alergice, pseudoalergice, inflamație și alterare celulară. În maladiile însoțite de formarea complexelor imune (bolile autoimune, infecțiile), nivelul complementului scade. Complementul stimulează fagocitoza și scindarea complexelor imune. Componentele C activat se leagă cu receptorii respectivi de pe suprafața leucocitelor (C3b, iC3b, C3dg). CR1 (CD35) – receptor de tip I, prezent pe eritrocite și leucocite, leagă C3b, asigură adeziunea imună, intensifică fagocitoza, scindează C3b (asemeni factorului H) și stopează activarea C, care temperează inflamația și alterarea țesuturilor. CR2 (CD21) prezent pe limfocitele B atașează iC3b, C3dg, poate lega virusul Epstein-Barr, activează celulele B. CR3 (CD11b/CD18) leagă iC3b, exprimat pe granulocite, limfocite, participă în fagocitoză. CR4 (CD11c/CD18) este un receptor pentru iC3b și C3dg, fiind prezent pe fagocite. Ca și CR3, se referă la familia integrinelor β_2 leucocitare (molecule de adeziune). C1qR se găsește pe macrofage, pe limfocitele B, pe endoteliu și leagă complexe imune. Produsele de activare a complementului, interacționând cu acești receptori celulari, stimulează funcțiile leucocitare, induc inflamația.

Imunoaderența eritrocitelor acoperite cu C3b cu receptorii fagocitelor (monocite, macrofage, neutrofile) va conduce la distrucția lor în ficat, iar cele sensibilizate cu IgG – la hemoliza extravasculară în splină. Deficiența C determină carențe imunitare.

Properdina este o glicoproteină implicată în activarea complementului pe cale alternativă.

Lizozimul este o muramidază care scindează mucopeptidele peretelui celular bacterian și este produsă de macrofagele, neutrofilele prezente aproape în toate țesuturile și fluidele organismului (plasmă sanguină, salivă, spută, lacrimi, lapte, mucus, organele interne etc.). El intensifică fagocitoza, anticorpogeneza, potențează acțiunea antibioticelor.

Lizinele β sunt proteine serice cationice, termostabile, care posedă activitate bactericidă pentru *B. subtilis* și *B. anthracis*.

MBL (Mannan Binding Lectine) este o proteină de fază acută cu funcție de opsonină în urma legării ei de grupările glucidice ale membranelor bacteriene cu activarea C pe cale lectinică.

Macroglobulina α_2 poate opsoniza practic toate bacteriile și inhiba activitatea enzimelor. Complexul cu agentul patogen în prezența calciului se leagă cu receptorul CD91 prezent pe macrofage și alte leucocite și, astfel, intensifică fagocitoza și dezvoltarea răspunsului imun.

Proteina C reactivă (PCR) face parte din proteinele plasmatice de fază acută. Este secretată de hepatocite și macrofage la acțiunea IL-1, IL-6, TNF- α . Se leagă de receptori neutrofilelor, macrofagelor și limfocitelor T cu activarea acestora. Ca și Ac prin participarea ionilor de Ca, ea se leagă specific de bacterii, fungi (fosforilcolină, fosfotidilcolină, galactani neecranați), iar complexul format activează C pe cale clasică. În consecință, microbii sunt lizați sau opsonizați în urma activării și apariției pe membrana lor a componentelor complementului (C3b etc.), care contribuie la fagocitoză, datorat receptorilor pentru aceste componente.

Fibronectina (globulină insolubilă a frigore) este o adezină secretată de macrofage, se leagă de bacterii, collagen și alte structuri celulare și acelulare, de fibrin și heparină. Opsonizează bacteriile, inducând adeziunea lor la leucocite, care dispun de integrine CD29/CD49.

Interferonii (IFN) prezintă o grupă heterogenă de molecule proteice secretate de diferite populații celulare (macrofage, fibroblaști, limfocite). În funcție de caracterul celulelor producătoare, IFN se divide în: α -interferon, ω -interferon (leucocitar), β -interferon (fibroblastic), γ -interferon (imun, T-celular). IFN- α și IFN- ω posedă proprietăți antivirale și antiproliferative (antitumorale). IFN- β intensifică expresia Ag HLA pe celule, activează killerii naturali (NK) și fagocitele. IFN- γ este produs, în special, de limfocitele Th1, el intensifică acțiunea antivirală și antiproliferativă a altor IFN, concomitent având și proprietăți imunoreglatoare. IFN- γ intensifică sinteza antigenilor HLA care favorizează procesele de recunoaștere și procesare a Ag, activează celulele NK, limfocitele T și B, anticorpogeneza, adeziunea leucocitelor, fagocitoza.

Anticorprii naturali sunt detectabili în serul sangvin uman normal față de antigene cu care organismul respectiv nu a contactat (de ex, prezența izohemaglutininelor față de Ag grupele sangvine AB0 sau a Ag Forssman). Apariția acestor tipuri de anticorpi naturali este explicată prin mecanisme imunogenetice sau prin imunizarea față de antigene cross-reactive (ex. anticorprii anti-grupă sangvină AB0 datorat imunizării cu Ag bacteriene sau provenite prin nutriție). Sunt produse de limfocite B1 și sunt Ac de afinitate joasă.

Imunitatea adaptivă specifică este realizată de celulele SI, care recunosc Ag străine de organism și dezvoltă reacții specifice, prin care să se denatureze, să se elimine antigenii în scopul menținerii homeostazei. Rolul efector principal în activitatea SI revine limfocitului, efector al reacțiilor imune mediate celular și umoral, capabil de sinteza unor limfokine, de cooperări și autoreglări funcționale, de memorie imunologică etc. După proveniența lor și direcția funcțională se disting două clase principale de limfocite: LT educate în timus, care efectuează reacțiile imune mediate celular și au o

participare majoră la controlul și supravegherea funcțiilor specifice de apărare și LB, care sintetizează anticorpi. Între populațiile T și B există relații de cooperare, de reglare, de supraveghere și control.

Limfocitele sunt celule autonome care circulă încontinuu în organism din organele limfoide în torentul sangvin și limfatic, asigurând supravegherea antigenică a țesuturilor, organelor, celulelor, transferul substanțelor active. Migrația limfocitelor se realizează cu participarea adezinelor, integrinelor, selectinelor și receptorilor „homing”, care determină cantonarea lor la nivel de mucoase, piele, ganglioni limfatici etc., și apreciază diferențele fenotipice necesare pentru funcțiile efectorii în țesuturile respective.

Caracteristicile de referință a celulelor T sunt:

- se diferențiază în timus cu apariția a două subpopulații de celule naive (T_0), dotate cu markeri $CD3^+ CD4^+$ (helperi) și $CD3^+ CD8^+$ (supresoare-citotoxice);
- se cantonează în zonele paracortice ale organelor limfoide periferice;
- dispun de receptori TCR $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ genetic programate pentru interacțiunea cu Ag în asociațiile cu complexul CD3- transmitător al semnalului în celulă;
- în țesuturi, sub influența citokinelor, se diferențiază: T_0 – helperii în Th1 – producători de IL - 2 și IFN - γ pentru răspunsul imun celular și Th2 – secretoare de IL-4, IL-5 etc. pentru sinteza de anticorpi; T_0 supresoare/citotoxice în celulele T-killer mature destinate pentru distrugerea celulelor-țintă;
- T-helperii recunosc Ag în complex cu moleculele HLA de clasa II (HLA-DR, DP, DQ), iar supresoarele – cu HLA de clasa I (HLA – A, B, C);
- sunt responsabile de imunitatea celulară, sunt celule reglatoare etc.

Limfocitele B (LB) sunt descendente ale celulei stem hematopoietice, iar diferențierea lor are loc la om în măduva osoasă și sunt responsabile de imunitatea specifică umorală. Anticorpii neutralizează Ag non-propriu, facilitează opsonizarea și activează complementul. Se disting două subpopulații principale de limfocite B: B-1 și B-2. Subpopulația B-1 apare din celula stem limfoidă extramedulară și se cantonează în cavitatea peritoneală și pleurală, amigdale și epiploon, și sunt celule ale imunității naturale. Dispun de markerul CD-5 și secretă Ac de clasa M, G, A la polizaharide, lipide, proteinele bacteriilor. Subpopulația B-2 prezintă limfocite cu receptori imunoglobulinici pe suprafața membranei pentru recunoașterea antigenului. La stimularea antigenică, ele se maturizează în plasmocite – secretoare de anticorpi. Limfocitele B mature migrează din măduva osoasă în torentul sangvin și cantonează prioritar în foliculele organelor limfoide periferice. Toate etapele de diferențiere a limfocitelor B sunt asigurate de activarea și reorganizarea genelor respective care controlează sinteza lanțurilor grele și ușoare ale imunoglobulinelor. Există 10^9 - 10^{16} variante de celule B, inițial programate pentru sinteza imunoglobulinelor – anticorpilor de o anumită specificitate. Pe limfocitele B mature există imunoglobuline legate de membrană (mIg), prioritar mIgM și mIgD. Limfocitele B, prin receptorii lor, pot fi

stimulate de antigenii timo-independenți (LPS sau polizaharide). Cu ajutorul T-helperilor, limfocitele B reacționează cu alți Ag. La stimulul Ag apar clone limfocitare T și B de memorie care asigură dezvoltarea răspunsului imun secundar de intensitate majoră.

Astfel, apărarea organismului uman de antigenile străine se realizează de un spectru larg de factori celulari și umorali ai rezistenței natural și imunității specifice, care cooperează între ei, asigurând în final menținerea homeostaziei antigenice.

Capitolul 2. Caracteristica generală a antigenilor și anticorpilor

Antigenii (Ag) sunt substanțe recunoscute ca străine de organism, capabile să declanșeze reacții imune specifice și să reacționeze cu produsele acestor reacții, respectiv cu anticorpii și celulele T imune. Ei pot proveni din afara organismului (exogeni) sau din interiorul acestuia (endogeni). Indiferent de proveniența lor, odată recunoscuți de către elementele sistemului imun, Ag pot declanșa următoarele reacții imune:

- sinteza anticorpilor cu specificitate de recunoaștere pentru ei;
- activarea proliferării policlonale sau monoclonale a limfocitelor;
- instalarea memoriei imunologice;
- în unele situații pot induce un răspuns imun exagerat (hipersensibilitate) sau pot anula răspunsul imun (toleranța imunologică).

Pentru definirea capacității de inducere a reacțiilor imune se folosesc doi termeni diferiți: *imunogenitate*, care semnifică proprietatea de a declanșa un răspuns imun și *antigenitatea*, adică proprietatea Ag de a se combina cu Ac sau receptorii limfocitului specific. Antigenii pot fi substanțe de origine bacteriană, virală, vegetală, animală, umană care, din punct de vedere structural, pot exista sub formă de molecule, celule sau țesuturi, iar, din punct de vedere chimic, pot fi proteine, glucide, lipide, glicoproteine, glicolipide sau acizi nucleici. Antigenitatea și imunogenitatea sunt influențate de o serie de factori dependenți de molecula de Ag (greutatea moleculară, calitatea de non-propriu, rigiditatea moleculei, izomerismul optic, persistența în organism, compoziția chimică, modul de exprimare a epitopilor), specia de proveniență a Ag, modalitatea de administrare a lor și cele care se referă la organismul-gazdă (maturitatea sistemului imun, vârsta organismului și starea lui fiziologică). În componența moleculei Ag există grupare purtătoare sau „carrier”, care este recunoscută de către limfocitul T și care

poartă determinanți antigenici sau epitopi, recunoscuți de receptorii pentru antigen (fig. 2).

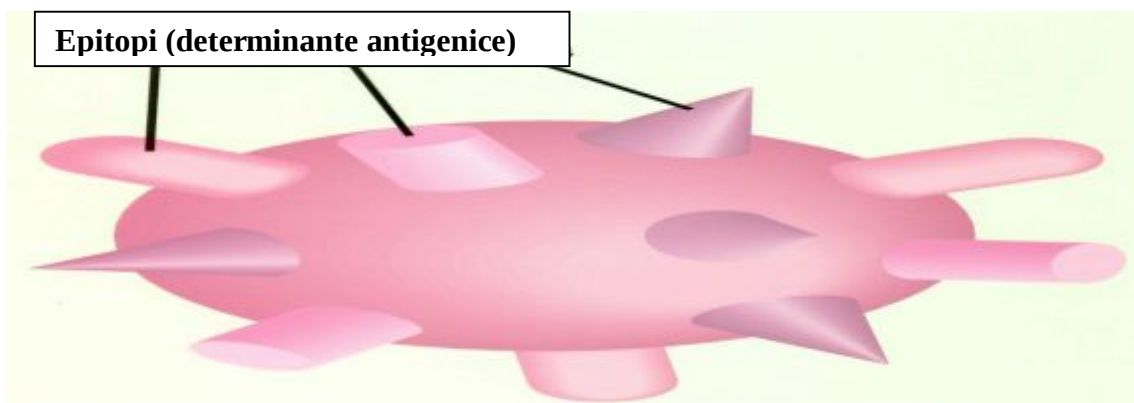


Figura. 2. Schema aplatării epitopilor pe molecula de antigen

Gruparea purtătoare este responsabilă de antrenarea populației T în răspuns, iar epitopii – de specificitatea răspunsului imun. Rolul imunologic major revine epitopilor care, de regulă, sunt expuși în locurile cele mai periferice și mai accesibile ale moleculei.

Majoritatea Ag compleți în natură sunt, de fapt, „mozaicuri” antigenice cu un număr mare de epitopi, fiecare dintre aceștia fiind recunoscuți de o clonă de limfocite, care are receptori predestinați să-i recunoască.

Specificitatea antigenică este determinată de interacțiunea complementară a Ag numai cu Ac sau receptorii limfocitelor T ale unei clone. Ea este influențată nu numai de compoziția chimică a moleculei, dar și de poziția în spațiu a epitopilor.

Specificitatea Ag naturali este multiplă: de specie, de grup, de organ etc. Specificitatea antigenică *de specie* sau *izoantigenică* se caracterizează prin prezența Ag la toți indivizii unei specii (eritrocite, leucocite, mușchii striati, molecule de albumină, imunoglobulină etc.) și care se deosebesc de cei existenți la nivelul organelor, celulelor sau moleculelor analoage ale altor specii. Specificitatea *de grup* sau *alotipică* este caracteristică numai unor grupe de indivizi și nu tuturor membrilor unei specii. Acești Ag se numesc aloantigeni și se întâlnesc, în special, la nivelul celulelor sistemului sangvin și pe lanțurile grele ale moleculelor de Ig. La nivelul eritrocitelor umane există cca 326 de antigeni grupați în 29 de sisteme aloantigenice.

Specificitatea de organ este caracteristică unor organe sau țesuturi, fără să se țină cont de specie (ficatul, cristalinul etc.). În organe și țesuturi predomină Ag de specie, și nu cei specifici organului, care induc un răspuns imun intensiv.

Specificitatea de „stadiu evolutiv” sau de dezvoltare ontogenetică caracterizează majoritatea celulelor organismului și, în mod special, pe cele care aparțin sistemului limfoid. De exemplu, la nivelul țesuturilor și lichidelor embrionare există AFP, un Ag specific acestui stadiu de dezvoltare timpurie a organismului, care la maturitate practic dispare, reapărând numai în cazuri patologice, de exemplu în distrofiile și neoplaziile

hepatice. Limfocitele T și B aflate în stadii timpurii de dezvoltare ontogenetică exprimă unii epitopi care dispar când celulele ajung la maturitate funcțională.

Specificitatea antigenică patologică în mod normal este absentă. Un interes deosebit prezintă antigenii *oncofetal* (CEA, AFP etc.), care la subiecții sănătoși se găsesc în cantități extrem de mici (pg, ng), pentru ca la pacienții cu cancer de colon sau cu leziuni hepatice să fie exprimați abundent în ser și la nivelul unor țesuturi sau organe.

Antigenii heterofili se întâlnesc exprimați la nivelul țesuturilor diferitor specii, uneori foarte îndepărtate filogenetic (antigenii Forssman, Rhesus, cei comuni unor specii de mamifere și bacteriilor – *fenomenul mimicriei antigenice*). Existența heteroantigenilor poate fi utilă în diagnosticul de laborator al unor infecții (antigenul cardiolipin al bovinelor pentru testarea anticorpilor la sifilisul uman; antigenii comuni rickettsiilor și proteusului în tifosul exantematic (reacția Weill-Felix) sau mononucleozei infecțioase (reacția Paul-Bunnell etc.), dar poate crea și multe dificultăți. Astfel, oamenii cu antigen de grupa 0 sau A reacționează mai slab la antigenii unor germeni cum ar fi pasteurelele sau virusul variolei vaccinal (înainte de eradicarea ei). Organismele persoanelor, care au epitopi comuni cu cei ai bacteriilor sau virusurilor patogene, pot să nu reacționeze imun, instalându-se toleranța imunologică față de acestea sau, în cazul în care reacționează, anticorpii produși vor distruge, în cele din urmă, și antigenii proprii, comuni cu cei ai antigenului invadator, provocând autoagresiune.

Valența antigenilor este exprimată prin numărul de epitopi care pot reacționa cu situsurile combinate ale anticorpilor. Antigenii pot fi monovalenți, bivalenți și polivalenți. Antigeni *compleți* sunt cei care declanșează reacții imune și reacționează *in vivo* și *in vitro* cu produșii acestor reacții. Alți Ag pot reacționa *in vitro* cu Ac, dar nu pot induce sinteza lor *in vivo*, deoarece sunt molecule mici, numite *haptene*. La legarea cu moleculele cu masa moleculară mare, haptenele obțin imunogenitate. Remediile medicamentoase, majoritatea substanțelor chimice se referă la haptene. Ele induc răspunsul imun după legarea cu proteinele (ex., albumina) circulante sau cu cele celulare superficiale (eritrocite, leucocite). În urma acestei cuplări, ele induc secreția de anticorpi capabili să reacționeze cu haptena respectivă. La pătrunderea repetată a haptenelor în organism apare un răspuns imun secundar, adeseori în formă de reacție alergică.

Antigenii timo-dependenți necesită pentru declanșarea reacțiilor imune limfocite T, pe când cei *timo-independenți* pot declanșa sinteza anticorpilor de către limfocitele B și în absența celulelor T. În funcție de origine, Ag se clasifică în: *naturali* (componente ale celulelor umane, animale, vegetale sau microbiene), *artificiali* (obținuți prin combinări artificiale ale unor componente naturale) și *sintetici* (fabricați de „novo” de om în laborator). Antigenii *naturali* sunt proteinele, lipidele, polizaharidele, acizii nucleici sau moleculele cu alcătuire heterogenă de genul glicoproteinelor, glicolipidelor, lipopolizaharidelor etc.

Proteinele naturale sau cele modificate fizic ori chimic sunt, de regulă, buni Ag, care posedă imunogenitate. Au MM mai mare de 10 kDa (minimal 0,45 kDa) cu structură rigidă și sunt polivalente. Proprietăți antigenice posedă proteinele serice ca albumina, α -, β - și γ -globulinele, hormonii, enzimele, precum și proteinele care intră în componența celulelor și țesuturilor organismului. Unele dintre ele au o importanță practică majoră: *antigenii de histocompatibilitate*, a căror sinteză este sub controlul genelor *MHC* responsabile de conferirea *individualității* antigenice a țesuturilor fiecărui individ, al celor de *grupa sangvină* (sistemele AB0, Rh, Kell-Cellano, MNS etc.), al unor Ag de la nivelul membranei limfocitelor sau macrofagelor, care constituie markeri pentru acestea etc. Gradul de imunogenitate depinde de structura sterică a Ag, de genotipul organismului: unii Ag induc răspunsul imun imens, pe când alții sunt slab imunogeni, aceasta având importanță practică, în special la vaccinare.

Polizaharidele se găsesc sub formă de poliozide liniare sau ramificate. Lanțul specific lateral conferă specificitate antigenică moleculei. Polizaharidele purificate au putere imunogenă slabă. Dextranii, deși au MM mare, fiind secretați de către *Leuconostoc mesenteroides*, sunt în anumite condiții imunogeni. În combinații moleculare cu lipidele și proteinele, stimulează formarea de anticorpi cu specificitate față de hidrații de carbon.

Lipidele sunt slab antigenice, dar pot avea calități de haptene, mai ales când sunt cuplate cu anumite proteine, situație în care se pot obține Ac anticolesterol, antilectină, anticefalină etc. Mai bine studiate sunt proprietățile antigenice ale cardiolipinei, care este utilizată în diagnosticul imunologic al luesului. Lipidele conferă proprietăți antigenice și funcționale lipopolizaharidelor (LPS), endotoxinelor germenilor Gram-negativi etc.

Acizii nucleici (ADN și ARN) sunt macromolecule slab imunogene în mod obișnuit, dar pot induce sinteza de Ac atunci când formează complexe cu unele polizaharide sau proteine (existența Ac anti ADN mono- sau dublu catenar în LES).

Lipopolizaharidele (LPS) sunt complexe macromoleculare din componența peretelui celular al germenilor Gram-negativi, alcătuite din fosfolipide și polizaharide. Complexul se leagă de structura rigidă a peretelui bacterian prin lipida A. În acest complex, lipida A reprezintă regiunea care conferă proprietăți endotoxice, de stimulator al funcțiilor macrofagelor, activator policlonal al limfocitelor. În doze mici induce pirogenitate datorită activării macrofagelor și eliminării de către ele a IL-1, TNF- α și altor citokine, activarea policlonală timo-independentă a limfocitelor B și sinteza de Ac, degranularea granulocitelor, agregarea trombocitelor. Se poate lega cu diverse celule ale organismului, în special cu macrofagele. În doze mari inhibă fagocitoza, induce toxicoza, dereglări ale funcției cardiovasculare, tromboze, șocul endotoxic. LPS unor bacterii sunt componente imunostimulante (prodighiosan, pirogenal).

Lectinele sunt Ag ubicvitari, prezenți la animale, bacterii și, în special, la plante. Sunt proteine sau glicoproteine care leagă diferite molecule de hidrați de carbon.

Exercită diferite efecte asupra limfocitelor (leucoaglutinare, blastogeneză, stimularea eliberării unor mediatori sau proteine efectoare etc.). Prezența receptorilor de membrană (106-107) pe limfocite și recunoașterea diferențiată a diferitor tipuri de celule permit separarea și studierea unor populații ale sistemului imun (Conconavalina A - ConA, Peanut agglutinin – PNA etc.).

Peptidoglicanele (mureina, mucopeptida) peretelui celular al bacteriilor posedă efecte imense de adjuvanți ai celulelor sistemului imun, intensificând răspunsul nespecific la diferiți Ag. Ele activează macrofagele prin intermediul receptorilor pentru serotonină.

Organismul uman conține un număr foarte mare de Ag care-i determină specificitatea de specie, grupă. Dintre aceștia, mai importanți sunt *antigenii eritrocitari, leucocitari și tisulari*.

Antigenii eritrocitari pot fi împărțiți în 3 grupe mari: a) antigeni heterofili, care, în afară de om, se găsesc și la alte specii; b) antigeni de specie, comuni tuturor oamenilor, și c) antigeni de grupă sau aloantigeni, specifici unor grupe de indivizi și absenți la alte grupe. Dintre Ag eritrocitari, mai importanți sunt cei ai sistemului AB0, Rh, MNS, Kell, Lewis etc. Antigenii eritrocitari sunt proteine (Ag sistemului Rhesus, Kidd, Diego, Colton), glicoproteine (sistemul MNS, Gerbich, Lutheran) sau glicolipide (Ag sistemului AB0, H, Lewis, I). Structura schematică a Ag eritrocitari și amplasarea lor pe membrana eritrocitelor este elucidată în fig.3.

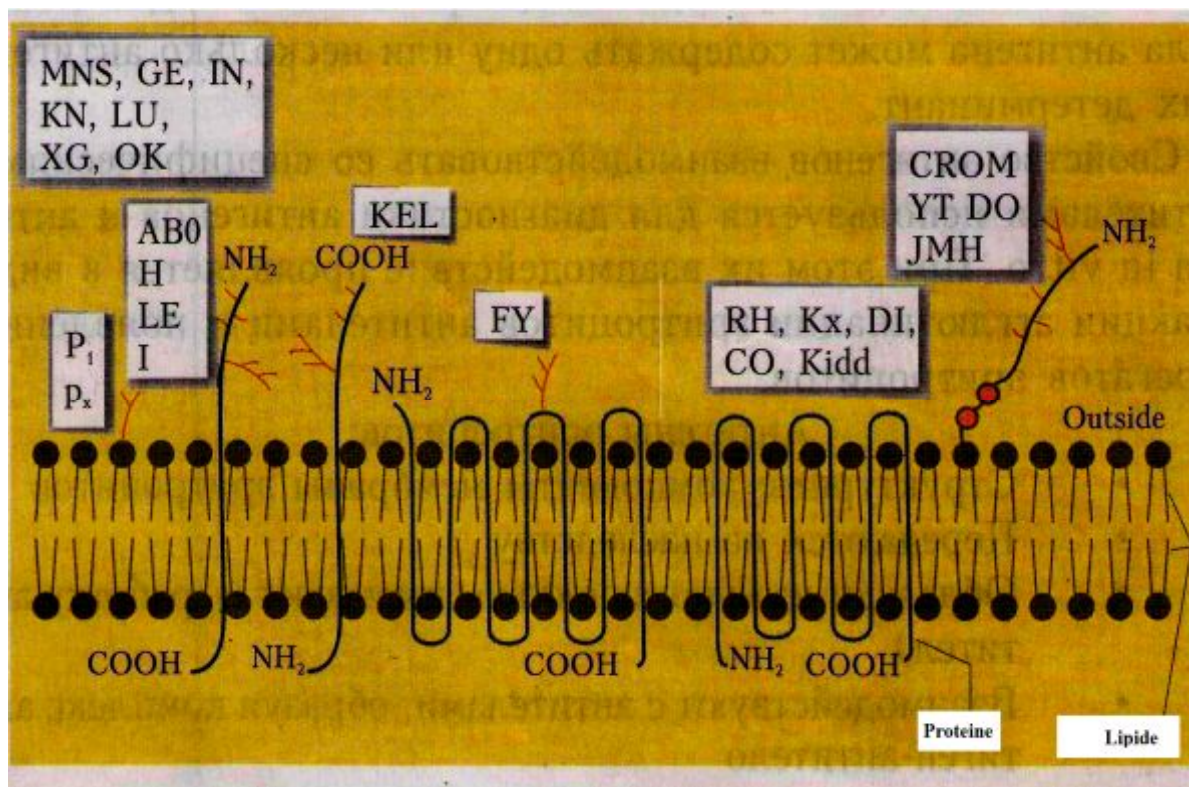


Figura. 3. Amplasarea antigenilor pe membrana eritrocitelor
Ag eritrocitare sunt repartizate în sisteme, colecții și serii (tab. 2)

Sistemele de antigene eritrocitare (ISBT, 1980)

Codul sistemului	Denumirea sistemului	ISBT, simbolul sistemului	Denumirea genei și ancorarea ei pe cromozom	Numărul de antigene în sistem
001	AB0	AB0	<i>AB0</i> , 9q34.1-q34.2	4
002	MNS	MNS	<i>GYPA</i> , <i>GYPB</i> , <i>GYPE</i> 4q28-q31	43
003	P	P1	<i>P1</i> 22q11.2-qter	1
004	Rh	RH	<i>RHD</i> , <i>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
009	Kidd	JK	<i>JK</i> 18q11-q12	3
010	Diego	DI	<i>AE1</i> 17q12-q21	21
011	Yt (Cartwright)	YT	<i>ACHE</i> 7q22	2
012	Xg	XG	<i>XG</i> Xp22.32	1
013	Scianna	SC	<i>SC</i> 1p36.2-p22	4
014	Dombrock	DO	<i>DO</i> Nu se cunoaște	5
015	Colton	CO	<i>AQP1</i> 7p14	3
016	Landsteiner- Wiener	LW	<i>LW</i> 19p13.2-cen	3
017	Chido-Rodgers	CH/RG	<i>C4A</i> , <i>C4B</i> 6p21.3	7
018	Hh	H	<i>FUT1</i> 19q13	1

019	Kx	XK	<i>XK</i> <i>Xp21.1</i>	1
020	Gebrich	GE	<i>GYPC</i> <i>2q14-q21</i>	7
021	Cromer	CROM	<i>DAF</i> <i>1q32</i>	11
022	Knops	KN	<i>CR1</i> <i>1q32</i>	8
023	Indian	IN	<i>CD44</i> <i>11p13</i>	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

Pe granulocitele neutrofile au fost identificate 3 grupe antigenice: NA1 (HNA1a), NA2 (HNA-1b), SH (HNA-1c), de asemenea, NB1, NC1, ND1, NE1, HGA-3a, b, c, d, e. Mai rar sunt identificate GA, GB, GC, GR. În absența antigenilor HNA la mamă și prezența lor la făt (moșteniți de la tată), la ea apar Ac de clasa IgG anti acești Ag, neutropenia aloimună a nou-născutului.

Pe limfocite a fost identificat un sistem de molecule antigenice leucocitare HLA (*Human Leucocyte Antigen*) controlate de genele *MHC* (*Major Histocompatibility Complex*). Sunt proteine ale membranei celulare cu specificitate individuală. Funcțiile principale ale Ag HLA sunt: participarea în recunoașterea Ag exogeni, în cooperările intercelulare și formarea răspunsului imun; aprecierea predispoziției la diferite maladii; markeri ai „propriului”; induc reacții de regrefare a Ag incompatibili ai țesuturilor transplantate ale donatorilor incompatibili. Genele *MHC* apreciază specificitatea și intensitatea răspunsului imun. Moleculele HLA autologe nu sunt antigenice pentru organism și realizează funcția de receptori pentru recunoașterea primară a antigenilor.

Trombocitele posedă mai mult de 20 de molecule antigenice diferite (HPA-1, -2, -3, -4, -5 etc.), care pot fi identificate prin utilizarea anticorpilor. Ele sunt asociate cu integrele și pot fi cauza trombocitopeniilor aloimune la nou-născuți și la transfuzia plasmei sangvine (anticorpi) la adulți.

Antigenii endogeni (autologi). În condiții de normă există autoanticorpi în concentrații mici la autoantigenii organismului uman. În cazul modificării conformaționale a moleculelor proprii, la dereglarea mecanismelor de supresie a reacțiilor autoimune (dereglarea autotoleranței) sunt secretați anticorpi și celule T imune, care reacționează cu autoantigenii, inducând alterarea tisulară și a organelor care conțin

acest Ag. O variantă de autoantigeni sunt cei „patologici” ce apar în urma arsurilor, acțiunii radiației radioactive etc. Antigenii exogeni pot participa la formarea autoantigenilor prin modificarea structurilor macromoleculare ale organismului. Există Ag naturali primari (cristalinul ochiului, țesutul nervos etc.), dobândiți secundari (produsele alterării țesuturilor de către microbi, virusuri) sau complexe Ag microbial+Ag tisular, Ag a frigore, sau al arsurilor, de iradiere etc.

După apartenența tisulară și celulară, sunt evidențiate următoarele tipuri de substanțe organo-specifice și specifice țesuturilor care pot fi Ag: stromali (Ag fibrelor elastice, colagenului etc.), celulari (membranari, citoplasmatici, nucleari etc.), autoantigenii extracelulari (Ag fluidului intertisular, lichidului intercellular, etc.).

Competiția antigenică este o inhibiție a răspunsului imun față de un stimul antigenic, indusă de către alt stimul atunci când un Ag este inoculat în anumite raporturi cu un alt antigen. Competiția poate fi *intramoleculară*, *intermoleculară* sau *secvențială*. În cazul competiției intramoleculară, partea mai imunogenă a moleculei de Ag deprimă răspunsul imun față de cea mai puțin imunogenă. De exemplu, fragmentul Fc al moleculei de Ig este mai imunogen, concurând cu fragmentul Fab. Anticorpii anti-Fab se obțin mai greu decât cei anti-Fc. Competiția intermoleculară se înregistrează la diferite molecule de Ag, una dintre ele depresând răspunsul față de celălalt. De exemplu, globulinele serice sunt mai bune imunogene, concurând cu albumina serică. A treia formă de competiție este cea secvențială, fiind de altfel și cea mai importantă din punct de vedere practic, deoarece se realizează în timpul vaccinărilor. De obicei, primul Ag inoculat concurează cu cei inoculați la anumite intervale de timp după vaccinare. Inhibiția realizată pentru Ag competițional ar putea fi explicată prin prezența moleculelor de Ac cu afinitate mai mare pentru epitopi, prin existența de Ac anti-determinantul antigenic supresat, prin generarea de către primul Ag a proliferării unor limfocite sau monocite supresoare etc.

Cunoașterea mecanismelor care conduc la competiția antigenică are o mare importanță practică, deoarece pe baza acestor noțiuni se pot folosi scheme de vaccinare fundamentate științific, se pot face imunizări multiple pentru obținerea unor seruri imune sau se pot face asociații de vaccinuri polivalente, care să dea mai bune rezultate atunci când sunt inoculate în scop preventiv, pentru vaccinarea populației.

Imunoglobulinele (Ig) prezintă o grupă de proteine înrudite cu funcții de anticorp (Ac), care există sub formă de molecule libere sau de receptori pe membrana limfocitelor B-efectoare. La electroforeză, Ig migrează în mare parte în zona γ -globulinelor și mai puțin în cea a globulinelor β . Sinteza lor este realizată de către limfocitele B ajunse în faza de maturare finală (plasmocit). Se găsesc în plasmă, în lichidele extravasculare și în diferite secreții exocrine. O parte din molecule se fixează citofil pe receptorul pentru Fc de pe membrana macrofagelor, limfocitelor B, granulocitelor PMN, mastocitelor, bazofilelor etc.

Termenul de imunoglobulină se utilizează pentru semnificația unei proteine structurale tipice, iar termenul anticorp pentru accentuarea funcțiilor – interacțiunii specifice de legare cu epitopul antigenic. Imunoglobulinele se deosebesc de globulinele serice normale prin capacitatea de reacție specifică cu Ag care le-a determinat sinteza, prin sensibilitate la unele enzime (pepsină, tripsină), prin constanta de sedimentare, viscozitate etc. Moleculele de Ig fixează complementul (C), activează fagocitoza prin mecanisme opsonice și pot străbate diferite bariere ale organismului. Ele se împart în clase, subclase și diferite subtipuri antigenice (fig.4). Structural, molecula de Ig monomeră este formată din două lanțuri grele H (*Heavy*) și două lanțuri ușoare L (*Light*), unite prin legături disulfidice și necovalente. Există și punți disulfidice intercatenare și intracatenare, care leagă un lanț H de unul L (L-H), precum și între lanțurile L (L-L), H (H-H). Fiecare lanț este constituit din porțiuni globulare compacte denumite domenii: două pentru lanțul L (V și C) și 4 pentru lanțul H (V, C1, C2 și C3). Există două tipuri de lanțuri ușoare: κ -(kappa) și λ (lambda). Lanțurile H se deosebesc prin proprietățile sale antigenice și apreciază clasa imunoglobulinelor: μ (miu) pentru IgM, γ (gama) pentru IgG, α (alfa) pentru IgA, ϵ (epsilon) pentru IgE, δ (delta) pentru IgD. Lanțurile H și L conțin regiuni variabile (V_H și V_L) și constante (C_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} și C_{H4} pentru IgM și IgE). Enzima papaina scindează molecula Ig în 3 fragmente, dintre care două leagă antigenul – fragmentele Fab (*Fragment Antigen Binding*) și unul care cristalizează – fragmentul Fc (*Fragment Crystallizable*).

Situsul combinativ (SC), situat la extremitatea NH_2 terminală a fragmentelor Fab, este locul prin care molecula Ig recunoaște și leagă specific epitopul Ag. El se compune din ariile variabile și hipervariabile de pe V_H și V_L . Secvența aminoacidă are un grad diferit de variabilitate: cele mai puțin variabile au fost denumite „regiuni cadru” sau FR (*Frame Work* = cadru) și au rol în menținerea stabilității lanțului, iar cele hipervariabile – „regiuni de determinare a complementarității” sau CDR.

Legarea situsului combinativ cu epitopul Ag este asigurată de adeziunea structurilor în baza interacțiunilor fizico-chimice. Regiunea „balama” constituie o secvență care unește fragmentele C_{H1} cu C_{H2} ale lanțurilor grele și care conferă rigiditate moleculei, permițând fragmentelor Fab să se orienteze în spațiu în diferite poziții. Când molecula Ig leagă Ag, domeniul C_{H2} al fragmentului Fc leagă complementul, iar domeniul C_{H3} conferă moleculei posibilitatea de a se lega cu receptorii Fc ai leucocitelor etc.

Imunoglobulinele sunt heterogene din punctul de vedere al specificității lor: *izotipice* – prezente la toți indivizii unei specii și exprimate în clase și subclase de Ig; *alotipice* – definesc caracterul antigenic particular al acestora, apărut la un grup de indivizi din cadrul aceleiași specii, ca urmare a unor modificări minore în secvența aminoacizilor de la nivelul regiunilor constante ale lanțurilor H sau L (Gm, Am, InV, ISF etc.); *idiotipice* – exprimă o enormă varietate de specificități secretate de un individ.

Caracteristica claselor de imunoglobuline cu proprietăți funcționale particulare este elucidată în tab 2.

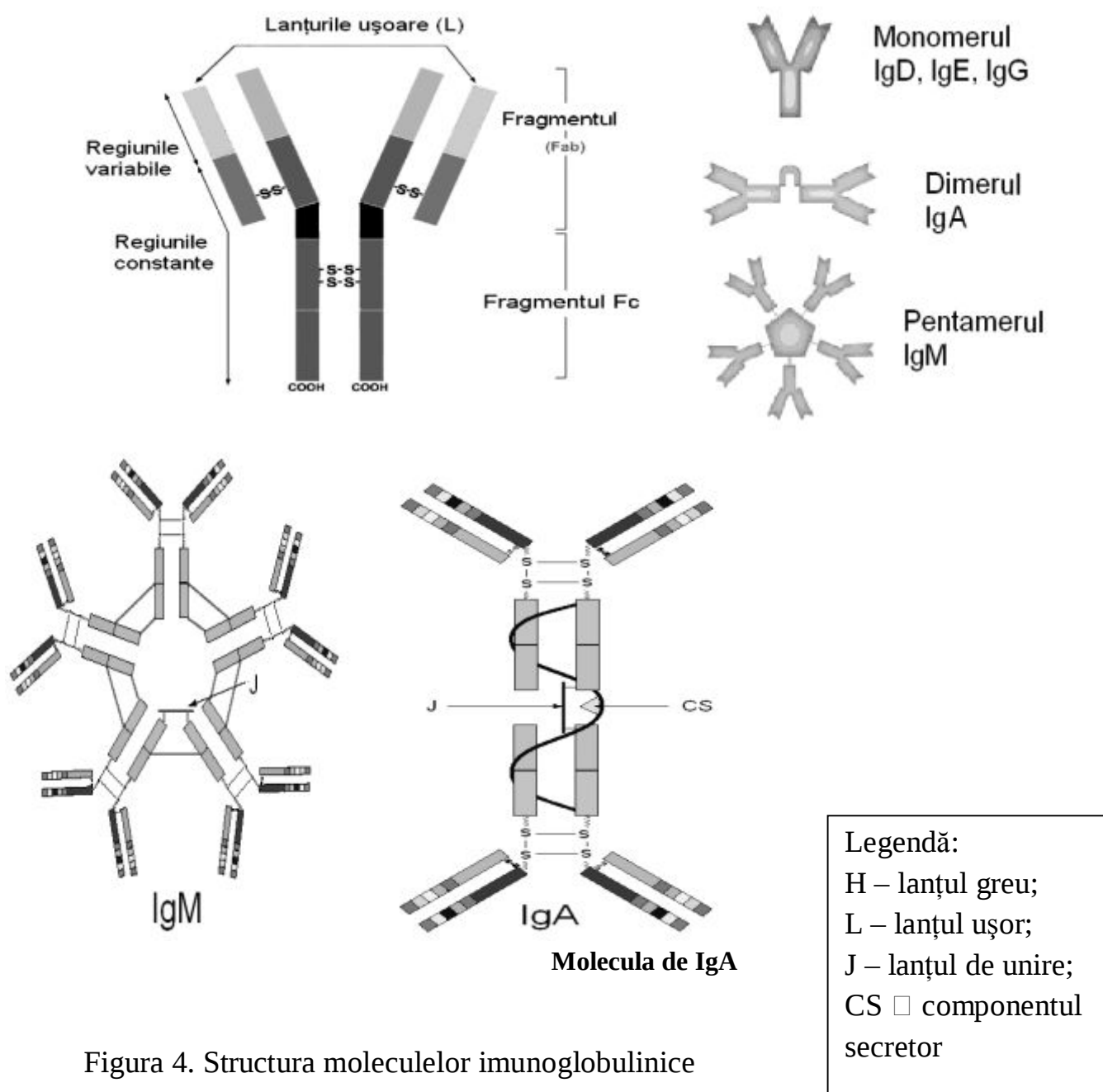


Figura 4. Structura moleculelor imunoglobulinice

Tabelul 2

Proprietăți imunobiologice și fizico-chimice ale diferitor clase de imunoglobuline

Proprietăți	Clasa de imunoglobuline				
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Lanțul greu este de tip	γ	α	μ	δ	ϵ

Formula moleculară		γ_2k_2 sau $\gamma_2\lambda_2$	α_2k_2 sau $\alpha_2\lambda_2$ și $(\alpha_2k_2)_2+J+CS$ sau $(\alpha_2\lambda_2)_2+J+CS$	$(\mu_2k_2)_5+J$ sau $(\mu_2\lambda_2)_5+J$	δ_2k_2 sau $\delta_2\lambda_2$	ε_2k_2 sau $\varepsilon_2\lambda_2$
Concentrația în ser (g/l)		8-12	1,4-4,0	0,5-1,9	0,03-0,4	0,0001
Greutatea moleculară (kDa)		150-160	170 în ser, 400 în secteții	900	185	190
Concentrația extravasculară (%)		60	60	20	25	50
Coeficient de sedimentare (S)		7	7; 9; 11	19	7	8
Greutatea lanțului H (kDa)		53	56	65	69	72
Numărul domeniilor lanțului H		3	3	4	3	4
Hidrați de carbon (%)		2-5	8-10	10-12	12-15	11-12
Numărul subclaselor		4	2	-	-	-
Numărul situsurilor combinate (valența)		2	2, 4, 6	5 sau 2	2	2
Prezența lanțurilor de unire J		-	+	+	-	-
Prezența componentului secretor (CS)		-	+(secretorii)	-	-	-
Rezistența la temperatura +56°C		+	+	+	-	-
Rezistența la 2-mercaptoetanol		++	+/-	-	++	-
Determinante izotopice (subclase)		1; 2; 3; 4	1; 2	-	-	-
Determinante alotipice:	Gm (H)	+	-	-	-	-
	InV(L)	+	+	+	-	-

	Am	-	+	-	-	-
Sinteza (mg/kg/zi)		30	8 – 27	6 – 8	0,4	?
Catabolism (%/zi)		3	12	14	?	2, 5
Perioada de înjumătățire (zile)		21 (la IgG3=7)	7	5, 1	2,8	2, 3
Capacitatea de fixare a complementului (calea clasică)		+ (IgG4 nu)	-*	++	-	-
Pasajul transplacentar		+	-	-	-	-
Legarea la receptorul Fc de pe	macrofage	+	-	-	-	-
	mastocite	-	-	-	-	+
	limfocite	+	+	+	?	-
Legarea SPA (proteinei A)		+	-	-	-	?
Notă: * IgA activează C pe cale alternativă. CS – componentul secretor; J – lanțul de unire						

Imunoglobulinele clasei M (IgM) reprezintă cca 5-10% din totalitatea imunoglobulinelor circulante (macroglobulina serică). IgM constă din 5 monomere ($\mu_2\kappa_2$ sau $\mu_2\lambda_2$) unite prin punți disulfidice și un lanț de unire suplimentar J (Joining chain), care conferă aspectul de stea sau de masă cu piciorușe, cu 10 situsuri de combinare situate la periferia pentamerului. Gradul de glicolizare este major. IgM activează pe cale clasică C prin fixarea componentelor C1q la C_{H2}, fiind de 100 de ori mai eficientă decât IgG în citoliza celulelor. Sunt Ac aglutinanți și neutralizanți ai Ag particulare (de ex. hemaglutininele anti-A și anti-B). IgM este prima clasă de Ig produsă de plasmocite și principala clasă care apare în răspunsul imun primar. Predomină în ser (volumul mare nu-i permite trecerea în spațiile extravasculare sau transplacentar), dar poate fi secretată în mucoase, unde asigură protecția acestora. Forma monomerică membranară a IgM (mIg) constituie receptorul pentru Ag al limfocitelor B. IgM în forma monomerică se găsesc în ser în concentrații foarte mici, care însă cresc în unele stări patologice (macroglobulinemiei Waldenström, infecția citomegalovirală, toxoplasmoza etc). Creșterea considerabilă a IgM monoclonale în ser și tendința de polimerizare conduc la instalarea unui „sindrom de hiperviscositate”, care de multe ori poate fi fatal pentru pacienți (macroglobulinemia Waldenström).

Imunoglobulinele clasei G (IgG) apar în cantități majore în răspunsul imun secundar, constituie 70-85% din totalul imunoglobulinelor. Moleculele de Ac IgG, care apar în cursul stimulului antigenic secundar sau prin comutare după stimulul primar, inhibă sinteza Ac din clasa IgM printr-un proces de *reglare inversă* (sau feedback) concurând cu Ag. Este unicul Ac care traversează placenta și asigură protecția antiinfecțioasă la făt și apărarea la nou-născut, dar poate induce și procese imunopatologice în cazul conflictului dintre mamă și făt. Conține glucide (sunt glicoproteine). La om există 4 tipuri de lanțuri γ cu diferențe structurale și funcționale minore, denumite γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , care formează subclasele IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, coraportul procentual al lor fiind de 60:20:15:5. Sinteza diferitor subclase de IgG este condiționată de natura Ag, de ex. cofactorul VIII stimulează sinteza IgG4, AgD (Rh) al celor IgG1 și IgG3, iar toxina difterică și tetanică – a celor IgG1. La legarea cu Ag IgG activează C pe calea clasică. Preparatele de IgG (purificate) sunt utilizate în scop substituent la deficitul lor și în cazul infecțiilor severe. Pe de altă parte, ele sunt utilizate în terapia maladiilor alergice și autoimune datorită supresiei răspunsului imun.

Imunoglobulinele clasei A (IgA) constituie 15-20% din totalul Ig din circulația sangvină. Sunt prezente în serul sangvin (în formă monomerică, serică) și în secrețiile mucoaselor (secretorie, în formă de dimer și trimer). Ultimele dispun de lanțul J care unește 2 sau 3 monomere și componentul secretor (SC) într-o moleculă unică. Componentul secretor este o glicoproteină secretată de celulele epiteliale care asigură transportul IgA prin epiteliu și rezistența la enzimele proteolitice din diferite secrete. IgA secretorie (sIgA) asigură imunitatea locală, blochează adeziunea microorganismelor la epiteliul mucoaselor, opsonizează celulele microbiene, neutralizează unele toxine, intensifică fagocitoza, aglutinează microbii (bacterii, fungi).

Concomitent sIgA frânează adsorbția și reproducția virionilor în celulele epiteliale. În diferite secrete ale organismului uman, sIgA se găsește în concentrații diverse (mg%): 28 – în salivă, 151 – în colostru, 7 – în lacrimi, 10-70 – în secrețiile bronșice, 75 – în intestinul subțire, 50 – în vezicula biliară, 25 – în prostată, 6 – în secretele vaginale. Spre deosebire de aceste secrete unde predomină sIgA, în altele (lichidele sinoviale, amniotic, pleural, cefalorahidian etc.) predomină IgG, raportul IgG/IgA fiind de cca 5/1. IgA secretorie posedă o capacitate bactericidă mare, fiind de 8 ori mai activă față de E.coli decât IgM și de 25 de ori decât IgG. Ele au un mare rol în apărarea locală antivirală. Copiii se nasc fără IgA serică, însă o primesc prin laptele matern, care conține IgA în concentrații majore. Sinteza proprie a IgA începe cam la 30 de zile de la naștere. De aceea, copiii sugari care se alimentează natural cu lapte matern sunt mai puțin expuși la infecțiile intestinale și respiratorii, în comparație cu cei cu rația alimentară mixtă sau artificială. Indivizii cu deficit IgA (cca 1 la 700 de subiecți) sunt susceptibili la boli autoimune, la infecții respiratorii, gastrointestinale etc. În serul acestora, nivelul IgG și IgM se menține în limite normale. Ambele subclase de IgA (IgA1 și IgA2) sunt mult mai rezistente comparativ cu alte Ig la digestia proteolitică,

ceea ce le conferă un avantaj considerabil pentru supraviețuirea lor în lichidele biologice și secretele care conțin enzime proteolitice. Complexele Ag-IgA pot activa C pe cale alternativă.

Clasa imunoglobulinelor D (IgD) se găsește în serul sangvin în concentrații foarte reduse (cca 40 mg/l) și constituie 1% din totalul imunoglobulinelor. În plasma sangvină există sub formă de molecule solubile (0,03-0,4 g/l) și sub formă de receptori pentru Ag pe membrana limfocitelor B. Imunoglobulina D nu fixează complementul, nu traversează placenta, nu provoacă degranularea mastocitelor. Concentrația IgD crește în ser de la naștere până la 15 ani, după care rămâne constantă pe parcursul vieții, cu excepția unor stări patologice ca astmul bronșic, boala reumatoidă, maladia Hodgkin, leucemia limfatică cronică, LES, mielomul IgD unde se înregistrează valori mai mari. Pragul IgD seric crește în serul femeilor gravide, mai accentuat în momentul expulziei fătului, precum și în unele infecții la copii. Au fost identificați Ac IgD față de penicilină, insulină, toxina difterică, lactoproteine etc.

Imunoglobulina clasei E (Ac reaginici sau Ac sensibilizanți ai pielii) se găsește în ser în cantități extrem de mici (0-100 UI/ml), în formă monomerică. Concentrația IgE crește semnificativ în alergie (astmul bronșic, polinoze, urticarie, eczeme atopice etc.) și în invaziile parazitare (ascaridoză, toxocaroză, lamblioza, echinococoza etc.). În colostru concentrația imunoglobulinei E este crescută, de ordinul sutelor de nanograme, dar ulterior în laptele matern scade, rămânând la valori crescute numai la mamele cu maladii alergice. Este termosensibilă (denaturarea la 56°C timp de 30 de minute), se leagă citofil la receptori FcεRI de pe membrana mastocitelor, bazofilelor, inducând degranularea acestora și eliberarea de amine vasoactive (histamină, serotonină, SRS-A etc.) atunci când sunt legate încrucișat de Ag (alergeni). Este responsabilă de fenomenele inflamatoare din alergii (hipersensibilitate de tip imediat I). Prin intermediul receptorilor FcεRII (CD 23) de pe monocite și macrofage, IgE mediază reacțiile citotoxice față de paraziți și fagocitoza particulelor de către monocite. Complexele imune cu IgE nu activează complementul.

Nou-născutul conține în sânge numai IgG de origine maternă (8-10 g/l), nivelul căruia scade la a 3-a – a 5-a lună de viață (până la 5 g/l), ulterior crește din contul sintezei proprii. Cantitatea de IgM este minoră (0,02-0,1 g/l) cu majorarea ei la 1 an. IgA și IgE sunt absente. La vârsta de 2 ani, nivelul tuturor Ig este apropiat de valorile normale ale adulților, dar concentrațiile anologice maturilor se constată la vârsta de 10 ani.

Concluzionând materialele elucidate asupra Ig (Ac), menționăm faptul utilizării lor în practica medicală. Sunt utilizate ca substituenți imuni în deficitale congenitale (hipogamaglobulinemia, sindromul de imunodeficiență combinată – SCID, deficit izolat de IgA și/sau IgG), imunodeficiențele secundare (hipogamaglobulinemia tranzitorie a prematurului sau nou-născutului, infecția cu HIV, hipogamaglobulinemia din maladiile limfoproliferative cu risc crescut de infecții, hipogamaglobulinemia datorată unui

consum excesiv, infecțiile septice acute după arsuri). În scop profilactic sau terapeutic, sunt utilizate în infecțiile bacteriene (difterie, tetanos), virale (rubeolă, varicelă etc.), contra toxinelor produse prin mușcături de viperă sau înțepături de insecte etc. Administrarea unei cantități mari de Ig i.v. se realizează pentru producerea unei imunodepresii în sinteza de autoanticorpi în bolile autoimune (purpura trombocitopenică autoimună, idiopatică, neutropenia autoimună, anemia autoimună, artrita reumatică juvenilă, poliartrita reumatoidă, dermatomiozita, polineuropatia cronică demielinizantă), alergice (IgG4).

Se mai disting anticorpi *naturali* și *imuni*. Cei naturali se găsesc în organism fără imunizare prealabilă (de ex., anticorpii anti-A și anti-B antieritrocitari, cu referire prioritară la IgM). Se întâlnesc Ac naturali cu activitate antimicrobiană – factori ai imunității naturale și de specie. Acești Ac-IgM sunt produse ale subpopulației limfocitare B-1. În cantități minore în sânge există și „Ac normali” capabili să interacționeze cu Ag proprii ai organismului (Ac autologi), care stimulează diferențierea celulară. Anticorpii imuni apar în serul sangvin după imunizarea cu Ag (izoantigeni, autoantigeni, bacterii, virusuri, protozoare, fungi, toxine, etc.).

În funcție de temperatura optimală de interacțiune cu Ag, se cunosc Ac *a frigore* și calzi. Anticorpii *a frigore* manifestă activitate citotoxică la temperatura de 3-15°C în prezența complementului. Mai frecvent aparțin IgM cu activitate antieritocitară, antileucocitară. Anticorpii la cald au temperatura de acțiune optimă între 20°C și 37°C. Anticorpii, care dispun de 2 și mai multe situsuri combinate, sunt numiți *compleți*, iar cei cu un singur centru activ de legare a Ag – *incompleți*. Mecanismele de acțiune ale Ac sunt diverse și includ: neutralizarea centrelor active ale toxinelor (efect neutralizant); formarea complexelor Ag-Ac cu activarea C și liza ulterioară a celulei (efect lizant); opsonizarea obiectelor de fagocitoză (intensificarea fagocitozei); legarea cu receptorii Fc ale leucocitelor care obțin capacitatea de interacțiune specifică cu Ag (efectul „armant” al Ac); Ac anti-receptori la legarea cu receptorul corespunzător blochează sau stimulează funcția celulei (efect blocant sau stimulator); Ac posedă activitate enzimatică și pot scinda lent unele substraturi (activitate abzimă). La imunizarea cu Ag, în serul sangvin apare un spectru larg de Ac cu diversă afinitate ca rezultat al stimulării diferitor clone celulare B. Astfel, anticorpii imuni policlonali și serul obținut conțin un amestec de imunoglobuline de diferite clase.

Complexele imune se formează la interacțiunea situsurilor combinate (paratop) ale Ac cu epitopii Ag în mediu neutru (pH 7,2-7,3). La modificarea pH mediului (acid sau bazic), complexe imune disociază în molecule libere de Ag și Ac. Interacțiunea Ag cu Ac induce fenomene de aglutinare, precipitare și liză. Complexele imune activează C pe cale clasică prin legarea componentului C1q cu fragmentul Fc (domeniul C_{H2}) al IgG sau IgM. Dacă acești Ac au specificitate anti-antigeni membranari, atunci celula va fi lizată. Complexele imune leagă receptorul CR1 al eritrocitelor, fiind

utilizate în splină, sau receptorii Fc al leucocitelor (neutrofile, macrofage), fiind fagocitate și scindate. În cazul acumulării lor patologice, apar reacții imune complexe.

Anticorprii monoclonali au fost elaborați în baza tehnologiei hibridomei somatice. Au specificitate restrânsă numai față de un singur epitop al Ag. Pentru obținerea lor, șoarecii sunt imunizați cu Ag (celule sau forma solubilă), iar din splina lor este recoltată suspensia celulară (fig. 5).

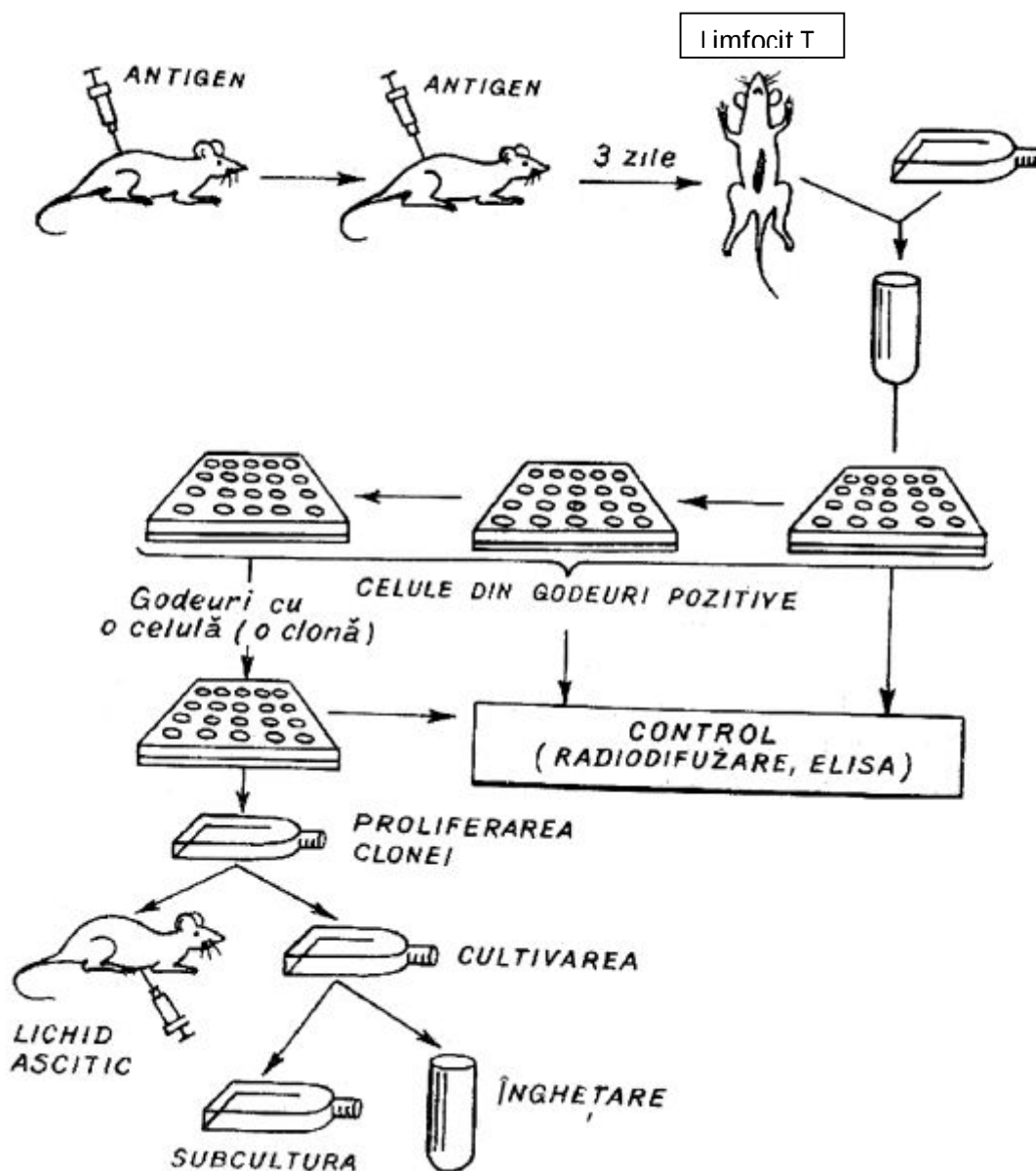


Figura 5. Principiul producerii anticorpilor monoclonali

Limfocitele B din suspensia obținută au funcția de secreție a anticorpilor. După fuzionarea celulelor B obținute cu celulele neoplazice ale plasmocitomului murin cu capacitate de multiplicare și proliferare intensă, se adaugă mediul de cultură HAT (hipoxantină, aminopterină și timină) în care celulele neoplazice vor pieri din cauza deficitului de hipoxantinfosforiltransferază. Celulele normale, care n-au capacitatea

de multiplicare a celor neoplazice, mor în cursul pasajelor următoare, rămânând viabile doar numai celulele hibride, care au moștenit atât capacitatea de proliferare, cât și cea de catabolizare a hipoxantinei. Acestea sunt dispersate în plăci cu godeuri, distribuindu-se câte o singură celulă în fiecare godeu. După timpul necesar proliferării celei, deci a proliferării unei clone celulare, se determină natura Ac sintetizat și eliberat în mediul de cultură. Se selectează clona dorită care se multiplică *in vitro* în continuare, după care se inoculează intraperitoneal la șoarece, unde va prolifera și va sintetiza Ac de unică specificitate (la un epitop al Ag). Anticorpii monoclonali (AcMo) au oferit un procedeu de diagnostic important pentru detecția markerilor populațiilor celulare, hormonilor, mediatorilor, Ag bacteriilor, virionilor etc. Au fost obținute și heterohibridoame (celulă umană formatoare de Ac + celula B neoplazică murină) care produc Ac umanizați anti-Ag respectivi.

Cvadroma sunt celule care apar la fuzionarea a 2 hibridoame. Ele secretă Ac bifuncționali cu centre active la diferite Ag.

Anticorpii himerici sunt Ac artificiali în care partea constantă a lanțurilor este sintetizată de genele umane, iar cea variabilă – de genele hibridomului murin. Mai există molecule de imunoglobuline *omogene* normale și patologice. Este cazul polizaharidelor pneumococice formate din simple unități repetitive, care induc formarea de Ac omogeni în concentrație ridicată, similari celor din proteinele mielom.

Imunoglobulinele patologice apar în cazul proliferării neoplazice a unei clone de limfocite, care secretă Ac spontan cu o specificitate unică față de un anumit epitop. În multe cazuri de afecțiuni limfoproliferative pot să apară în circulație cantități mari de lanțuri H sau L incomplete ori unite în fragmente anormale, similare prin modul de sinteză a proteinelor mielom. Dintre acestea mai cunoscute sunt proteinele Bence-Jones și fragmentele de lanțuri α , β , μ identificate în sângele sau urina pacienților cu mielom sau limfoame maligne. Proteinele Bence-Jones sunt dimeri de lanțuri ușoare de tip L κ sau L λ , eliminate în urina bolnavilor cu mielom sau macroglobulinemie. Sunt proteine omogene sintetizate de către limfocitele maligne, aparținând unei clone. Dimerul Bence-Jones ar fi o imunoglobulină primitivă cu o funcție biologică, respectiv specificitate de anticorp necunoscută.

Lanțurile grele patologice apar în limfomul malign al intestinului subțire și în patologia asociată cu sinteza proteinelor Bence-Jones. Este cazul absenței domeniului C_{H1}, pe când sinteza lanțurilor L este absolută. Hiperproducția lanțurilor grele anormale și depozitarea lor în țesuturi poate conduce la amiloidoză. Nivelul lor în sânge este mai mare de 20 g/l. Crioglobulinemia este însoțită de sinteza Ig, care precipitează la temperaturi joase și se constată în mielom, maladiile autoimune, infecții, leucemii etc.

Sinteza imunoglobulinelor are caracteristici particulare și include următoarele etape: sinteza lanțurilor polipeptidice, asamblarea moleculei, adiția componentelor glucidice, polimerizarea și eliminarea moleculelor de imunoglobulină, comutarea

sintezei moleculelor de Ig. Toate aceste procese sunt sub controlul genetic atât din punct de vedere al sintezei lanțurilor, cât și al asamblării moleculelor de imunoglobuline.

Antigenii care au pătruns în organism circulă în torentul sangvin cca 24 de ore, ulterior cantitatea principală depozitându-se în ganglionii limfatici. Răspunsul imun la Ag, de regulă, finisează cu acumularea Ac, LT imune și stabilirea memoriei imunologice. Însă această reacție poate avea caracter abortiv, incomplet, dacă Ag este slab imunogen sau celulele și factorii umorali ai rezistenței nespecifice (macrofagele, NK, complementul etc.) l-au eliminat rapid. Stimularea naturală cu Ag convențional-patogeni persistenți pe piele și mucoase conduc la menținerea de fond a proliferării celulelor SI, iar celulele B secretă unele imunoglobuline. Numai stimularea antigenică imensă induce răspunsul imun evident, care include toate etapele de interacțiune a celulelor sistemului imun. După primul contact cu Ag, limfocitelor B încep să sintetizeze imunoglobuline cu funcție de Ac, sinteză care se desfășoară în patru etape distincte: faza de latență, de creștere exponențială sau „logaritmică”, de stagnare și de declin. În faza de latență are loc recunoașterea Ag străin, fagocitarea, procesarea și prezentarea lui de către celulele APC limfocitelor Th cu activarea celulelor B și sinteza de Ac. Durata acestei faze este determinată de o multitudine de factori cum ar fi calea de inoculare, doza de antigen inoculată, imunogenitatea lui etc. În general, această fază durează 2-3 zile. Urmează o fază de „sinteză” activă sau de „creștere logaritmică” care durează cca 4-6 zile și în care se înregistrează creșterea constantă a titrului de Ac, urmată de o scurtă fază de stagnare și apoi de una de declin (fig. 6).

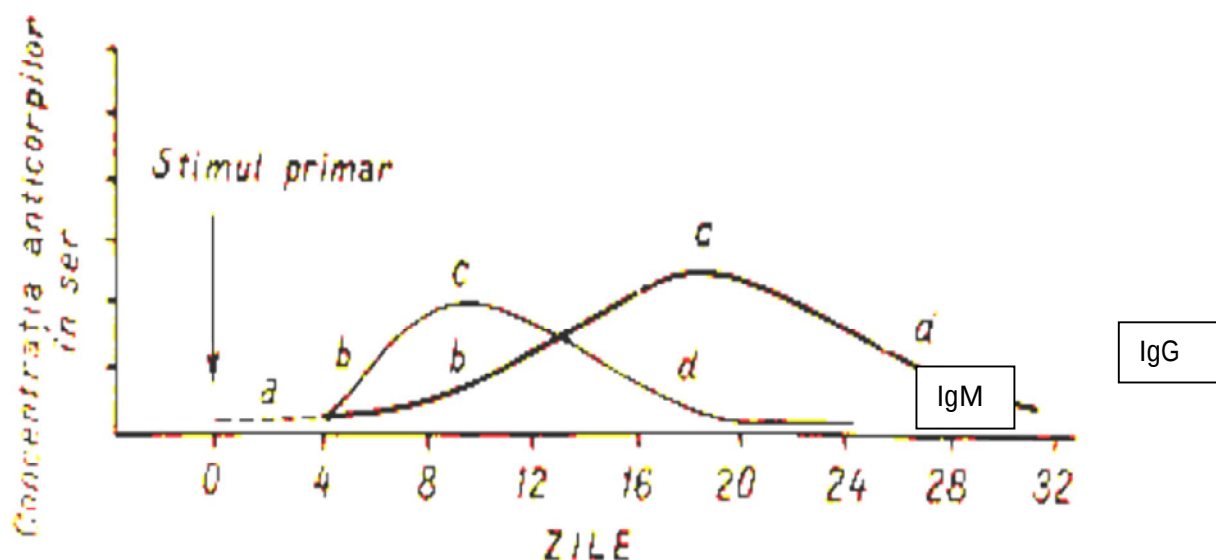


Figura 6. Dinamica sintezei anticorpilor după stimulul antigenic primar, **a**-perioada, de latență; **b** - faza de creștere logaritmică; **c** - faza staționară; **d** - faza de declin - IgM; - IgG.

Primii care apar sunt anticorpii de clasa IgM, iar peste 2-3 zile sunt detectați și Ac claselor **IgG**, **IgA** al căror nivel este însă extrem de scăzut, dar care crește pe măsura

ce titrul anticorpilor IgM începe să scadă. Creșterea populației de molecule IgG este asociată cu scăderea celor IgM, care după câteva săptămâni dispar total din circulație.

Moleculele de imunoglobuline sintetizate după stimul antigenic primar sunt extreme de heterogene atât din punct de vedere al izotipului, cât și din cel al afinității lor. La sfârșitul perioadei de stagnare și începutul celei de declin, în ser există molecule de Ac de clasele IgM, IgG, IgA. După ce au dispărut anticorpii IgM, persistă un prag de concentrație foarte scăzut, clasele IgG și IgA, persistență care poate dura un timp variabil. Anticorpii de răspuns primar au două caracteristici majore: aparțin predominant clasei IgM și au o afinitate pentru antigen extreme de diferită. După 12-16 zile, ei sunt înlocuiți cu anticorpii de clasa IgG, a căror concentrație în ser se menține în limite foarte scăzute.

După un al doilea contact al organismului cu același antigen, se induce „răspunsul imun secundar” (fig.7).

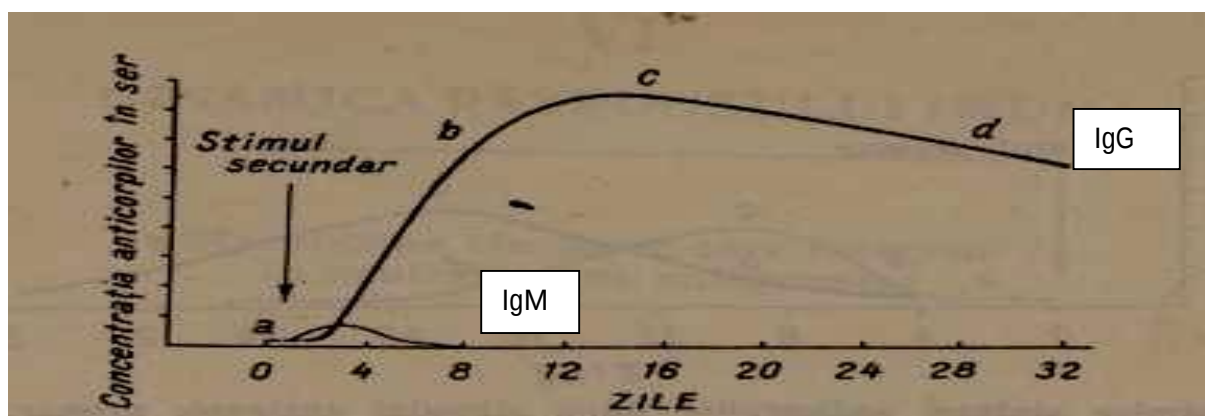


Figura 7. Dinamica sintezei anticorpilor IgG după stimulul antigenic secundar, a - perioada de latență; b - perioada de creștere logaritmică; c - faza staționară; d - faza de declin.

Acesta se caracterizează prin aceea că poate fi declanșat de către o cantitate mică de antigen, precum și prin faptul că anticorpii apar rapid, ating concentrații mari în ser, aparțin clasei IgG și au afinitate mare și aviditate mică pentru agentul declanșator, deoarece au numai două situsuri combinate spre deosebire de anticorpii IgM care au 10 situsuri. Cel puțin două mecanisme sunt responsabile de aceste fenomene: a) existența limfocitelor T și B de memorie și b) cooperarea între limfocitele T și B, care este eficientă și absolut indispensabilă pentru generarea anticorpilor din clasa IgG. Deci, diferențele dintre răspunsul imun primar și cel secundar sunt de ordin cantitativ și calitativ. Cele de ordin cantitativ se referă la cantitatea foarte mare de anticorpi sintetizați în cursul răspunsului imun secundar, sinteză care se menține un timp îndelungat în comparație cu sinteza „modestă”, care are loc după stimulul antigenic primar.

Cele de ordin „calitativ” se referă la clasele de imunoglobulină sintetizate: IgM

după stimulul primar și IgG după cel secundar. Aceste caracteristici sunt general valabile pentru orice răspuns umoral (tab. 4). Există însă și unele variante particulare, când la al doilea stimul antigenic se înregistrează o persistență prelungită a anticorpilor IgM sau apariția precoce a celor IgG.

După stimulul antigenic secundar, antigenul este fagocitat de către celulele fagocitare sau este reținut de către cele dendritice din foliculii corticali ai ganglionilor limfatici și ai splinei. Reținerea lor la acest nivel este dependentă de prezența anticorpilor, formați în cursul răspunsului imun primar. Urmează o perioadă de latență scurtă, cu o rată mai rapidă a sintezei și deci un titru ridicat al anticorpilor care persistă în circulație un timp îndelungat. Acum are loc conversia anticorpilor IgM, slab și tranzitoriu reprezentați spre anticorpi IgG cu o mare afinitate pentru antigen; dozele mici favorizează creșterea afinității, iar cele mari o defavorizează. Explicația ipotetică a

Tabelul 4

Caracteristica răspunsului imun primar și secundar

<i>Caracterul</i>	<i>Răspunsul imun</i>	
	<i>Primar</i>	<i>Secundar</i>
Perioada de latență	Lungă	Scurtă
Rata de sinteză a anticorpilor	Lentă	Rapidă
Titrul anticorpilor	Scăzut	Crescut
Persistența anticorpilor	Scurtă	Lungă
Afinitatea anticorpilor	Scăzută	Mare
Prezența celulelor de memorie	Lipsească sau sunt foarte puține	Prezente în număr mare
Clasa anticorpilor	IgM	IgG
Doza de antigen necesară pentru declanșarea răspunsului	Mare	Mică

acestui fenomen ar fi următoarea: dozele mici de antigen ar selecta numai celulele, care au receptori cu afinitate mare pentru el. Aceste celule vor fi primele care vor lega epitopii și care vor sintetiza anticorpi similari receptorilor lor, deci cu afinitate mare. În cazul unor doze mari, celulele cu afinitate mare sunt saturate, excesul de antigen devenind accesibil și celor cu afinitate mică, astfel că anticorpii secretați vor fi cu afinitate diferită — mare și mică.

Toate acestea sunt valabile pentru antigenele timo-dependente. În cazul celor timo-independente, răspunsul primar este foarte slab, iar cel secundar, de asemenea redus ca intensitate, se caracterizează prin sinteza de anticorpi IgM și nu IgG. Aceste antigene, mult mai rezistente la enzimele lizozomale ale macrofagelor, au proprietăți de activatori policlonali și ca atare, nu antrenează proliferarea celulelor de memorie

aparținând unei singure clone, din care cauză, răspunsul secundar seamănă în privința intensității și clasei de anticorpi sintetizată cu cel primar.

În cazul antigenelor timo-dependente anticorpii care mai persistă în circulație după stimulul primar, dispar după al doilea stimul. Se instalează o «fază negativă» caracterizată prin absența totală a lor datorită formării de complexe antigen-anticorp, complexe care sunt eliminate, în principal, prin fagocitoză opsonică.

Reacțiile rapide și explozive care caracterizează răspunsul imun secundar sunt consecința *memoriei imunologice* instalată după prima întâlnire cu antigenul. Stimulul primar declanșează proliferarea clonală a limfocitelor T și B cu receptori specifici pentru antigenul în cauză; o parte dintre aceste celule vor evolua spre funcții efectoare, iar altă parte vor fi celule de memorie gata de intervenție în cazul unei noi agresiuni din partea aceluiași antigen. Dacă această agresiune are loc, intensitatea reacțiilor de apărare este mult mai violentă, deoarece numărul celulelor care intră în acțiune este mult mai mare. După exercitarea funcțiilor biologice, moleculele imunoglobulinelor „îmbătrânesc” și sunt degradate fiind înlocuite cu altele tinere. Catabolismul Ig este exprimat ca „timp de înjumătățire” ($T_{1/2}$), având durată diversă pentru clasele lor (tab 3.). Anabolismul și catabolismul Ig sunt procese interdependente, care realizează menținerea homeostazei în apărarea imună, mediată umoral a organismului.

Capitolul 3. Interacțiunea antigenilor eritrocitari cu anticorpii. Metode de testare.

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*, *hemoliza*, *testul antiglobulinic Coombs*.

Aglutinarea prezintă o aglomerare celulară indusă de anticorpi care interacționează cu epitopii expresați ai hematiilor învecinate. În unele cazuri fixarea

moleculelor la determinantele antigenice nu determină conglomerarea lor, iar pentru vizualizarea fenomenului este necesară o cantitate suplimentară de anticorpi. Aglutinarea evoluează prin 2 faze: fixarea Ac pe membrana eritrocitelor (sensibilizarea hematiilor) și formarea unei rețele între eritrocitele sensibilizate cu aglomerarea celulelor învecinate. Prima fază a reacției este influențată de afinitatea anticorpilor, coraportul 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°C). 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 rar induc hemoliza eritrocitelor antigen-pozitive transfuzate și nu sunt de sugestivitate clinică, cu excepția Ac anti-P testați în serul unor pacienți cu hemoglobulinurie 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 exprimat.

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 componentilor reacției este diferit pentru Ac grupelor sangvine. 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 componentilor. Pentru sistemele montate în soluții saline sau albuminoase, când se utilizează serul antiglobulinic pentru demonstrarea fixării Ac, incubația curs de 30 min la t +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 predomină 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.

În soluțiile saline normale ionii de Na^+ și Cl^- se concentrează în jurul corpusculilor și parțial neutralizează sarcinile opuse ale moleculelor Ag și Ac, ceea ce conduce la micșorarea 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 moleculelor legate. Utilizarea soluțiilor saline cu putere ionică scăzută (ex. soluția Liss) reduce din timpul de incubație necesar detecției de rutină a Ac.

Faza a doua a reacției de aglutinare cu formarea aglomeratelor celulare este influențată de dimensiunile și proprietățile fizice ale moleculelor 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 dintre mediul ambiant și concentrarea ionilor atrași de celulă. Corpusculii cu aceeași încărcătură se resping, distanța dintre eritrocite în mediul ionic rămâne, însă, suficientă pentru a nu se produce aglomerații.

Un alt factor, care 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 moleculelor 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 induc 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 moleculelor superficiale, utilizarea macromoleculelor 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 căroră 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 eritocitară 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 formatoare ale membranei hidrice.

Testul antiglobulinic a fost elaborat în 1945 de Coombs și colab. pentru detecția Ac fixați pe celule fără formare 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 maladia hemolitică a nou-născutului, în reacțiile aloimune la hematiile transplantate recent, în anemiile hemolitice autoimune, în hemoliza indusă de remediile medicamentoase.

Testul antiglobulinic indirect (TAI) se efectuează în 2 etape și se utilizează pentru demonstrarea prezenței Ac care sensibilizează celulele, dar nu le aglutinează. Această variantă este utilizată pentru evidențierea și identificarea Ac, pentru tipizarea grupelor sangvine 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 pentru extragerea aglutininelor nedorite. În dependență de materialul utilizat pentru imunizare și metodele de prelucrare a serului se poate obține ser antiglobulinic de diversă specificitate (anti-IgG, anti-componentele 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. Intensitatea aglutinării, de regulă, este proporțională cantității de antiglobuline legate de celulă.
3. Antiglobulina umană reacționează cu moleculele globulinice umane fixate pe eritrocite sau cu cele libere din ser. Globulinele libere, reacționând 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, generând astfel 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 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 „cross-match” nu este cunoscut atât caracterul Ag, cât și cel al Ac, de aceea metoda este utilizată în principiu pentru identificarea interacțiunii dintre acestea. Factorii care influențează prima fază de aglutinare sunt valabili și pentru sensibilitatea testării antiglobulinice indirecte. Necesitatea de a spăla sistemul „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-sistema 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. 5). Reagenții polispecifici anti-globuline umane sunt predestinați pentru detecția anticorpilor IgG cu importanță clinică majoră. Sunt utilizați pentru testarea antiglobulinică 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.

Tabelul 5

Caracteristica reagenților antiglobulinici umani

Reagentul	Caracteristici operaționale
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 - Ig G fără activitate anticomplementară (nu obligatoriu și

	specific la lanțurile grele γ); reagentul lanțurilor grele IgG conține numai Ac anti – lanțurile γ – 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.

Cu toate acestea reagentul polispecific poate reacționa cu moleculele IgA și IgM, deoarece amestecul polispecific reacționează cu lanțurile ușoare de κ și λ , care intră în componistica tuturor claselor de imunoglobuline. Reagenții polispecifici manifestă și activitate anticomplementară anti-C3d, asemeni serului standard anti-C3dg. Majoritatea Ac cu importanță clinică aparțin clasei 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 C3d.

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 amestecului 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^a și anti-E.

Reagentul anti-IgG nu are activitate anticomplementară și conține anticorpi anti-lanțurile γ 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 aceste 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 de însemnătate clinică.

Rolul complementului în reacțiile antiglobulinice. Componentii complementului se atașează pe eritrocite *in vivo* și *in vitro* cu ajutorul Ac specifici anti-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 eritrocitele dau rezultate pozitive în TAD induce 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 hemaglutinelor *a frigore*, ele pot reacționa cu Ag eritrocitare la temperatura de până la 32°C, dar fără aglutinarea acestora. Traversând intima vasculară a pielii, hematiile, la această limită termică, se acoperă cu autoanticorpi care activează complementul. Dacă celulele nu sunt hemolizate, ele se întorc în circulație unde temperatura este de 37°C și autoanticorpii disociază de pe suprafața celulelor, lăsând componentii complementului bine fixați pe membrana eritrocitară. Reagenți antiglobulinici umani testează în acest caz complementul C3dg.

Complexele imune ce apar în plasma sangvină și se leagă slab sau 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 testul antiglobulinic 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 eritrocitele pot disocia de pe suprafață celulară și astfel rămâne o cantitate insuficientă pentru detecția IgG și parțial se neutralizează reagentul antiglobulinic. După suplimentarea cu globulina antiumană se efectuează imediat centrifugarea, se monitorizează reacția, grație diminuării frecvente 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 a 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 asigură 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 plasmă de la precipitat 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 - pozitive 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 componenții 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 eprubete cu fixarea rezultatelor după centrifugare (1 probă) 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^a și anti-Jk^b) pot fi testate numai cu antiglobulina polispecifică umană și în prezența complementului activ. Majoritatea anticoagulanților elimină ioni Ca²⁺ și Mg²⁺, necesari pentru fixarea complementului. Uneori prin utilizarea plasmelor pentru cercetare în locul serului acești Ac rar întâlniți nu vor fi identificați. Serurile păstrate timp îndelungat și incorect denotă activitatea insuficientă a complementului. Se mai pot realiza și în următoarele circumstanțe:

1. Contaminarea sticlăriei care poate induce aglomerarea celulelor. Dacă rezultatele cu toate mostrele sangvine 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 sangvin 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 test 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 sangvin Kell, Lw^a, Fy^a, Fy^b, S, s. Yt^a, 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 neeficace. Orice principiu utilizat pentru eliminarea IgG poate duce la modificarea structurii Ag eritocitar și influențează rezultatele testării cu reagenții respectivi (îndeosebi sistemul sangvin Kell). Este important de prelucrat celulele martor și cele testate concomitent, testul fiind realizat în paralel.

Hemoliza eritocitară este fenomenul de alterare a celulelor cu eliberarea hemoglobulinei. Hemoliza indusă de Ac *in vitro* depinde de activitatea complementului care distruge membrana celulară. În cazul absenței complementului în ser, plasmă (la eliminarea cationilor Ca²⁺ și Mg²⁺ 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 sangvină.

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 împiedica aglutinarea în sistemul cu reagenți cunoscuți. De exemplu, saliva „secretorilor” conține Ag solubile ale grupelor sangvine, 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 sangvin, 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 – metodă 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. Anticorpii 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 fetomaterne, pentru identificarea celulelor transplantate și monitorizarea viabilității lor la recipienti, pentru măsurarea concentrațiilor minime de IgG fixate pe celulă, diferențierea expresiei Ag de grup sangvin la homo- și heterozigoți.

Analiza radioimună (RIA). Antigenele sau anticorpii sunt marcați cu radioindicatori 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 faza 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 contorului gama.

Marcarea cu radionuclizi se practică și în metoda de legare concurentă, 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 sangvină.

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 marcant, activitatea căruia 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 celula, pentru diagnosticul hemoragiilor feto-materne. La cercetarea eritrocitelor metoda dată deseori este denumită test antiglobulinic imunofermentativ (ELAT).

Testele eritrocitare de adeziune pe faza solidă. Metodele montate pe faza solidă în microplanșete 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 microplanșei peste care 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. Planșele 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 elaborată în 1986 de Lapierre. Eprubetele standard sunt înlocuite cu 6 microtuburi, care se includ în 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 Ac serici, de asemenea pentru testarea „cross-mutch”. Este o metodă performantă care exclude multe erori posibile la testările sangvine.

Capitolul 4. Antigenile eritrocitare ale sistemului AB0 și caracteristica anticorpilor acestui sistem

În identificarea și descifrarea antigenilor 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 sangvine (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 prezența grupului sangvin AB.

Sistemul sangvin AB0 a fost cel depistat primar, dar și până în prezent este de cea mai mare valoare pentru transfuziologie. Este unicul sistem în care anticorpii anti – antigenile 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 sangvin AB0 este prezența în ser a anticorpilor (izohemaglutininelor) anti-A și anti-B naturali, cu excepția persoanelor cu grupa sangvină AB. Anticorpii anti-Ag ale altor sisteme eritrocitare nu sunt congenitale și prezintă, cu unele mici excepții, niște produse ale stimulului antigenic.

În funcție de prezența sau absența pe eritrocite a antigenilor (aglutinogenelor) A și B și a anticorpilor (aglutininelor) anti-A și anti-B în serul sangvin distingem 4 grupe sangvine (tab. 6).

Tabelul 6.

Antigenile și anticorpii specifici grupelor sangvine după sistemul AB0

Criterii	Grup sangvin			
	0	A	B	AB
Antigene eritrocitare	-	A	B	A, B
Anticorpi în serul sangvin	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 α și β . Conform clasificării internaționale a grupelor sangvine 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 în hematiile de grup sangvin 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 membranare 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 antigenilor 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 AB0 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: α -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 sangvină. 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 (*AB0*, *Hh* și *Sese*) controlează prezența și amplasarea antigenilor A și B. Trei alele (*A*, *B* și *O*) se găsesc în locusul *AB0* 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 responsabile de transportul resturilor glicozile necesare pentru formarea determinantei antigenice.

Gena *A* codifică producerea N-acetilgalactozaminotransferazei, care asigură transferul N-acetilgalactozaminei, gena *B* – α -galactoziltransferazei ce răspunde de transferul D-galactozei. Gena *O* se consideră afuncțională și nu codifică careva glicoziltransferaze (Ag *O* nu există). Pe eritrocitele persoanelor cu grupa sanguină *O* 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*. Grupa sanguină *O* se caracterizează prin prezența pe eritrocite a antigenului *H*.

Genele *A* și *B* sunt dominante comparativ cu gena *O* 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 expresa în cazul moștenirii unuia de la tată, iar a celuilalt de la mamă. Gena *O* 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. 7 și fig.8.

Varianțele antigenilor A și B

La testarea antigenilor sistemului *ABO* cu seruri standard pot apărea dificultăți dependente 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 sangvine.

Tabelul 7

Varianțe fenotipice și genotipice posibile a grupelor sangvine după sistemul *ABO*

Fenotip (grupa sanguină)	Genotip posibil
A	AA, A0
B	BB, B0
AB	AB
0	00

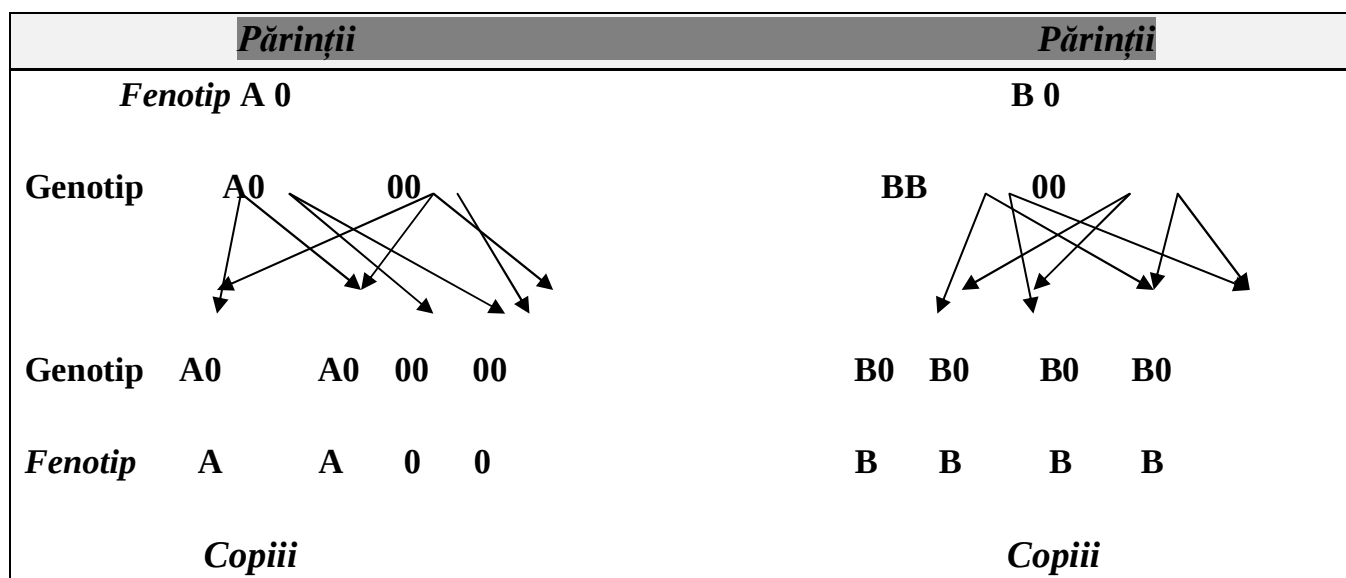


Figura 8. Variante de moștenire a antigenilor de grup sangvin AB0

Ultimele reprezintă fenotipurile AB0, care se diferă după cantitatea antigenilor 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 transferaze care 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 transformând 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 grupa 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 cu A_2 . Aproximativ la 80% de indivizi cu grupa sangvină 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 sangvin 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 .

Anticorpul anti-A₁, 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-A₁.

Au fost descrise și alte variante ale antigenului A: A₃, A_x, A_m, A_{end}, A_{el}, 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 anticorpii (tab.8).

Tabelul 8.

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 _{el}	100 – 1 400
A _y	100 – 1 900

De regulă, la clasificarea subgrupelor A slabe se ia în considerare intensitatea aglutinării eritrocitelor cu reagenții anti-A, anti-A₁, anti-A₁B, anti-H (ultimul obținut din *Ulex europeans*), prezența sau absența Ac anti-A₁ în ser, prezența substanțelor A și H în saliva secretorilor.

În practica transfuzională foarte rar se întâlnesc A_x, A_{end}, A_{el}, A₃. Hematiile A_x se specifică de absența aglutinării cu Ac umani anti-A ai grupei sangvine 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_{el} nu se aglutinează de către anti-A sau anti-AB de diversă geneză și prezența Ag A_{el} în cazul dat poate fi demonstrată prin metoda de absorbție sau eluție. Eritrocitele A₃ la testare cu anti-A și anti-AB formează aglutinate minuscule printre multiplele hematii libere.

Subgrupele slabe (A_x, A_{el} etc.) nu pot fi apreciate cu precizie doar prin testare serologică, se impun teste specifice asupra salivei, folosirea metodelor de absorbție și eluție, 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 sangvine 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 sangvine se amplasează în următoarea consecutivitate: $0 > A_3 > A_2 > A_1$. 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 cele A_1 , dat fiind conținutul mai mare de substanță H pe eritrocitele A_2 .

La testarea grupei sangvine după sistemul AB0 caracterul aglutinării hematiilor care conțin varianta antigenică A este dependentă 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 lectina anti – A_1 (fig. 9).

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 frecvență minoră la populația europeană. Formarea antigenului B este realizată prin acțiunea α -galactoziltransferazei asupra substanței H, și astfel variantele de antigene B slabe pot avea pe suprafața 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 intensitatea aglutinabilă și prin capacitățile de absorbție a aglutinogenului B. La secretori Ag B_w se testează în salivă și se moștenește.

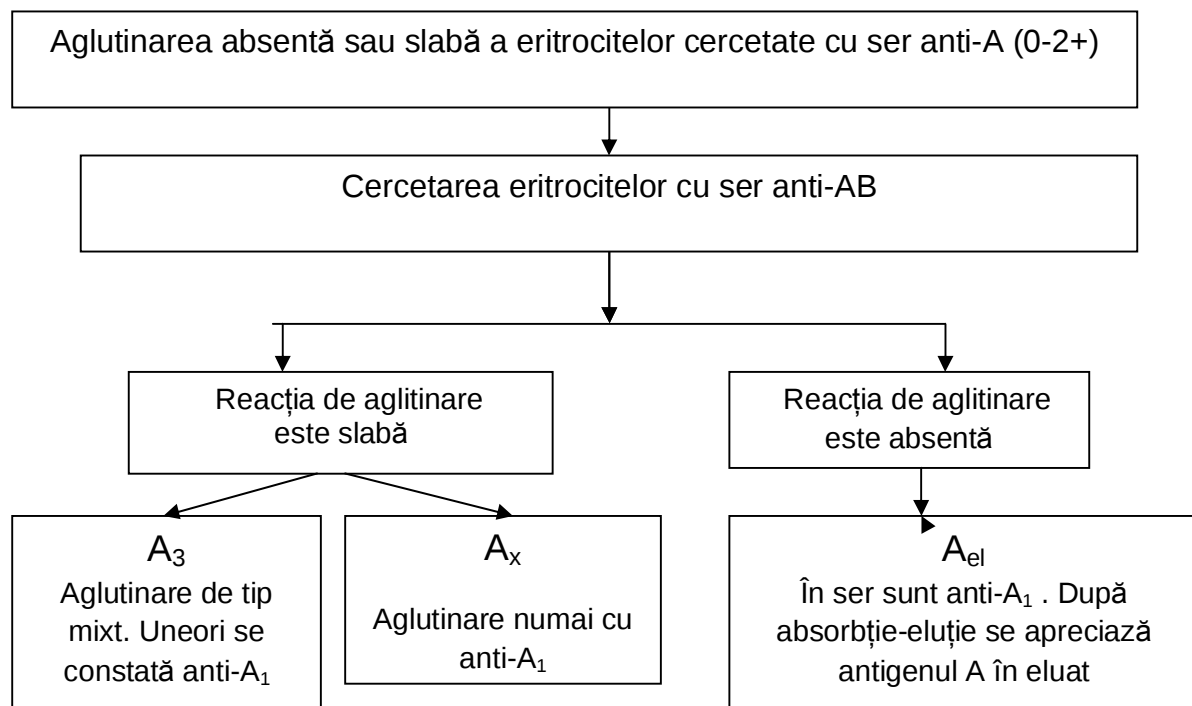


Figura 9. Algoritm de testare a variantelor antigenice A cu serurile sangvine anti-A și anti-AB umane.

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 sangvine după sistemul AB0 caracterul aglutinării eritrocitelor ce comportă variantele antigenice A și B va depinde de reagenții utilizați (tab. 9).

Varianta eritocitară tip Bombay (fenotipul 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 fenotipul Oh li se transfuzează numai sângele Oh, grație faptului că Ac acestora vor hemoliza celulele cu Ag A, B și AB. La prezența fenotipului Oh va indica absența reacției la interacțiunea celulelor cu lectina anti-H.

Existența variantelor sangvine de tip Bombay trebuie luată în considerație în practica medicinei legale. Dacă se atestă prezența Ac anti-A, anti-B și anti-H devine evidentă și apartenența de grup sangvin.

Tabelul 8.

Caracteristica reacțiilor serologice realizate la persoanele cu fenotipurile A și B

Fenotip eritrocit	Reacția eritrocitelor cu serul anti-									
	A	B	AB	H	A ₁ lectin	A ₁	A ₂	B	0	Saliva secretorilor conține
A ₁	4+	0	4+	+/-	3+	0	0	4+	0	A și H
A ₂	3+	0	3+	3+	0	*	0	4+	0	A și H
A ₃	2+mf	0	2+mf	4+	0	*	0	4+	0	A și H
A _{end}	+mf	0	+mf	4+	0/+	0	0	4+	0	H
A _m	+/-	0	+	4+	0	0	0	4+	0	A și H
A _x	-/+	0	1+/2+	4+	0	2+/0	0/1+	4+	0	H
A _{el}	0	0	0	4+	0	2+/0	0	4+	0	H
B	0	4+	4+	0		4+	4+	0	0	B și H
B ₃	0	1+mf	2+mf	4+		4+	4+	0	0	B și H
B _m	0	0	0/±	4+		4+	4+	0	0	B și H
B _x	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 hematiile libere; 0 – aglutinare absentă; * - incidența anti-A₁ este diferită: la persoanele cu fenotip A₂ anti-A₁ acești sunt frecvenți, la indivizii cu A₃ Ac anti-A₁ sunt absenți cu unele excepții.

Anticorpul normal și imuni de grup ai sistemului AB0

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).

Anticorpul anti-A și anti-B pot fi depistați în serul sangvin 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 diminuarea lui treptată. Persoanele vârstnice au indici mai mici de expresie a Ac anti-A și anti-B decât adulții de alte vârste.

Rezultatele testării sangvine 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.

Anticorpii anti-A, produse de persoanele de grup sangvin B și Ac anti-B, secretați de indivizii de grup A, sunt prezentate în majoritate de IgM, dar printre ei pot exista în cantități mai mici IgG. Deoarece IgG, spre deosebire de IgM, pot fi liber transportate prin placentă, copiii mamelor de grup sangvin 0 au o mai mare șansă de a produce maladia hemolitică a nou-născuților decât copiii proveniți din mame cu grupa sangvină A sau B. Diferențele pentru activitatea anti-A și anti-B a IgM și IgG sunt prezentate în tab. 9.

Tabelul 9.

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	nu
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

Anticorpii 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 hemoliza eritrocitele se manifestă dacă testarea include incubarea la 37°C. Serul unor pacienți sau donatori poate induce hemoliza eritrocitelor AB0 – 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 sangvină

Anticorpii anti-A, anti -B (serul de grupă sangvină 0)

Serul persoanelor cu grupa sangvină 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 după absorbția 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 și orice variantă de Ac anti-A și anti-B diferențiază facil hematiile celor trei grupe sangvine 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-A₁. S-a constatat că Ac prezenți la persoanele de grup B pot fi subdivizați în componentele anti-A₁ și anti-A₂. Serul nativ de grup B aglutinează hematiile A₁ și A₂, iar după absorbția cu celulele A₂, serul de grup B reacționează exclusiv cu hematiile A₁. Diferențele de expresie a Ag A pe celulele A₁ și A₂ sunt mai degrabă cantitative decât calitative. Uneori Ac anti-A₁ pot fi identificați în serul indivizilor cu fenotipul A₂ sau cu alte fenotipuri ale subgrupului A. Un reagent eficient pentru diferențierea Ag A₁ și A₂ s-a elaborat din lecitinele extrase din *Dolichos biflorus*, care nu aglutinează celulele A₂ și astfel poate fi utilizat în calitate de reagent anti-A₁.

Fenotipul B (A). La unii indivizi cu grupa sangvină 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 semnalizat 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 A₁ și A₂, 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-A₁. O confirmare definitivă se poate reuși numai prin studiul structural al transferazelor sau prin analiza secvenței 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 A₁ și B. În secvența aminoacidă a transferazei B (A) în poziția 235 este prezentă glicina, detaliu specific și pentru transferaza A₁.

Testarea AB0 standard

Cercetarea Ag, realizată prin intermediul Ac anti-A și anti-B a primit denumirea de testare directă sau eritocitară. Utilizarea reagenților eritrocitari A₁ și B pentru detecția Ac anti-A și anti-B în ser este denumită testare serică.

Testarea standard include testarea hematiilor și serului, de altfel, fiecare din aceste teste servește ca martor unul pentru altul (tab. 10).

Tabelul 10.

Testarea AB0 standard

Reacția eritrocitelor testate cu anticorpii		Reacția serului cu hematiile standard			Grupa sangvină dedusă
anti-A	anti-B	A ₁	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 a fost efectuată tiparea, la fel și testarea copiilor până la 4 luni se permite utilizarea numai cu testarea AB0 pe hematii. Unii reagenți folosiți pentru tipizarea AB0 a hematiilor sunt preparați din serurile persoanelor stimulate cu substanțele sangvine 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 A₂, 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 timp 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 A₁, B și A₂. Hematiile A₂ sunt predestinate pentru facilitarea aprecierii anti - A₁ în mostrele serice, care au manifestat criterii specifice subgrupului A. Deoarece majoritatea mostrelor serice ale grupului sangvin A nu conțin anti- A₁, utilizarea de rutină a acestui reagent nu este indicată în cazurile când nu există divergențe la testarea eritrocitelor și serului. Celulele A₂ pot fi utilizate pentru testarea diferențială a mostrelor donatorului sau pacientului, care conțin anti-A₁, 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 grupei sangvine pot apare, când rezultatele testelor eritrocitare nu corespund cu cele serice. Rezultatele se fixează, dar interpretarea trebuie efectuată numai după clarificarea cauzelor necorespunderii. Dacă mostra este colectată din sângele donatorului, acesta nu poate fi utilizat până la stabilirea cauzei rezultatelor discordante. Dacă să 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 aparente la testare, erorile tehnice etc. Divergențe se constată și la obținerea rezultatelor negative când se așteptau probe pozitive și invers.

Rezultate fals-negative pot apare și 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 fals-pozitive pot fi datorate:

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

Dificultăți la testarea 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 aparținute concomitent la câteva grupe sangvine 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 adoptive 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 macromoleculelor sau în proba de sânge ombilical a gelului Warton („Warton’s jelly”) poate genera agregarea nespecifică a celulelor suspendate în ser ce se poate interpreta eronat ca fiind aglutinare;

5. Concentrațiile majore de substanță de grupa sangvină 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 sangvină;
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 fals-pozitivă;
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 sangvin 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 mostra testată pot aglutina hematiile reagentului A₁ sau B, dacă acestea posedă Ag respectivi;
4. Ac anti-componentele diluentului, utilizat pentru păstrarea reagenților eritrocitari A₁ 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 sangvine ale pacienților la care conținutul Ac s-a micșorat cu vârsta sau cele ale pacienților la care concentrația Ac s-a micșorat evident în urma procedurilor de substituie a plasmei pot avea 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 sterică a 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 măduva 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 individului de grup A, la acesta 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 probleme 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 sangvine 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 componentelor serici și chimici capabili să inducă reacții pozitive neașteptate;
- 3.Testarea eritrocitelor cu Ac anti-A, B, anti- A_1 sau anti-H în funcție de problema concretă.
4. Dacă se presupune prezența anti- A_1 , serul se testează cu utilizarea câtorva mostre eritrocitare A_2 .
- 5.Screening-ul repetat al Ac cu utilizarea eritrocitelor de grupa 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 temperatură mai joasă dar cu realizarea testelor în paralel cu celulele grupei 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

Anticorpii 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, graviditatea heterospecifică, hemotransfuziile incompatibile. La majoritatea oamenilor anticorpii 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 antigenilor 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 sangvin 0 care comportă IgG cu specificitate anti-A, anti-B sunt “donatorii universali periculoși”, deoarece concentratul eritocitar conține cantități minore de plasmă, care pot induce complicații posttransfuzionale severe, reacționând cu eritrocitele A, B, AB ale recipientului.

Rezolvarea contradicțiilor dependente de absența antigenilor prognozați

Hematiile persoanelor de grupa A sau B în majoritatea cazurilor sunt aglutinate (3-4+) de Ac reagenților respectivi, iar serul sangvin al acestora în normă aglutinează (2-4+) eritrocitele A₁ sau B din reagenții aplicați. Cauza necorespunderii rezultatelor uneori poate fi datorată intensității de interacțiune la tipizarea serului sau eritrocitelor. De exemplu, serul, care aglutinează intensiv eritrocitele de grup B, dar nu și celulele A₁, mai degrabă aparțin unei persoane cu grupa A, cu toate că eritrocitele nu sunt aglutinate de Ac anti-A sau anti-B. Ag A sau B pot să nu fie expresați 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°C favorizează și mai mult legarea, dar testarea la temperatura 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 AB0 este necesară testarea în paralel a eritrocitelor de grupa 0 prelucrate cu enzime;
3. Incubarea alicvotei eritrocitare la temperatura camerei sau la +4°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-A₁ sau a reagenților monoclonali. În calitate de martor la absorbție/eluție este necesar a utiliza eritrocite de grupa 0. După incubare hematiile trebuie minuțios spălate, apoi se prepară eluatul. Ultimul se testează cu celulele de grupa A₁, B sau 0. Dacă eritrocitele posedă Ag A, atunci eluatul va aglutina A₁, dar nu și hematiile cu Ag B sau 0. Eluatele preparate din hematiile de grupa 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 grupa 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 sangvine, serul căreia

reacționează identic serului normal de grupa 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 A₁. Ag B adoptiv se dezvoltă din contul Ag A, 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 Ag B 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, Ag B adoptiv se întâlnește în stările care favorizează pătrunderea bacteriilor intestinale în torentul sangvin, 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 ale 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.
- Să se testeze eritrocitele cu serul anti-B uman la 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 prelucereze eritrocitele cu anhidridă acetică care reacționează moleculele superficiale ale celulelor și minorizează esențial reactivitatea hematiilor cu Ag B adoptivi. Anhidrida acetică nu influențează reactivitatea Ag obișnuit de grupa B.

Ag A identic adoptiv

Discordanțe după sistemul *ABO* 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 grupa 0 și B se manifestă asemenea celor purtătoare de Ag A,

capabile se reacționeze cu reagenții anti-A monoclonali sau cei umani. Ag A identic al hematiilor Tn-activate poate fi diferențiat de AgA 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” sau „câmp mixt”. Uneori se întâlnesc mostre sangvine care conțin două populații diferite de hematii. De regulă, acest fapt anunță despre o transfuzie recentă cu hematii de grupa 0, aplicată recipientului cu o altă grupă sangvină sau despre transplantarea măduvei osoase care se diferă de cea a recipientului după sistemul AB0. Himerismul grupelor sangvine la schimbul de țesuturi eritrocitare între gemenii heterozigoți sau în prezența mozaicismului conduce de asemenea la apariția unui amestec eritocitar. 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 viață a hematiilor.

După transplantul medular reacția dispăre 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 sangvin reacția se manifestă pe parcursul întregii vieți.

Aglutinarea tip „mixed-field” este caracteristică pentru hematiile A₃ și reagentul anti-A. Dacă se elimină celulele aglutinate, iar eritrocitele rămase 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 diluenților 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 ditiotreit (DTT).

Soluționarea divergențelor dependente de reacțiile neprevăzute ale serului

Erorile 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 grupa sangvină poate fi determinată după diluarea serului sau prelucrarea acestuia cu EDTA (2,5%).

3. Ac anti - A_1 din serul persoanelor cu A_2 , A_2B sau cu altă subgrupă sangvină aglutinează hematiile reagentului A_1 . Pentru confirmarea cauzei generatoare de asemenea contradicții este necesar: a) de testat serul dat cu mostre eritrocitare sangvine 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 sangvin uman de grup B în calitate de reagent anti- A_1 pentru a se confirma, că celule 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°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 reagentele. 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) până la 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 depistează la utilizarea metodei date, deoarece temperatura optimă pentru activitatea Ac este de sub $+37^\circ\text{C}$. La persoanele cu grupa sangvină 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 sangvin 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 va 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 evitate, 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 A₁ sau B. Utilizarea pentru testarea serului a eritrocitelor A₁ 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 A₁ și B. Serul poate conține Ac anti-Ag rar înregistrate sau absente pe majoritatea eritrocitelor A₁ 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 microscopiere, 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.

Capitolul 5. Sistemul sangvin 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 sangvine compatibile după sistemul AB0.

Actualmente sistemul antigenic eritocitar 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 Rh₀(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 expresează Ag D în cazul transfuziilor sangvine sau pe fond de sarcină. Pentru evitarea acestor inadvertențe, sângele tuturor recipientilor și al donatorilor este testat la prezența Ag D, manevră care asigură securitatea transfuziei sangvine. Ag D este determinat genetic, moștenirea criteriului se 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. 11), 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.

În prezent se consideră plauzibilă ipoteza lansată de Tippett despre existență a 2 loci structurali legate pe cromozomul 1, care determină sinteza Ag Rh. Determinantele antigenice Rh sunt niște polipeptide neglicozilate. Gena *RHD* condiționează 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.

Tabelul 11

Antigenele eritrocitare ale sistemului Rhesus

Nr. de antigen după ISBT	Simbolul antigenului	Nr. de antigen după ISBT	Simbolul antigenului	Nr. de antigen după ISBT	Simbolul antigenului
RH1	D	RH21	C ^G	RH40	Tar
RH2	C	RH22	CE	RH41	Rh41
RH3	E	RH23	D ^W	RH42	Rh42
RH4	c	RH26	c-like	RH43	Crawford
RH5	e	RH27	cE	RH44	Nou
RH6	f	RH28	hr ^H	RH45	Riv
RH7	Ce	RH29	Rh29	RH46	Sec
RH8	C ^w	RH 30	Go ^a	RH47	Dav
RH9	C ^x	RH31	Hr ^b	RH48	JAL
RH 10	V	RH32	Rh32	RH49	STEM
RH11	E ^w	RH33	Rh33	RH50	FPTT
RH12	G	RH34	Hr ^b	RH51	MAR
RH17	Ht ₀	RH35	Rh35	RH52	BARC
RH18	Hr	RH36	Be ^a	RH53	JAHK
RH19	Hr ^s	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^N* 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.

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

Ag Rh sunt omogene, deosebirea fiind asigurată 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 adoptate pentru Ag eritrocitari ai sistemului Rhesus (tab.12).

Tabelul 12

Simbolizarea antigenilor eritrocitare ale sistemului Rhesus după diferite clasificări

După Wiener		Fisher-Race	Rosenfield
Aglutinogene	Factori		
Rh ₀	Rh ₀ hr' h''	cDe	Rh: 1,4,5
Rh ₁	Rh ₀ rh' hr''	CDe	Rh: 1,2,5
Rh _z	Rh ₀ 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 ₂	Rh ₀ rh' rh''	CDE	Rh: 1,2,3
rh _y	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 numai 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-Rh₀(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 monospecifice (de ex. serul anti-c reacționează cu eritrocitele cde/cDE și nu interacționează cu hematiile CDE/CDe).

Clasamentul Rosenfield este bazată 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 hematiile 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. 13 sunt redate cele mai frecvente combinații antigenice ale acestui sistem, expresate ca haplotip.

Tabelul 13

Genele principale ale sistemului Rh după Fisher-Race

Haplotip	Combinații genetice	Specificități antigenice
R^1	<i>CDe</i>	C, D, e
r	<i>ce</i>	c, e
R^2	<i>cDE</i>	c, D, E
R^0	<i>cDe</i>	c, D, e
r'	<i>Ce</i>	C, e
r''	<i>cE</i>	c, E
R^z	<i>CDE</i>	C, D, E
r^y	<i>CE</i>	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^2 indică prezența concomitentă a Ag c, D și E; $r = c$ și e, $R^0 = c$, D și e etc. Fenotipurile cu expresie homozigotă a haplotipului unic se semnifică cu un simbol, alte fenotipuri – cu două.

Antigenile 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 tab. 14. 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 14

Frecvența de înregistrare a fenotipurilor sistemului Rhesus

Rezultatele investigațiilor cu serul anti-					Fenotipul	Frecvența, %	Genotipul posibil
D	C	c	E	e			
+	+	+	-	+	CcDe	34	CDe/ce Ce/cDe CDe/cDe
+	+	-	-	+	CDe	19,5	CDe/CDe CDe/Ce
+	-	+	+	+	cDEe	12	cDE/ce cDE/cDe cDe/cE
+	-	+	+	-	cDE	2,9	cDE/cDE cDE/cE
+	+	+	+	+	CcDEe	14	CDe/cDE CDe/cE Ce/cDE cDe/CE CDE/cDe CDE/ce
+	-	+	-	+	cDe	3	cDe/ce cDe/cDe
-	-	+	-	+	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 antigenilor 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 expresează 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 celor 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 30 000 până la 10 000 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 antigenile 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 expresează toți epitopii antigenului D (antigenul D normal exprimat). Mostrele eritrocitare care nu expresează toți epitopii antigenului D au fost notate cu termenul de varianta D (D-partial), 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^U. Actualmente, grație utilizării anticorpilor monoclonali testarea acestor variante antigenice este posibilă și termenul D^U 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 (antigenile „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 Ag E 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 RH specificități 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: D II, D IIIa, D IIIb, D IVa, D IVb, DVa, DVI, DVII, DBT, DFR, R₀Har, 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 sangvine 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. Anticorpul monoclonal are o specificitate restrânsă, astfel că vor releva numai unii epitopi.

Fenotipul 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), care conțin diverse mostre de anticorpi monoclonali și oferă posibilitatea de a depista diferite variante de antigene 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 unei predispuneri genetice. Unele mostre *RHD* denotă expresia slabă a Ag D (fenomen mai frecvent la negrii), 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 cu anticorpi monoclonali, dar acesta se poate aprecia cu testul antiglobulinic indirect. Antigenul D-slab se poate depista la cercetarea apartenenței Rhesus 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, 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 Rhesus este dificilă diferențierea variantelor antigenice, precum și relevarea Ag D parțial sau slab în mostrele cercetate. Nu există încă probe certe despre imunogenitatea variantelor de Ag D, 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. Anticorpii anti-LW^{ab} sau anti-LW^a uneori reacționează cu celulele D+ și nu cu cele D-. Persoanele cu Ac anti-LW^{ab} slab reactogenie la testarea serologică primară și sunt imposibile 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^w, care structural se diferă de Ag C al sistemului Rhesus. Confirmarea acestui fapt ar fi secreția de anticorpi anti-C^w observată la persoanele C-pozitive. Ag C^w poate fi sintetizat concomitent cu Ag C și c, cu aparența fenotipului C+, c+ C^w+. Testarea Ag C^w se efectuează cu un reagent standard anti-C, care conține în majoritatea cazurilor Ac anti-C^w. Și mai rar se înregistrează antigenele D^w, E^w, E^t, e^s 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-null” – 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. Intensitatea 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–null au fost testați Ac “naturali” anti-Rhesus. Fenotipul Rh-mod reflectă supresia incompletă a Ag Rh, dependentă de genă modificată X^Q . 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 minoră, încât prezența lor se va releva doar prin metoda de absorbție/eluție. Atât în cazul fenotipului Rh-null, cât și la persoanele cu Rh-mod, maladia caracteristică este anemia hemolitică, deosebirile fiind prezentate doar prin 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 concluzionează, 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^G).

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 și alți coloizi). Aglutinarea se intensifică la centrifugare sau la suplimentarea enzimelor proteolitice. Ac anti- Rh sunt mai activi la t 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 -c. 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, chiar dacă prezenta 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 antigenilor, 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^w, 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 pentru 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 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 cauza erori 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 sangvine Rhesus prevede controale 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 pozitiv și apare sub aspect de mici aglutinate. În cazul dat reacțiile slab pozitive pot fi datorate de:

- Prezența pe eritrocitele cercetate a autoanticorpilor care induc reacție slab pozitivă prin legarea cu componentele reagentului anti-Rhesus (gelatina, etc). Excluderea acestor reacții fals-pozitive este posibilă prin realizarea testelor control pentru fiecare cercetare. Controlul presupune cercetarea mostrei sangvine cu 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 Rh+ apreciat anterior se apreciază 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 sangvină Rhesus, atunci lor li se transfuzează hematii Rh-negative. Algoritmul de apreciere a apartenenței Rhesu este redat în fig. 10.

Rezultatele fals negative 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).

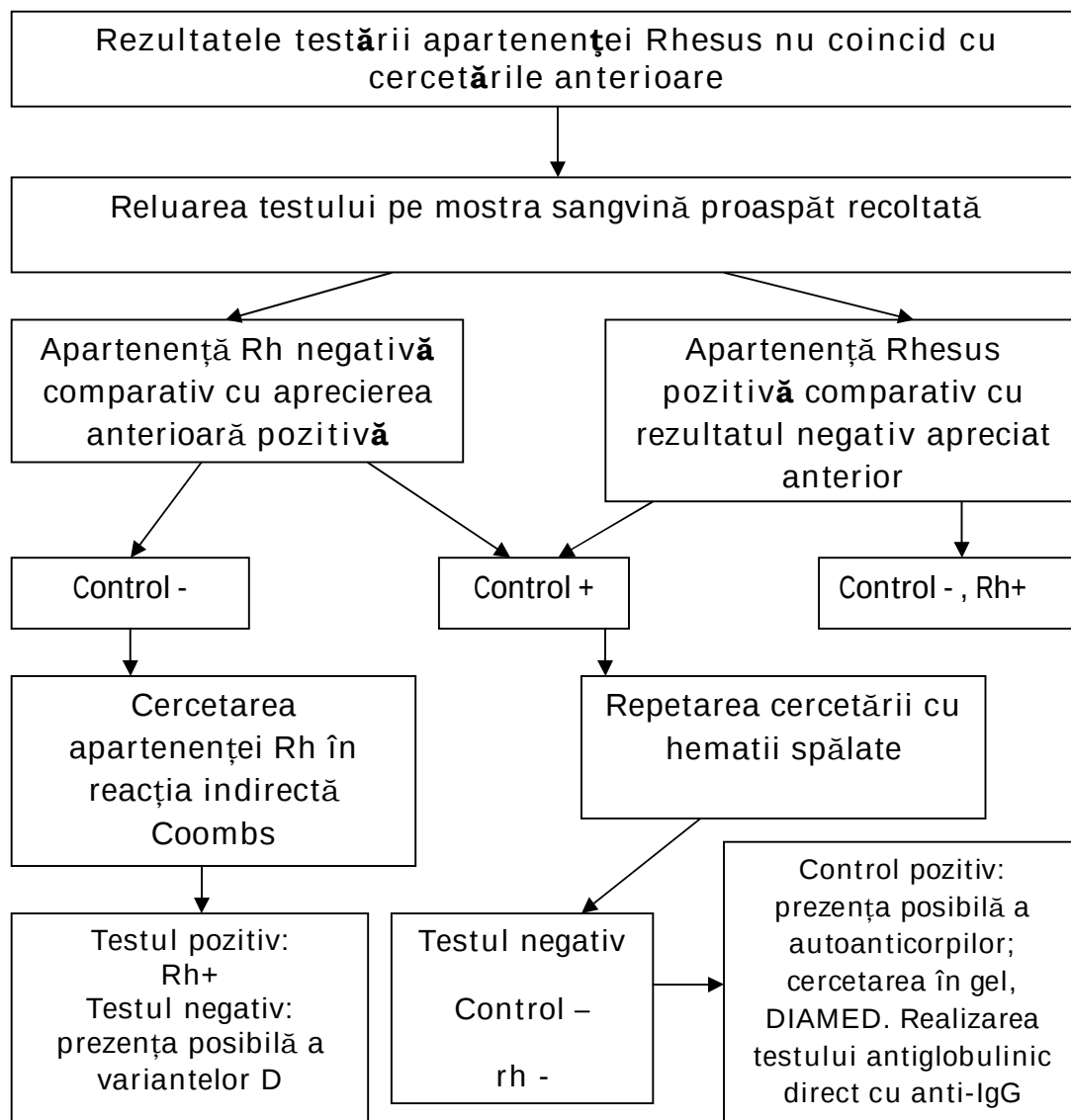


Figura 10. Algoritmul cercetării apartenenței Rhesus în cazurile dificile de diagnostic

Capitolul 6. Sistemul sangvin Kell

Antigenul K a fost identificat la 1946 de Coombs în timp ce acesta cerceta anticorpii ce provocase BHNN. Actualmente sunt cunoscute 24 antigene eritrocitare ce aparțin sistemului Kell (tab. 15).

Tabelul 15.

Antigenile sistemului Kell și frecvența lor de înregistrare

Nr. antigenului după ISBT	Simbolul Ag	Frecvența, %	Nr. antigenului după ISBT	Simbolul Ag	Frecvența, %
KEL1	K (Kell)	9,0	KEL16	k-like	99,8
KEL2	k (Chellano)	99,8	KEL17	Wk ^a Weeks	0,3
KEL3	Kp ^a (Pennery)	2,0	KEL18	Marshall	>99,9
KEL4	Kp ^b (Rautenberg)	>99,9	KEL19	Sublett	>99,9
KEL5	Ku (Total Kell)	>99,9	KEL20	Km	>99,9
KEL6	Js ^a (Sutter)	Albi, <0,1	KEL21	Kpc Levay	0,1
KEL7	Js ^b (Matthews)	Albi, >99,9	KEL22	Ikar	>99
KEL10	UI ^a	2,6	KEL23	Centauro	<0,1
KEL 11	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 sunt de importanță clinică la transfuziile sangvine. Frecvența de înregistrare constituie 7-9%. Ag sistemului dat sunt niște glicoproteine și posedă legături disulfidice importante pentru amplasarea Ag eritrocitari. Ag eritrocitare Kell sunt scindate de mercaptoetanol, ditiotreitol 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 tab. 16 sunt reprezentate fenotipurile principale ale sistemului Kell și frecvența acestora, printre care și K₀ (fenotipul 0), când eritrocitele nu posedă nici unul din antigenele acestui sistem. Ag sistemului Kell (K1, K2, K3, K4, K5, 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.

Tabelul 16.

Frecvența unor fenotipuri ale sistemului 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

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 sangvine. 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 apariția lor este asociată cu răspândirea largă a microorganismelor, peretele celular al cărora 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 tab. 17

Ac anti-Kp^a, -Kp^b, -Js^a, -Js^b 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 feto-maternă. Frecvența înregistrării lor este dependentă de imunogenitate și de incidența lor la donatori.

Tabelul 17

Activitatea serologică a anticorpilor sistemului Kell cu hematiile unor fenotipuri eritrocitare

Anticorpul anti-						Fenotipul
K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	
+	-					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 ₀

Ac anti-Kp^a, -Kp^b, -Js^a, -Js^b 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 feto-maternă. 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^a, -Kp^b, -Js^a, -Js^b sunt de caracter sever, uneori cu sfârșit letal. Hemoliza eritrocitelor este extravasculară.

Ac anti-K, -k, Kp^a, -Kp^b, -Js^a, -Js^b, -Kell 14, -Kell 22, -Kell 23 pot induce MHNN. Ac anti-K și anti-k provoacă cele mai grave reacții cu moartea intrauterină 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.

Capitolul 7. 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. 18).

Tabelul 18.

Antigenile eritrocitare ale sistemului MNS

Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag	Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag	Nr. antigenului după ISBT	Simbolul Ag	Nr. antigen după ISBT	Simbolul Ag
MNS1	M	MNS12*	Vr	MNS23*	S ^D	MNS34	MINY
MNS2	N	MNS13*	M ^e	Mns24*	Mit	MNS35	MUT
MNS3	S	MNS14*	Mt ^a	MNS25*	Dantu	MNS36	SAT
MNS4	s	MNS15*	St ^a	MNS26*	Hop	MNS37	ERIK
MNS5**	U	MNS16*	Ri ^a	MNS27*	Nob	MNS38	Os ^a
MNS6*	He	MNS17*	CI ^a	MNS28**	En ^a	MNS39	ENEP
MNS7*	Mi ^a	MNS18*	Ny ^a	MNS29**	ENKT	MNS40	ENEH
MNS8*	M ^c	MNS19*	Hut	MNS30**	'N'	MNS41	HAG
MNS9*	Vw	MNS20*	Hil	MNS31	Or	MNS42	ENAV
MNS10*	Mur	MNS21*	M ^v	MNS32*	DANE	MNS43	MARS
MNS11*	M ^g	MNS22*	Far	MNS33	TSEN		

Notă: * rar înregistrate, ** frecvent înregistrate

Printre Ag prezentați în tab. 18 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-* expresează, totuși, Ag *U*, dar nivelul acestuia este atât de minor, încât detecția lui necesită utilizarea metodelor 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^g (MNS11) nu reacționează cu reagenții anti-*M* și anti-*N*. Hematiile umane cu genotipul *M^(g)N* manifestă reacții cu *M-N+*, ceea ce poate dirija spre falsa concluzie despre prezența fenotipului *NN*. Eritrocitele umane de genotipul *M^gM* dau reacții cu *M+N-* și prin interpretarea inexactă a genotipului persoanelor *M^gM* și *M^gN* ca fiind *MM* și, respectiv, *NN* poate erona rezultatele testului de paternitate.

Frecvența fenotipurilor Ag MNS este redată în tab.19. 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.

Tabelul 19.

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

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 tab. 20

Tabelul 20.

Activitatea anticorpilor sistemului MNS la diferite fenotipuri

Interacțiunea cu anticorpilor 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 decelați 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 întâlnește 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+w. 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'. Lectina 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 stimulenta 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 induce 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.

Capitolul 8. Capitolul sangvin 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. 21).

Antigenile sistemului Lewis sunt sintetizate în țesuturi (epiteliul căilor respiratorii, urogenitale, glandelor salivare) și sunt adsorbite pe eritrocite din plasmă. Spre deosebire de alte sisteme antigenice, acesta se află într-o anumită dependență de antigenile

sistemului AB0. Frecvența Ag Lewis variază în diferite grupe sangvine ale sistemului AB0.

Tabelul 21

Caracteristica Ag eritrocitare ale sistemului Lewis

Antigenele sistemului		Fenotipul	Le ^a	Le ^b	Frecvența fenotipului	
ISBT Nr.	Simbolul Ag				Rasa albă	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 statusul 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 expresat 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. Persoanele cu fenotipul Le (a-b-) în 80% din cazuri 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^a și anti-Le^b 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^a și anti-Le^b umani. Unele din ele pot da reacții pozitive în testele cureagenții monoclonali sau cu Ac anti-Le^a 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^x. Acești Ac aglutinează eritrocitele adulților cu fenotipul Le (a+b-) și Le (a-b+), dar nu ale celor cu Le (a-b-). În testele serologice acești Ac se comportă asemeni componentelor cu 2 specificități strâns legate— anti-Le^a și anti-Le^b. Determinanta antigenică a acestui fenotip a fost denumită Le^x. Ea este prezentă pe majoritatea eritrocitelor fetale și cele ale

adulților care expresează sau Ag Le^a sau Le^b: Ac anti-Le^x nu este o formă mai potentă sau avidă a anti-Le^a.

Celulele transplantate după câteva zile de circulație în torentul sangvin pierd Ag Lewis proprii și obțin pe cei ai recipientului.

Anticorpi anti-antigenele eritrocitare LE mai frecvent sunt depistați în serul persoanelor cu fenotipul Le (a-b-). Ei prezintă un amestec de Ac cu două specificități și activitate diversă. Persoanele cu fenotipul Le (a-b+) nu secretă Ac anti-Le^a, deoarece o cantitate minoră de Ag Le^a netransformat este prezentat în saliva și plasmă lor. Ac anti-Le^b, de regulă, nu se întâlnesc în serul persoanelor Le (a+b-), dar ei pot fi prezenți împreună cu anti-Le^a în serul indivizilor Le (a-b-). Ac Lewis sunt prezentați de IgM și nu trec transplacentar. Din această cauză, dar și pentru că Ag sistemului dat sunt slab dezvoltați la naștere, Ac Lewis n-au fost constatați în boala hemolitică a nou-născutului, grație dezvoltării lor tardive. Ei fixează complementul, iar serul colectat proaspăt care conține Ac anti-Le^a (sau foarte rar anti-Le^b) 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 instabile 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^b sunt divizate în 2 categorii: mai frecvent se întâlnesc mostrele serice care reacționează mai relevant cu eritrocitele Le (b+) de grup 0 și A₂, anticorpii cărora sunt specificați ca anti-Le^{bH}. Ac care reacționează evident cu eritrocitele Le^b aparținând tuturor grupelor sangvine AB0 sunt specificate ca anti-Le^{bL}. Anti-Le^{bH}, spre deosebire de Ac anti-Le^{bL}, pot fi neutralizați de saliva persoanelor secretorii de Ag H cu grupul sangvin 0, aceștia având și fenotipul Le (a-b-). În tab. 22 este redată activitatea serologică a Ac sistemului Lewis mai frecvent înregistrați.

Tabelul 22

Activitatea serologică a anticorpilor grupei sangvine Lewis

Anticorpi relevați	Hemoliza <i>in vitro</i>	Soluțe fiziologică		Albumină		Enzime		Asociate cu:	
		+4°C	+22°C	+37°C	TAG	+37°C	TAG	BHNN	CPT
Anti-Le ^a	unele	Majoritatea	majoritate a	unele	multe	majorita-tea	majorit a-tea	Nu	puține
Anti-Le ^b	rar	Majoritatea	majoritate a	puține	uneori	unele	unele	Nu	nu

Anticorpul Lewis din serul pacientului sunt ușor neutralizați de substanțele specifice a grupului sangvin 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 încălzirea prealabilă a test-sistemei sau fără această etapă asigură securitatea necesară a transfuziei.

Așadar, Ac anti-Ag eritrocitare ale sistemului Lewis din serul recipientilor sunt neutralizați de către substanța Le a plasmelor 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^b 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.

Capitolul 9. Sistemul sangvin P și Globoside

Ag P a fost descoperit în 1927 de către Landsteiner și Levin la imunizarea iepurilor cu eritrocite umane. Acest sistem conține Ag P₁. Serul imun obținut astfel reacționează cu un Ag necunoscut, care a fost specificat convențional ca P, iar ulterior denumit P₁. Actualmente simbolul P semnifică Ag prezent practic pe toate hematiile umane. În tab. 23 sunt prezentate fenotipurile Ag P₁ și frecvența de înregistrare a acestora.

Tabelul 23

Antigenele sistemului P

Simbolul antigenului	Fenotipul	Frecvența înregistrării, %
----------------------	-----------	----------------------------

		rasa albă	rasa neagoidă
P ₁	P ₁ +	80	93
	P ₁ -	20	7

Diferite mostre eritrocitare cu Ag P₁ manifestă activitate diversă, care se diminuează dacă hematiile sunt păstrate un timp. Această proprietate a Ag P₁ face dificilă aprecierea specificității Ac serului cercetat.

Ag P, P^k și Luke (LKE) s-au referit primar la sistemul P, mai apoi au fost încadrate în colecția antigenică Globoside. Există fenotipuri mai rar întâlnite – P^k, când eritrocitele dotate cu acest Ag sistematic secretă Ac aloreactogeni cu activitate majoră. Ag P este în esență o sfinolipidă, legată cu epiteliul rinichilor și în poziția sa de receptor deține un rol important în patogenia unor variante de pielonefrită. Ag P₁ este receptor pentru parvovirionul B19, care provoacă eritem infecțios și se intrică în mecanismul patogenetic al maladii. Persoanele care nu dețin un asemenea antigen sunt nonreceptive la acest agent infecțios.

Ac anti-P₁ sunt secretați de mulți indivizi care nu sunt dotați cu Ag P₁ în lipsa stimulului răspunsului imun al Ag eritrocitare. De regulă, Ac anti-P₁ reacționează la temperatura +4°C, cu toate că uneori pot fi detectați și la +37°C (tab. 24).

Tabelul 24.

Activitatea serologică a anticorpilor de grup sangvin P

Anticorp	Hemoliza <i>in vitro</i>	Soluție fiziologică		Albumina		Enzime		Asociate cu:	
		+4°C	+22°C	37°C	TAG	+37°C	TAG	BHNN	CPT
Anti-P ₁	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 ₁ +P+P ^k	Unele mostre	Majoritatea	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Unele mostre	Rar	

De obicei Ac anti-P₁ sunt niște IgM și induc aglutinarea directă a hematiilor în mediul salin, uneori manifestă acțiune litică. Rareori se întâlnesc Ac anti-P₁ cu apartenență la IgG4, detecția cărora se face în testul antiglobulinic, iar rezultatele sunt de valoare clinică.

Ac anti-P₁ pot fi detectați în hemoglobinuria nocturnă paroxistică (anticorpul Donat-Landsteiner).

Reacțiile posttransfuzionale induse de prezența anticorpilor anti-P₁ pot fi atât reacții de tip imediat, cât și întârziate.

Ac anti-P₁ nu provoacă boala hemolitică a nou-născutului grație absenței expresivității Ag P₁ pe eritrocitele nou-născutului și imposibilității lor de a trece transplacentar.

Capitolul 10. Sistemul sangvin Lutheran (LU)

Primar antigenul Lu1 a fost depistat în 1945 într-un ser care conținea diverse tipuri de Ac. În prezent sistemul include 19 antigene (tab. 25), care sunt niște glicoproteine.

Tabelul 25

Antigenele eritrocitare ale sistemului Lutheran

Nr. Ag după ISBT	Simbolul Ag	Nr. Ag după ISBT	Simbolul Ag	Fenotipul	Frecvența, %
LU1	Lu ^a	LU12**	Much	Lu (a+b-)	0,15
LU2**	Lu ^b	LU13**	Hughec	Lu (a+b+)	7,5
LU3**	Lu ^{ab}	LU14*		Lu (a-b+)	92,4
LU4**		LU16**		Lu (a-b-)	rar
LU5**		LU17**			

LU6**	Jank	LU18	Au ^a (Auburger)		
LU7**		LU19	Au ^b		
LU8**		LU20**			
LU9*	Mull	LU21**			
LU11**	Singleton				

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

Ag Lu^a și Lu^b 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 și 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 LU6 și, respectiv, LU8. Ag Au^a (LU18) de frecvență majoră - 80% indivizi ai rasei albe posedă acest Ag și Ag Au^b (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.

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^a, In^b); 3) fenotipul Lu (a-b-) poate fi indus de acțiunea supresorului amplasat pe cromozomul X, recesiv în varianta de manifestare.

Ac anti-Lu^a și anti-Lu^b se întâlnesc mai rar, fiind secretați la gravide sau pe fond de transfuzii sangvine, dar pentru apariția lor nu este necesar stimulul eritrocitar. Acești Ac sunt slab dezvoltați la naștere și nu sunt cunoscuți în ipostaza de cauză a bolii hemolitice, a reacțiilor hemolitice posttransfuzionale. Ac anti-Lu^b reduc durata de viață a eritrocitelor transfuzionate, induc reacții posttransfuzionale ușoare sau nu le provoacă deloc. Majoritatea Ac anti-Lu^a și unele mostre de anti-Lu^b aglutinează eritrocitele suspendate în mediu salin ce posedă Ag respectivi cu formarea aglutinatelor 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. 26.

Tabelul 26

Activitatea serologică a anticorpilor sistemului Lutheran

Interacțiunea cu anti-		Fenotip
Lu ^a	Lu ^b	
+	-	Lu (a+b-)
+	+	Lu (a+b+)

-	+	Lu (a-b+)
-	-	Lu (a-b-)

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

Anticorpii anti-antigenile eritrocitare a sistemului Lutheran aparțin claselor IgM sau IgG. Aceștia se manifestă activi atât la t încăperii, cât și la $+37^{\circ}\text{C}$. Ac anti-Ag Lu induc reacții posttransfuzionale cu hemoliză extravasculară. Unele mostre de Ac sunt prezente sub formă de IgG4 și chiar în prezența conflictului imunologic feto-matern după Ag Lutheran aceștia induc forme ușoare a MHNN.

Capitolul 11. Sistemul sangvin Kidd (JK).

Antigenele sistemului eritocitar Kidd sunt proteine și participă la transportul ureei în celulă. Actualmente sunt cunoscute 3 antigene ale acestui sistem și 4 fenotipuri (tab. 27).

Tabelul 27

Antigenele eritrocitare ale sistemului Kidd (JK)

Antigenele sistemului		Frecvența, %		Fenotipul	Frecvența, %	
nr. după ISB T	Simbolul	rasa albă	rasa negroidă		rasa albă	rasa negroidă
JK1	Jk ^a	77	92	Jk (a+b-)	26,3	51,1
JK2	Jk ^b	74	49	Jk (a+b+)	50,3	40,8
JK3	Jk ^{ab}	>99,9	>99,9	Jk (a-b+)	23,4	8,1
				Jk (a-b-)	rar	rar

			Jk: -3		
--	--	--	--------	--	--

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.

Anticorpii anti-Jk^a au fost depistați primar în 1951 în serul unei femei care a născut un copil ce a făcut MHNN, iar anti-Jk^b - 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^a/Jk^b, demonstrează efectul dozei, reacționând numai cu eritrocitele care conțin o doză dublă de Ag. Activitatea serului păstrat poate care conține anti-Jk^a și a pierdut capacitatea de a reacționa se 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^a și Jk^b 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 absenți în testele serologice primar efectuate. Acest fapt indică importanța studiilor prealabile 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 JkJk conține Ac ce reacționează cu toate mostrele eritrocitare Jk (a+) și Jk (b+), nu, însă, și cu celulele Jk (a-b-).

Capitolul 12. Sistemul sangvin Duffy (FY)

Antigenii 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 (tab. 28).

Tabelul 28.

Antigenele eritrocitare ale sistemului Duffy

Antigenile		Frecvența, %		Fenotipul	Frecvența, %	
Nr. după ISBT	Simbolul Ag	Rasa albă	Rasa neagroidă		Rasa albă	Rasa neagră
FY1	Fy ^a	67	10	Fy (a+b-)	17	9
FY2	Fy ^b	83	23	Fy (a+b+)	49	1
FY3	Fy3	> 99,9	32	Fy (a-b+)	34	22
FY4	Fy4	rar	98	Fy (a-b-)		68
FY5	Fy5	> 99,9	32	La malaiezi frecvența înregistrării Fy ^a atinge 100%		
FY6	Fy6	> 99,9	32			

Conform celor prezentate în tab. 28, Ag FY3 are o frecvență majoră de înregistrare și este prezent pe eritrocitele care posedă atât Ag Fy^a, cât și Ag Fy^b. 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^b, denumită Fy^x, care poate rămâne neobservată, dacă nu se utilizează Ac anti-Fy^b cu activitate majoră. Variantele Fy^a și Fy^b sunt receptori pentru *Plasmodium Knowlesi* și *vivax*. Indivizii care nu sunt dotați cu Ag Fy^a și Fy^b sunt nonreceptivi la malarie. Glucoproteina Duffy a fost identificată ca receptor eritocitar 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^a și Fy^b 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-antigenile 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. 29.

Tabelul 29.

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-Fy3, anti-Fy4, anti-Fy5 au fost testați în serul pacienților cu fenotip Fy (a-b-). Anti-Fy6 prezintă Ac monoclonali murini care reacționează cu toate eritrocitele Fy (a+) /Fy (b+) și nu interacționează cu hematiile Fy (a-b-).

Capitolul 13. Sistemul sangvin 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 prezentați Ac anti-I, dar activitatea lor este slabă, iar pentru a fi examinați se cere utilizarea metodelor enzimatice. 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 până la 1: 64. Cu o mai mare frecvență autoanticorpii anti-I se înregistrează la bolnavii cu macroglobulinemie Waldenström, care se specifică prin sindromul de hemaglutinare *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 mononuclează infecțioasă apar destul de

frecvent Ac anti-*i* care denotă temporar activitate majoră. În tab. 30 este redat caracterul de prezentare a Ac anti-I anti-*i* la temperaturile +4°C și +22°C.

Tabelul 30.

Activitatea serologică a Ac grupei sangvine 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+

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 A₁, ei reacționează intensiv cu eritrocitele care posedă Ag H și I de expresivitate similară. Acești Ac reacționează slab cu eritrocitele adulților de grup sangvin A₁ și cu celulele embrionare ale tuturor grupelor sangvine, dar mai intensiv cu celulele adulților de grup 0. Prezența Ac anti-IH se poate suspecta în cazul când serul pacientului de grupei A induce aglutinarea tuturor celulelor utilizate pentru detecția Ac, dar este compatibil cu toate sau cu majoritatea mostrelor de grupă sangvin A ale donatorilor.

Capitolul 14. Alte sisteme sangvine

14.1 Sistemul sangvin 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 eritocitare ale acestui sistem, dar numai 4 din ele sunt studiate la modul suficient (tab. 31).

Tabelul 31.

Antigenele eritocitare ale sistemului Diego

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

Antigenul Di^a se întâlnește rar. Ag Di^a/Di^b sunt eficienți în calitate de markeri în antropologie grație faptului că Ag Di^a este atestat aproape exclusiv la populația mongoloidă, inclusiv la aborigenii din SUA, unde frecvența lor de înregistrare atinge 36%.

Antigenul Wright (DI 3 și DI 4) s-au 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. Anticorpilor 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 sangvine. Ac anti-Di^b se întâlnesc rar, dar au implicații clinice. Anti-Wr^a sunt Ac naturali și sunt secretați fără stimulația 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 tab. 32

Tabelul 32

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

14.2 Sistemul sangvin 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 eritocitar Yt și reactivitatea imunologică a Ac respectivi este elucidată în tab. 33

Tabelul 33

Fenotipurile sistemului antigenic Yt și reactivitatea serologică a anticorpilor

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

14.3 Sistemul sangvin XG

Acest sistem conține 2 antigeni ^{Xga} și CD99. Ag Xg^a 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 cromozomul X de la fiecare parinte, pe când bărbații - numai un cromozom X de la mamă) a fost specificată ca Ag Xg^a.

Frecvența de înregistrare a diferitor fenotipuri ale Ag Xg^a la bărbați și femei (rasa albă) este elucidată în tab. 34

Tabelul 34

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^a 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^a și CD99 nu a fost studiată. A fost descrisă o mostră de Ac autoimuni cu specificitatea dată. Ac anti- Xg^a pot fi utilizați pentru studiul moștenirii criteriilor genetice legate de cromozomul X.

14.4 Sistemul sangvin 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. 35). Ag SC sunt amplasate pe glicoproteine cu masa moleculară 60-68 kD.

Tabelul 35.

Frecvența fenotipurilor sistemului antigenic SC și activitatea anticorpilor

Fenotipul	Frecvența	Interacțiunea cu Ac anti-
-----------	-----------	---------------------------

	(%) la rasa alba	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 aceluiasi locus la care se referă și sistemul SC, dar există și alte dovezi care confirmă apartenența Ag dat la sistemul sangvin Scianna.

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

14.5 Sistemul sangvin Dombrock (DO).

Acest sistem este reprezentat de 5 antigene: Do^a, Do^b, Gy^a, Hy, Jo^a. Antigenul Do^a se întâlnește la rata de 66%, Do^b 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^a, Hy și Jo^a au o frecvență majoră de înregistrare, iar fenotipurile acestui sistem sunt reprezentate în tab. 36.

Tabelul 36.

Fenotipurile sistemului de antigene eritrocitare Dombrock

Fenotipul	Do^a	Do^b	Gy^a	Hy	Jo^a
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, fișină. De memorat că tripsina, pronaza, α-hemotripsina și reagenții sulfhidrili sunt capabili să scindeze aceste Ag sau să atenueze activitatea lor.

Anticorpul anti-Do^a nu sunt de răspândire largă, în ser fiind prezenți și Ac de altă specificitate, dar ei sunt apti să incite MHNN și RPT de forme ușoare.

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

14.6 Sistemul sangvin Colton (Co)

Acest sistem este reprezentat de trei antigene: Co^a, Co^b, Co3. Antigenul Co^a se înregistrează frecvent, Ag Co^b – este mai rar întâlnit. Co3, ca de altfel și Fy3 ar putea fi produsul uneia din genele Co^a/Co^b. Toți acești anticorpi pot induce reacții posttransfuzionale și MHNN. Frecvența diferitor fenotipuri de asemenea caracter la rasa albă este redată sumar în tab. 37.

Tabelul 37.

Frecvența fenotipurilor sistemului antigenic Colton și reactivitatea anticorpilor

<i>Fenotipul</i>	<i>Frecvența, %</i>	<i>Interacțiunea cu Ac anti-</i>	
		Co ^a	Co ^b
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^a și anti-Co3 pot deveni suportul cauzal al MHNN sau RPT. Ac anti-Co^b induc uneori RPT, nu au fost atestate, însă, și implicații ale acestuia în definiția MHNN.

14.7. Sistemul sangvin Landsteiner-Wiener (LW)

Este reprezentat de 3 antigene: Lw^a, Lw^b și Lw^{ab}, 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 tab. 38

Tabelul 38.

Frecvența fenotipurilor antigenice și reactivitatea anticorpilor ale sistemului LW

<i>Fenotip</i>	<i>Frecvența, %</i>	<i>Interacțiunea Ac anti-</i>
----------------	---------------------	-------------------------------

		Lw ^a	Lw ^b
Lw (a+b-)	Foarte rar	+	-
Lw (a+b+)	< 1	+	+
Lw (a-b+)	> 99	-	+

Deoarece Ag LW sunt adesea atestați 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 expresia 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.

14. 8. Sistemul sangvin Chido-Rodgers (CH/RG)

Încadrează 7 antigene eritrocitare: Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, WH. Antigenele de acest grup sunt frecvent înregistrate și se situează pe componenta 4 a complementului (C4). Ele nu sunt caracteristice pentru eritrocite, dar sunt absorbite pe suprafața lor. Fenotipurile antigenice ale acestui sistem sunt redată în tab. 39.

Tabelul 39.

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

<i>Fenotul</i>	<i>Frecvența aproximativă, %</i>
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.

14.9. Sistemul sangvin Gebrich (GE).

Respectivul sistem conține 7 antigene: Ge2, Ge3, Ge4, Wb, Ls^a, An^a, Dh^a, dintre care 3 (Ge2, Ge3 și Ge4) se întâlnesc frecvent, iar celelalte 4 (Wb, Ls^a, An^a, Dh^a) – destul de rar. Fenotipurile mai frecvent înregistrate ale sistemului Gε sunt redată în tab. 40.

Fenotipurile antigenice ale sistemului Gebrich

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

Ag Ge2, Wb, Ls^a, An^a, Dh^a sunt scindate de papaină, fișină, iar Ag Ge3 se manifestă rezistent la acțiunea proteazelor. Anticorpul anti-Ge pot fi imunogeni și sunt secretați prin stimularea eritrocitară. Acești Ac 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 MHN.

14.10. Sistemul sangvin Cromer (CROM).

Acest sistem este reprezentat de 11 antigene: Cr^a, Tc^a, Tc^b, Tc^c, Dr^a, Es^a, IFC, WES^a, WES^b, UMC, GUII care se atestă cu o frecvență variabilă (tab. 41).

Tabelul 41

Antigenele de u frecvență majoră și minoră a sistemului Cromer

Antigen	Frecvența, %	Antigen	Frecvența, %
Cr ^a	> 99	Es ^a	> 99
Tc ^a	> 99	IFC	> 99
Tc ^b	< 1	WES ^a	< 1
Tc ^c	< 1	WES ^b	> 99
Dr ^a	> 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^a, -WES^b și Tc^a 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 intra în dezvoltarea complicațiilor posttransfuzionale și a bolii hemolitice a nou-născutului.

14.11. Sistemul sangvin Knops (KN).

Încadrează 8 antigene: Kn^a, Kn^b, McC^a, SII, 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 negroidă tab. 42.

Tabelul 42

Frecvența fenotipurilor antigenice a sistemului Knops

Fenotipul	Frecvența aproximativă, %	
	Rasa alba	Rasa negroidă
Kn (a+) McC (a+)	97,0	95,0
Kn (a+) McC (a-)	2,0	4,0
Kn (a-) McC (a+)	1,0	1,0
Kn (a-) McC (a-)	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. Anticorpii anti-Ag Knops nu au și implicații clinice.

14.12. Sistemul sangvin 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. 43

Tabelul 43.

Frecvența fenotipurilor antigenice și reactivitatea anticorpilor sistemului Indian

Fenotipul	Frecvența, %	Interacțiunea cu anti-	
		In ^a	In ^b
In (a+b-)	Foarte rar	+	-
In (a+b+)	< 1,0	+	+
In (a-b+)	> 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 alela amorfă sau care sunt purtători ai genei supresoare a cromozomului X. Ag sunt sensibile la acțiunea papainei, fișinei ș.a. Ac anti-In^a nu au importanță clinică. Anticorpii anti-In^b sunt rar secretați, dar există descrierea unui caz de RPT indusă de acest tip de Ac.

14.13. Sistemul sangvin Kx

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

14.14. Sistemul sangvin Ok

Acest sistem antigenic este reprezentat de un singur antigen Ok^a, 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.

14.15. Sistemul sangvin Raph (RAPH)

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

14.16. Sistemul sanvuin JMH

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

14.17. Sistemul de antigene eritrocitare GIL

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

Capitolul 15. Sistemul antigenic granulocitar și trombocitar

Antigenile granulocitare

Granulocitele mature posedă antigene specifice care includ NAI și NA2, NB1 și NB2 - produse ale locusului doi, NC1, ND1 și NE1, 9a și o serie de Ag înrudite denumit antigene granulocitare umane (*human granulocyte antigens, HGA*): HGA-3a, -3b, -3c, -3d și -3e. Anticorpilor 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. Anticorpilor 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.

Antigenile trombocitare

Trombocitele sangvine au o structură antigenică destul de complexă. Ele includ antigene tisulare generale și trombocitare specifice, conțin antigene caracteristice eritrocitelor (ABO, Rh, M, N,P, Le^a, Kell, Dafify, 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 membranare. Specificitățile și frecvența fenotipurilor antigenilor trombocitare umane este elucidată în tab. 44.

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 (α) și unul mic (β), conjugate prin legături disulfidice.

Aloantigenele trombocitare sunt imunogene. Transfuziile, sarcinile repetate pot provoca apariția de izoanticorpi antitrombocitari. Incompatibilitatea feto-maternă prin anticorpi antitrombocitari este demonstrată clinic, hematologic și imunologic. Ele se implică în apariția purperei post-tranfuzionale și trombocitopenice aloimune neonatale. Sensibilitatea la Ag HPA-A1 (PI^{AI}) este cauza complicațiilor posttransfuzionale și a

purpurei neonatale în 70 % de cazuri. Anticorpul anti - HPA-5b, -4a, -4b și 3a (Br^a Pen^a, Pen^b și, respectiv, Bac^a) de asemenea pot fi cauza purpurei aloimune neonatale.

Tabelul 44

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 ^A	HPA- 1a HPA-1b	ZW, PI ^{AI} ZW, PI ^M	97,9 26,5	99,9 3,7
HPA-2	GP I b	Ko ^b , Sib	HPA-2a HPA-2b	Ko ^b Ko ^a , Sib ^a	99,3 14,6	25,4
HPA - 3	GP IIb	Bac, Lek	HPA-3a HPA-3b	Bac ^a , Lec ^a Bac ^b	87,7 64,1	78,9
HPA-4	GP III b	Pen, Yuk	HPA-4a HPA-4b	Pen ^a , Yuk ^b Pen ^b , Yuk ^a	99,9 0,2	99,9 1,7
HPA-5	GPIa	Br, Hc Za v	HPA-5a HPA-5b	Br*, Zav ^b , Br ^a , Zav ^a , Hc ^a	99,2 20 6	-

Notă: nu au fost efectuate cercetări

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 anticorpi antitrombocitari. Traversarea și aparența acestora în circulația sangvină 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 Na₂-1 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 16. Algoritme pentru diagnosticul de laborator al complicațiilor posttransfuzionale și al bolii hemolitice a nou-născutului

Transfuziile sangvine pot fi însoțite de diverse reacții și complicații de geneză 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 geneză imună sunt rezultatul conflictului dintre componentele sangvine ale donatorului și cele ale recipientului (tab. 45).

Tabelul 45

Clasificarea complicațiilor posttransfuzionale de geneză imună

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

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).

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 citokinele 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 sangvine.

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 20 000 – 50 000 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 10 000 transfuzii).

Aloimunizarea la Ag eritrocitare, leucocitare, trombocitare se dezvoltă după transfuziile repetate de sânge care conțin Ag absente la recipienti. 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 sangvine și crește odată cu majorarea numărului de transfuzii. Aloimunizarea la Ag leucocitare se produce în 20-70% cazuri de transfuzii sangvine 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-gazdă dependentă de transfuzie apare în cazul când limfocitele T ale donatorului reacționează cu Ag gazdei (recipientului), care sunt recunoscute ca non-proprie. Pot apărea și Ac. Fenomenele suscituate 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 status 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 sangvine, luând în calcul coraportul efectului clinic așteptat și riscul apariției complicațiilor.

Analiza comparativă a reacțiilor și complicațiilor hemolitice acute și tardive este elucidată în tab. 46.

Tabelul 46

Reacțiile și complicațiile hemolitice acute și tardive (evaluare panoramică)

Criterii	Acute, de tip imediat	Tardive
Însemne clinice	• Hipertermie, febră, dureri în locul injectiei, tahicardie, dureri în regiunea lombară; • Evoluție rapidă (primele ore); • Consecințe grave	• Hipertermie; • Apariție peste 5-7 zile după transfuzie; • Minorizarea hemoglobinei și hematocritului; • Icter slab manifest;
Complicațiile principale	• Sindromul coagulării intravasculare coagulate; • Insuficiență renală; • Șoc; • Deces	• Complicații neesențiale; • Reacții mai puțin grave;
Cauzele	Interacțiunea Ag și Ac cu: • hemoliză intravasculară și activarea sistemului complementului (mai frecvent prin incompatibilitatea AB0) ; • hemoliză extravasculară în rezultatul interacțiunii cu macrofagele (mai frecvent incompatibilitatea Rh) ;	Interacțiunea Ag cu Ac • Recipientii au Ac în concentrații minore sau Ac nu se depistează • Specificitatea Ac la Ag Rh, Duffi, Kidd
Frecvența înregistrării	1:25000 transfuzii	1:2500 transfuzii
Rezultatele investigațiilor de laborator	• Hemoglobina liberă a plasmei majorată; • Bilirubina serică majorată; • Haptoglobina scăzută; • Hemoglobinurie; • Testul antiglobulinic	• Testul antiglobulinic direct pozitiv; • Screening-ul Ac după transfuzie pozitiv; • Hemoglobina, hematocritul scăzut

	Coombs direct pozitiv sau negativ	
Tratamentul	• Tratamentul sindromului coagulării intravasculare diseminate, al hipotoniei; • Dializă - în caz de insuficiență renală; • Menținerea vascularizării adecvate a rinichilor	• Transfuzii eritrocitare fără Ag anti-Ac recipientului; • Nu este necesar un tratament suplimentar
Măsurile profilactice	• Implementarea sistemului de profilaxie a erorilor la marcarea și identificarea mostrelor sangvine; • Asigurarea calității de realizare a cercetărilor imunohematologice asupra sângelui donatorului și recipientului.	• Anamneză riguroasă transfuzională și obstetricală

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 respectivă. 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 sangvine recoltate după transfuzie este insugestivă deoarece conține și hematiile donatorului.

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 sangvine ale recipientilor, efectuarea și interpretarea corectă a probei de compatibilitate, controlul apartenenței AB0);

- recoltarea mostrei sangvine 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. Disparația 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 sangvine ale recipientului până și după transfuzie, resturile mediilor hemotransfuzionale utilizate se testează din nou pentru a se verifica apartenența de grup sangvin 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 eritrocitare 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 sangvine 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 posthemotransfuzie este indicată reacția Coombs directă cu eritrocitele recipientului. Rezultatul pozitiv indică prezența Ac absorbiți pe hematiile recipientului. Cercetarea eluatului 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. Aprecieria necoresponderii profilului antigenic al eritrocitelor donatorului și recipientului sugerează necesitatea cercetării ulterioare a specificității aloanticorpilor din sângele recipientului. Tipizarea mostrei sangvine 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 sangvină este posibilă cu o mostră sangvină 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 sangvin 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 sangvin matern și în sarcina cu evoluție normală, dar aceasta este insuficientă 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 sangvine 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 sangvin 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.

Distrucția eritrocitelor fetale sensibilizate cu Ac evoluează lent, dar progresiv, în special în ficat. Macrofagele ficatului, având receptori pentru fragmentele Fc IgG, realizează distrucția 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. Postnatal 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 hiperbilirubinei 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 imunohematologică a gravidelor include anamneza obstetricală și transfuzională, testarea grupei sangvine după sistemele AB0 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 tab. 47 este prezentată importanța Ag eritrocitare și Ac în declanșarea MHNN.

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.

Tabelul 47

Importanța Ag eritrocitari și Ac în apariția MHNN

Sistemul antigenic eritrocitar	Ac frecvent includ MHNN	Ac pot induce MHNN	Ac nu induce MHNN
AB0	Anti-A, -B		Anti-A ₁ ,
MNS	Anti-S, -s, -U	Anti-M	Anti-N
P			Anti-P ₁ ,
Rhesus	Anti-D, -c, -C, C ^w , -E, anti-e, anti-G		
Lutheran		Anti-Lu ^a , -Lu ^b	
Kell	Anti-K, -k	Anti-Kp ^b	
Levis			Anti-Le ^a , -Le ^b
Duffi	Anti-Fy ^a	Anti-Fy ^b	
Kid		Anti-Jk ^a , -Jk ^b	

Cercetarea algoritmică a femeilor gravide este elucidată în fig. 11.

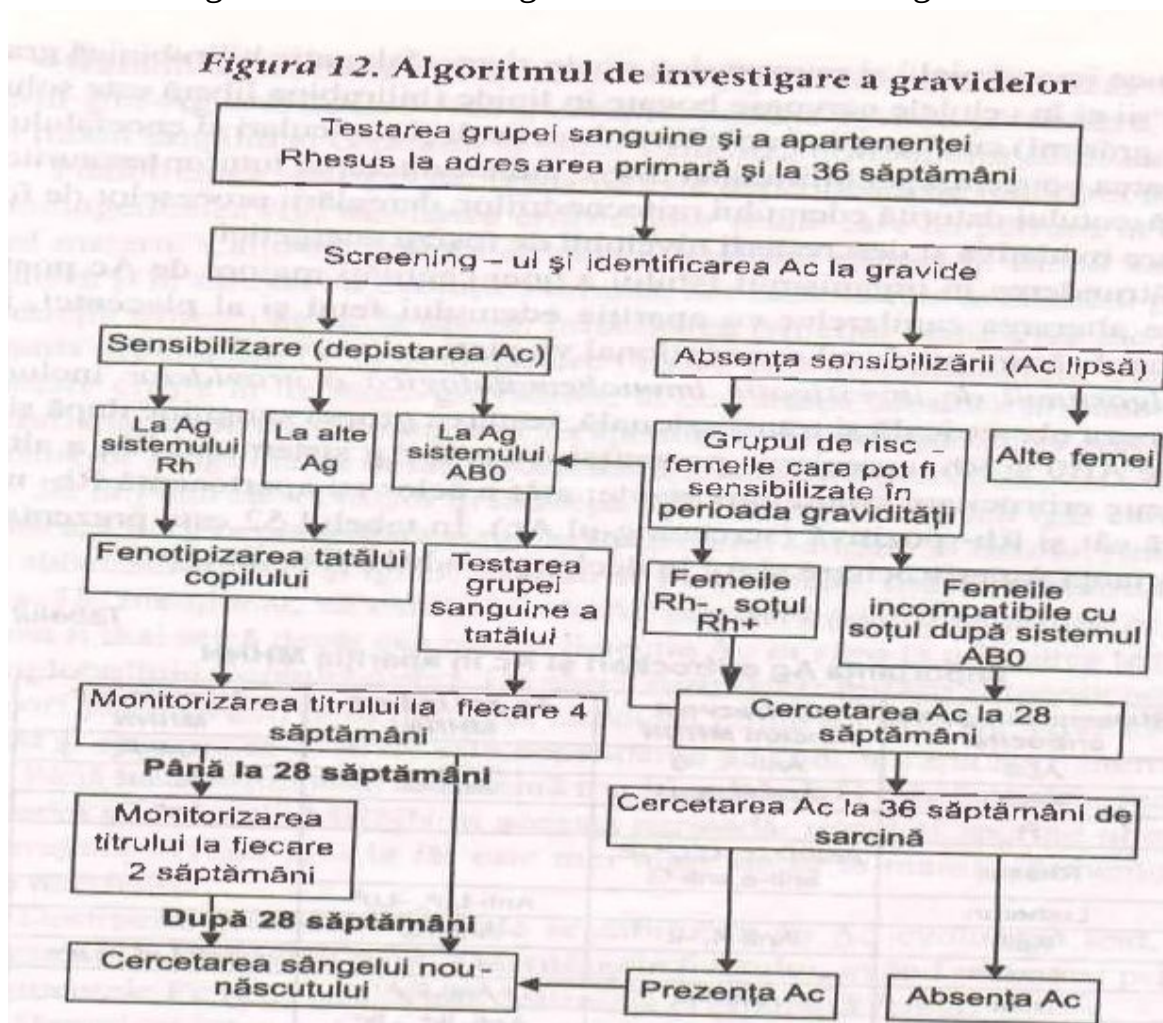


Figura 12. Algoritmul de investigare a gravidelor

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

- sensibilizate;
- nesensibilizate;
- cu risc major de aloimunizare (cu apartenență sangvină Rh-negativă și cu soț Rh-pozitiv, cu anamneză complicată, gravidele grupa sangvină 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 adresa 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 AB0 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 aloanticorpi asemenea gravidelor cu apartenență sangvină Rh-negativă. La necesitate li se efectuează testarea Ac de subclasele IgG materne.

Controlul imunohematologic al nou-născutului pentru diagnosticul MHNN include:

- Testarea grupei sangvine 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 intraombilicale, deseori la naștere sunt tipizați ca fiind D-negativi sau slab pozitivi, 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 sangvine de importanță clinică în serul matern și al nou-născutului;

- Testarea Ac IgG anti-A și anti-B în serul sangvin matern la diferențele de grup sangvin matern și fetal după sistemul AB0. Rezultatul pozitiv denotă despre conflictul imunologic mamă și nou-născut după Ag eritrocitare ale sistemului AB0;

- 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 două 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 1000 rot/min pe parcursul a 3 min. Se amestecă cantități egale de eritrocite și sol. de 0,9% NaCl, care se incubează 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 1000 rot/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 rot/min timp de 2 min, eluatul se transferă într-un tub curat și se cercetează la prezența Ac.

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

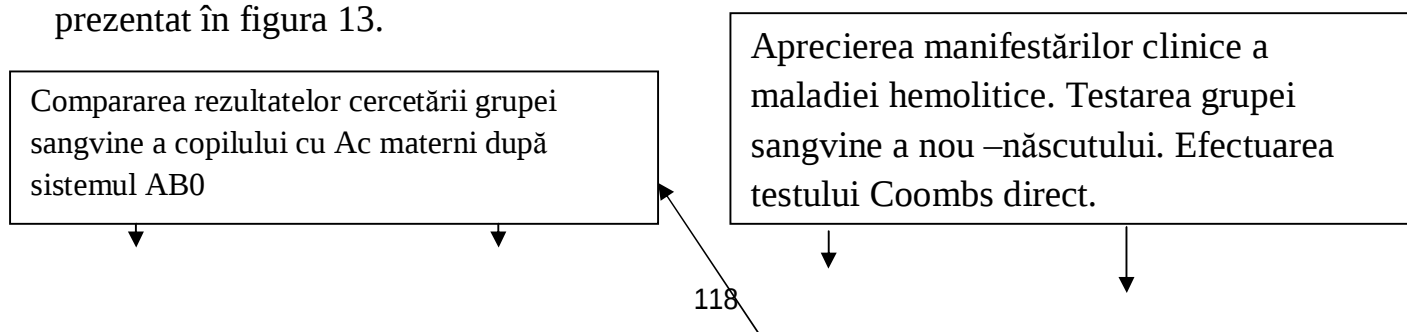
Așadar, Ac anti-A și anti-B prezintă un amestec de IgM și IgG naturale și imune, ce rezultă din imunizarea cu Ag identice A și B, care se conțin în peretele membranelor bacteriilor. Posibil că acestui fapt i se datorează procentul major de înregistrare a MHNN la primii născuți, dependența de incompatibilitate după sistemul AB0 comparativ cu sarcina incompatibilă după Ag sistemului Rh. Ag ABH aparținți precoci 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 precocă. MHNN dependentă de sistemul AB0, 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 sangvină 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.



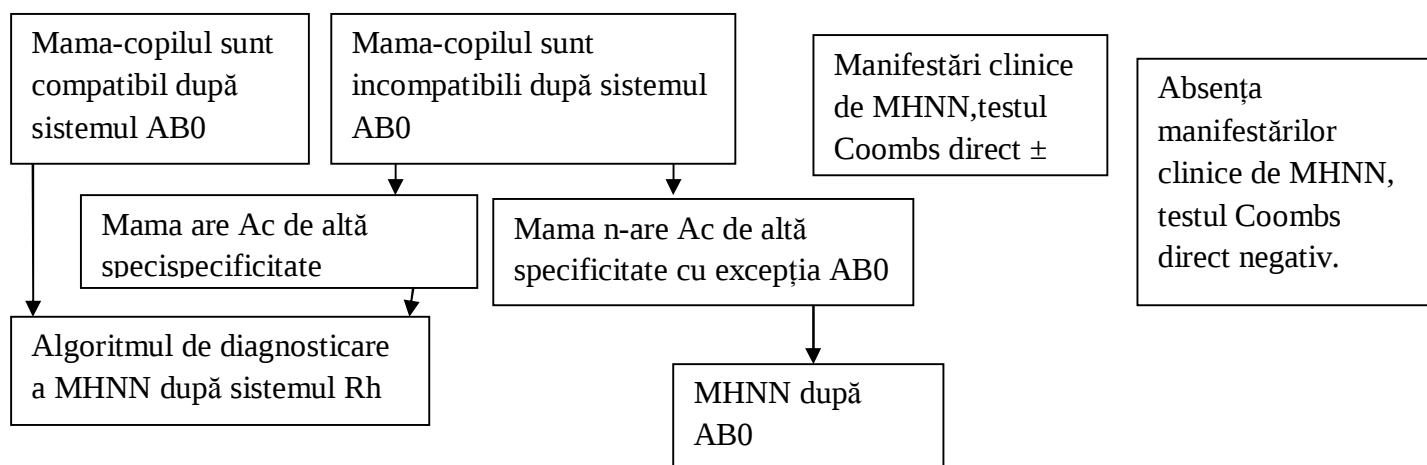


Figura 13. Algoritmul de diagnosticare a maladii hemolitice a nou-născutului după sistemul AB0

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. TAD este întotdeauna pozitiv în formele severe.

MHNN dependentă de incompatibilitatea materno-fetala 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. Altele 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 induce MHNN de aceeași severitate ca și anti-D, care se poate finaliza cu hidrops, exitus. Ac anti-C, Ce, C^w rar induce MHNN care să necesite tratament.

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

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;
- TAD 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 (100-300 mg).

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).

Anticorpii anti-K aparțin 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.

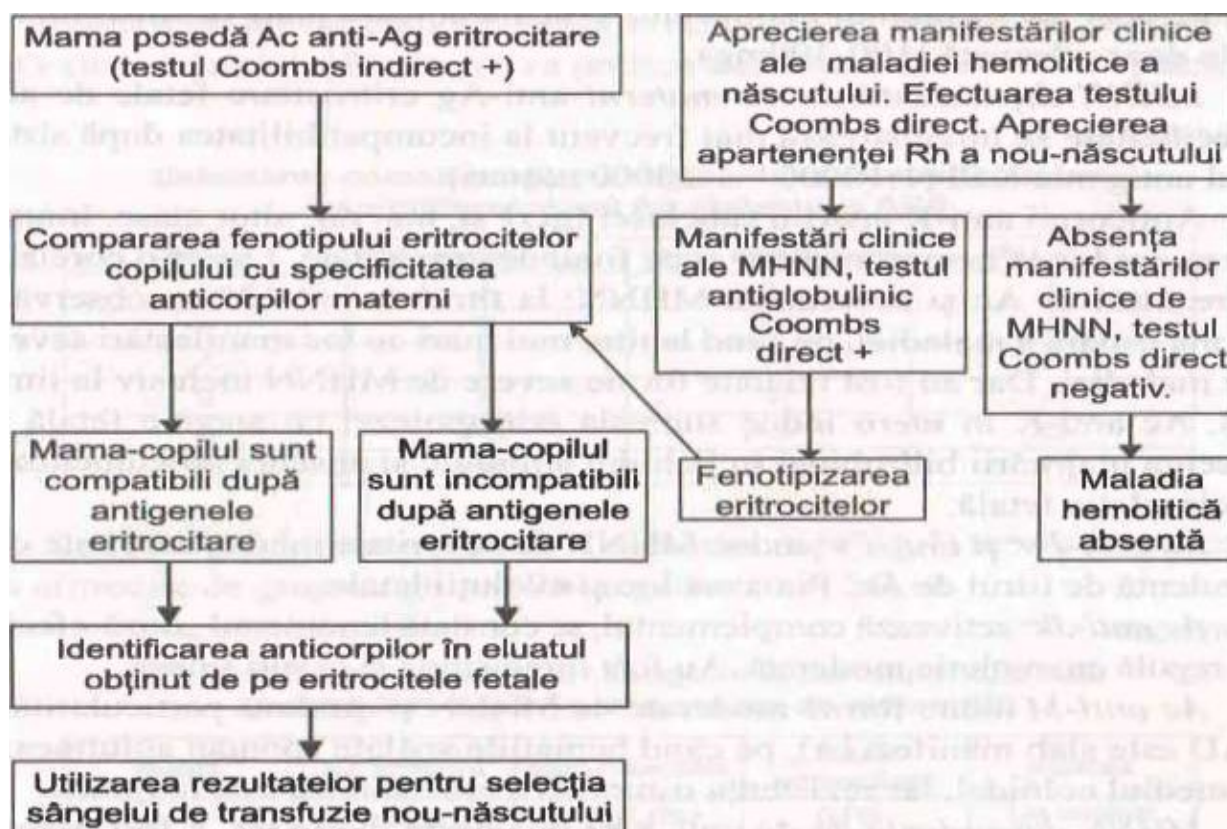


Figura 14. Algoritmul de diagnosticare a maladii hemolitice a nou-născutului după sistemul antigenic Rh și alte Ag de valoare clinică

Ac anti-Fy^a și anti-Fy^b induc MHNN de severitate medie, care este dependentă de titrul de Ac. Pot avea loc și evoluții letale.

Ac anti-Jk^a 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 sangvin. Nivelul bilirubinei serice de peste 340 $\mu\text{mol/l}$ 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 selectarea componentelor

sangvini pentru transfuzie se va efectua reieșind din specificitatea Ac materni.

În tab. 48 este prezentată modalitatea de selectare a componenților sangvini pentru transfuzie în cazul, când grupul sangvin 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 48

Selectarea componenților sangvini în incompatibilitatea feto-maternă după Ag sistemului AB0

Mama	Nou-născutul	Componente eritrocitare	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 sangvin 0 Rh-negative (tab. 48).

Tabelul 47

Selectarea componenților sangvini la incompatibilitatea „mamă-făt” după Ag eritrocitare de sistem Rh

Mama	Ac materni	Nou-născutul	Componente eritrocitare	Plasma
O Rh-	anti-D	0, A.B.Rh+	0Rh-	De același grup sangvin cu nou-născutul sau AB
A,B,Rh-	anti-D	0 Rh+	0 Rh-	
A Rh-	anti-D	B Rh+	0Rh-	
B Rh-	anti-D	A Rh+	0Rh-	

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.

Capitolul 17. Biosecuritatea și biosiguranța în laboratorul imunohematologic

Conceptul de biosecuritate prezintă cerințele minime pentru laboratoare clasificate pe toate nivelele de biosiguranță, care se referă la clasele de risc 1-4. Deși unele precauții pentru grupul de risc 1 pot părea mai puțin justificate, se recomandă aplicarea lor cu scopul însușirii și promovării practicilor corecte de laborator. Toate laboratoarele medicale (de sănătate public, de diagnostic clinic, imunohematologice, etc) trebuie concepute conform unui nivel de biosiguranță 2 sau peste. Deoarece nici un laborator nu are un control complet asupra probelor pe care le primește, personalul din laborator poate fi expus la microorganisme din grupuri de risc superioare celor anticipate. Această posibilitate trebuie luată în considerare când se elaborează planurile și politicile de biosiguranță. De regulă, precauțiile standard trebuie adoptate și aplicate întotdeauna ținând cont de premisele internaționale și naționale. Regulile pentru laboratoarele de bază (nivel de biosiguranță 1 și 2), inclusive cele imunohematologice trebuie să fie cuprinzătoare și detaliate.

Codul de biosiguranță

Acest cod este o listă a celor mai importante practici și proceduri de laborator care stau la baza practicilor microbiologice corecte (good microbiological techniques = GMT). În multe laboratoare și programe naționale în care acestea participă, acest cod se poate utiliza pentru elaborarea de reguli și proceduri scrise pentru efectuarea în siguranță a operațiunilor în laborator. Fiecare laborator trebuie să adopte o politică de siguranță sau de operațiuni care să identifice pericolele cunoscute sau potențiale, precum și procedurile și practicile specifice pentru eliminarea sau reducerea la minimum a acestor pericole. GMT sunt fundamentale pentru siguranța activităților de laborator. Echipamentul special de laborator este un element suplimentar, care nu va putea însă niciodată să înlocuiască aplicarea procedurilor corecte.

Accesul în laboratorul imunohematologic

- Sigla internațională de avertizare și inscripția «Pericol biologic» (Figura 15) trebuie să fie afișate pe ușile încăperilor unde sunt manipulate materialele potențial infectate;
- Numai persoanele autorizate vor fi lăsate să intre în zonele de lucru ale laboratorului;
- Ușile laboratorului trebuie să stea închise;
- Copiii nu trebuie lăsați să intre în zonele de lucru ale laboratorului;
- Accesul în laborator trebuie să se facă pe baza unei autorizații;



Figura 15. Sigla de pericol biologic

Caracteristicile laboratorului imunohematologic

Laboratorul trebuie să dispună un spațiu suficient pentru desfășurarea în siguranță a muncii de laborator și pentru curățenie și întreținere. Pereții, tavanele și pavimentele trebuie să fie netede, ușor de curățat, impermeabile la lichide și rezistente la substanțele chimice și dezinfectantele folosite uzual în laborator. Pavimentele nu trebuie să fie alunecoase. Suprafața meselor de lucru trebuie să fie impermeabilă la apă, rezistentă la dezinfectante, acizi, baze, solvenți organici și la căldură. Iluminatul trebuie să fie adecvat pentru desfășurarea tuturor activităților. Reflexiile și strălucirile nedorite trebuie evitate. Mobilierul de laborator trebuie să fie rezistent. Spațiile deschise între și sub mese, echipamentul trebuie să fie accesibile pentru curățenie. Trebuie prevăzute spații de depozitare adecvată a materialelor de folosință imediată, prevenind astfel aglomerarea acestora pe mesele de lucru și în spațiile libere dintre acestea. Depozitarea pe termen lung a unor material se va efectua în spații respective, localizate corespunzător în afara zonelor de lucru. Sunt necesare spații și facilități adecvate pentru manipularea și depozitarea în siguranță a solvenților, dezinfectanților, etc.. Spațiile pentru păstrarea îmbrăcăminții și încălțămintei de stradă, a obiectelor personale și pentru păstrarea alimentelor trebuie asigurate în afara zonelor de lucru. Chiuvete cu apă curentă pentru spălarea mâinilor trebuie să existe în fiecare încăpăre a laboratorului, preferabil lângă ușa de ieșire. Ușile trebuie să aibă geamuri sau vizoare, să fie conforme cu normele de protecție contra incendiilor și, de preferat, să se închidă singure. Sistemele de securitate trebuie să cuprindă protecția împotriva incendiilor, urgențelor electrice, să prevadă dușuri de urgență și facilități pentru spălarea ochilor. Trebuie să existe zone de prim ajutor echipate adecvat și accesibile. La proiectarea de facilități noi, trebuie luată în considerare asigurarea de sisteme mecanice de ventilație, care să asigure un flux de aer direcționat spre interior, fără recirculare. Dacă nu există ventilație mecanică, ferestrele trebuie să se poată deschide și trebuie prevăzute cu plase împotriva pătrunderii insectelor. Aprovizionarea cu apă curentă de bună calitate este esențială. Nu trebuie să existe interconectări ale surselor de apă ale laboratorului cu cele de aprovizionare cu apă potabilă. Un dispozitiv anti-reflux trebuie să protejeze sistemul public de aprovizionare cu apă. Este necesar să existe o sursă sigură și adecvată de curent electric și un sistem de iluminare pentru situațiile de urgență care să faciliteze ieșirea din laborator. Un generator de rezervă este de dorit pentru susținerea echipamentelor esențiale (frigidere, congelatoare, incubatoare, etc.). Trebuie avute în vedere securitatea fizică și împotriva incendiilor. Ușile solide, ferestrele protejate și eliberarea controlată a cheilor de acces sunt obligatorii. Planul de evacuare a personalului de laborator va fi afișat pe perete la un loc vizibil, iar alături vor fi afișate telefoanele de contact al directorului instituției, șefului de laborator imunohematologic, inginerului șef, pompierilor, serviciul de urgență

medical, electricitate și apă. În laborator trebuie păstrată curățenia și ordinea, eliminându-se toate materialele care nu sunt necesare pentru munca desfășurată în laborator. Suprafețele de lucru trebuie decontaminate după fiecare vărsare de materiale potențial periculoase precum și la sfârșitul zilei de lucru. Toate materialele potențial infectate, trebuie decontaminate înainte de a fi îndepărtate sau curățate pentru refolosire. Ambalarea și transportul trebuie să respecte reglementările naționale și/sau internaționale în vigoare.

Managementul biosiguranței

Șeful de laborator (persoana care poartă în mod direct responsabilitatea biosecurității) are obligația să asigure elaborarea și adoptarea unui plan de management al biosiguranței și ale unei politici de siguranță și operațiuni. Responsabilul de acest compartiment, trebuie să asigure instruirea periodică a personalului laboratorului în domeniul siguranței. Acesta trebuie avertizat asupra pericolelor posibile și are obligația să citească politica de siguranță și operațiuni și să respecte procedurile și practicile standard. Responsabilul laboratorului trebuie să se asigure că toți membrii personalului au însușit aceste reguli. O copie a politicii de siguranță și operațiuni trebuie să existe permanent în laborator pentru a putea fi consultată în orice moment. Trebuie să existe un program de dezinfecție și dezinsecție. În caz de necesitate, pentru toți membrii personalului, se realizează o evaluare medicală adecvată, supraveghere și tratament, și trebuie ținute evidențe medicale adecvate.

Pentru protecția individuală a persoanelor este necesară asigurarea acestuia cu salopete de laborator, halatele care trebuie folosite pe parcursul lucrului în laborator. Mănuși corespunzătoare de protecție trebuie purtate în timpul tuturor procedurilor care pot implica contactul direct sau accidental cu sânge, cu alte umori sau fluide ale organismului, cu alte materiale potențial infecțioase. După utilizare, mănușile se scot aseptice și se spală mâinile. Personalul trebuie să se spele pe mâini după manipularea materialelor potențial infecțioase și înainte de părăsirea zonei de lucru a laboratorului.

Ochelarii de protecție, ecranele de protecție facială sau alte dispozitive de protecție trebuie purtate ori de câte ori este necesară protecția ochilor și a feței de stropi, obiecte. Este interzisă purtarea îmbrăcăminte protecoare de laborator în afara laboratorului, de exemplu în cantine, camere de oficiu, WC, etc. Încălțăminte decupată în partea din față (sandale) este improprie purtării în laborator. Consumul de alimente, lichide, machiajul și manipularea lentilelor de contact sunt interzise în zonele de lucru ale laboratorului. Depozitarea de alimente sau băuturi oriunde în zona de lucru a laboratorului este interzisă. Îmbrăcăminte și încălțăminte de protecție ce a fost

utilizată în laborator nu trebuie să fie depozitată în aceleași dulapuri cu îmbrăcămintea și încălțăminte de stradă.

Autoritatea angajatoare, prin șeful de laborator, este responsabilă de asigurarea unei supravegheri adecvate a stării de sănătate a personalului laboratorului. Obiectivul acestei supravegheri este monitorizarea stării de sănătate în relație cu factorul ocupațional.

Activitățile ce trebuie desfășurate pentru îndeplinirea acestor obiective sunt:

- Imunizarea activă și pasivă ori de câte ori acest lucru este indicat.
- Facilitarea depistării precoce a infecțiilor dobândite în laborator.
- Excluderea indivizilor cu susceptibilitate crescută, ca de exemplu femeile însărcinate sau persoanele imunodeprimăte, din locurile sau activitățile de laborator cu pericolozitate crescută.
- Asigurarea personalului cu echipamente de protecție și proceduri eficiente.
- Se recomandă raportarea promptă a stărilor de boală sau a accidentelor de laborator, iar întreg personalul trebuie să fie conștient de importanța respectării practicilor corecte.
- Pentru personalul de laborator care manipulează cu material potențial infectat la nivel de biosiguranță 2, este necesar un control medical înainte de angajare, înregistrarea antecedentelor personale medicale și evaluarea stării de sănătate în relația cu factorul ocupațional.
- Înregistrările privind îmbolnăvirile și absențele ar trebui păstrate de către șeful laboratorului.
- Femeile de vârstă fertilă ar trebui informate cu privire la riscul expunerii fătului prin factor ocupațional la anumite microorganisme (ex. virusul rujeolic). Precauțiile pentru protejarea fătului variază în funcție de microorganismele la care pot fi expuse viitoarele mame.

Erorile umane și tehnica deficitară pot compromite și cele mai bune reguli și bariere de siguranță menite a proteja personalul laboratorului. Pe de altă parte, un personal conștient de exigențele impuse de regulile de siguranță, bine informat pentru recunoașterea și stăpânirea pericolelor din laborator, este cheia prevenirii producerii acestor infecții, a incidentelor și accidentelor. În acest scop, instruirea continuă la locul de muncă privind măsurile de siguranță este esențială. Un program eficient de siguranță începe cu conducerea laboratorului, care trebuie să se asigure că practicile și procedurile de siguranță sunt integrate în instruirea de bază a salariaților. Instruirea în ceea ce privește măsurile de siguranță trebuie să fie parte integrantă a instruirii noilor salariați din laborator. Salariaților trebuie să li se prezinte codul de practici și reglementările locale, inclusiv manualul de siguranță și de operațiuni. Se vor lua măsuri care să

demonstreze că salariații le-au citit și înțeles, spre exemplu, prin semnătură. Responsabilii laboratorului joacă un rol cheie în pregătirea personalului în ceea ce privește tehnicile corecte de laborator. Responsabilul de biosiguranță poate să sprijine procesul de instruire prin punerea la dispoziție a unei documentații specifice și a altor mijloace ajutătoare.

Instruirea personalului ar trebui să cuprindă întotdeauna informații despre metodele sigure în cazul procedurilor cu risc de infectare, cu care întreg personalul laboratorului se întâlnește în mod curent și care implică :

1. Riscul de infectare, la deschiderea recipientelor ce conțin probe de sânge/ser, centrifugări.
2. Manipularea sângelui și a altor produse potențial periculoase.
3. Decontaminarea și eliminarea materialelor potențial infecțioase.

Manipularea în siguranță a probelor sangvine include recoltarea, transportarea și prelucrarea respectivă a mostrelor. Probele vor fi colectate în dispozitive din sticlă sau plastic (preferabil). Ele trebuie să asigure integritatea materialului colectat, fără scurgeri. Acestea vor fi etichetate pentru identificare și însoțite de documentele necesare amplasate separate într-un ambalaj impermeabil. La transportul probelor se va evita scurgerea accidentală a materialelor prin utilizarea containerelor secundare, amplasarea corectă a dispozitivelor. Primirea probelor se efectuează într-un spațiu special destinat sau într-o încăpere destinată acestui scop la un număr mare de probe. Personalul care recepționează mostrele trebuie să fie precaut pentru evitarea infectării în special în cazul spargerii recipientului. Cioburile de sticlă se înlătură cu o pensetă într-un vas cu soluție dezinfectantă, iar locul vărsării sângelui prelucrat cu soluții dezinfectante.

Separarea serului trebuie efectuată prin utilizarea dispozitivelor respective (mănuși, pipete, ochelari pentru protecția ochilor, etc.). Este interzisă pipetarea cu gura. Vîrfurile utilizate vor fi colectate într-un vas cu soluție dezinfectantă, iar eprubetele cu cheagul restant vor fi instalate într-un container pentru autoclavare și incinerare. Dezinfectantele vor fi utilizate și pentru prelucrarea locurilor în cazul lichidelor vărsate. Soluțiile dezinfectate folosite trebuie să fie aprobate la nivelul instituției. La centrifugarea mostrelor se va ține cont de instrucțiunile producătorului, de echilibrarea tuburilor, de respectarea regimului de curățare și dezinfectare a echipamentului.

Manipularea deșeurilor

Se consideră deșeuri toate materialele care se elimină. În laboratoare, de desfășurarea activității cotidiene, decontaminarea deșeurilor și eliminarea finală a acestora sunt strâns legate. Un număr foarte mic de materiale contaminate necesită îndepărtarea efectivă din laborator sau distrugerea. Majoritatea sticlăriei, instrumentelor și articolelor de îmbrăcăminte sunt refolosite sau reciclate.

Principiul general ce trebuie să funcționeze este că toate materialele potențial infecțioase vor fi decontaminate, autoclavate sau incinerate în laborator.

Autoclavarea cu abur este metoda de elecție pentru toate procesele de decontaminare. Materialele care urmează să fie decontaminate și eliminate vor fi puse în containere adecvate (ex. saci din plastic autoclavabil, cu coduri de culori care indică destinația conținutului acestora pentru autoclavare și/sau incinerare). Pot fi luate în considerație și metode alternative doar dacă acestea îndepărtează și/sau omoară microorganismele.

Trebuie adoptat un sistem de identificare și de separare a materialelor infecțioase și a containerelor respective. Vor fi obligatoriu respectate reglementările naționale și internaționale în domeniu. Categoriile care se includ sunt următoarele:

1. Deșeurile necontaminate (neinfecțioase) care pot fi refolosite, reciclate sau eliminate ca deșeuri generale sau menajere
2. Obiectele ascuțite (tăietoare-înțepătoare) contaminate (ex. ace hipodermice, bisturie, cuțite și cioburi de sticlă); acestea vor fi întotdeauna colectate în containere rezistente la înțepare-tăiere, prevăzute cu capace și vor fi tratate ca infecțioase.
3. Materialul contaminat destinat decontaminării prin autoclavare urmată de spălare și refolosire sau reciclare.
4. Materialul contaminat destinat autoclavării și eliminării.
5. Materialul contaminat destinat incinerării directe.

Containerele pentru obiectele ascuțite (tăietoare-înțepătoare) trebuie să fie rezistente la înțepare-tăiere și nu trebuie umplute la capacitatea maximă. Când sunt umplute pe $\frac{3}{4}$, aceste containere trebuie plasate în containere pentru «deșeuri infecțioase» și incinerate, cu autoclavare prealabilă dacă practica laboratorului o necesită. Containerele pentru obiecte tăietoare-înțepătoare nu trebuie aruncate în mediul înconjurător.

Se interzice curățarea prealabilă a oricărui material contaminat (potențial infecțios) destinat autoclavării și refolosirii. Orice curățare sau reparație trebuie făcută doar după autoclavare sau dezinfecție.

Toate materialele contaminate (potențial infecțioase) trebuie autoclavate în containere etanșe, de exemplu saci de plastic autoclavabil, colorați conform unui cod de culori, înainte de a fi eliminate. După autoclavare, materialul poate fi plasat în containere de transfer către incinerator. Dacă este posibil, materialele rezultate din activitățile de asistență medicală nu trebuie eliminate în mediul extern, la rampele de depozitare a deșeurilor, nici după decontaminare. Dacă există un incinerator disponibil la nivelul laboratorului, autoclavarea se poate omite: deșeurile contaminate trebuie plasate în containere speciale (de exemplu, saci cu culori corespunzătoare unui cod) și

transportate direct la incinerator. Containerelor de transfer re folosibile trebuie să nu prezinte scurgeri și să aibă capace etanșe. Recipiente de colectare, preferabil incasabile, trebuie plasate la fiecare punct de lucru. Când se folosește un dezinfectant, deșeurile materiale trebuie să rămână în contact direct cu acesta (ex. neprotejate de bule de aer) un interval de timp corespunzător, în conformitate cu instrucțiunile de folosire a dezinfectantului utilizat. Containerelor de colectare și transport vor fi decontaminate și spălate înainte de re folosire.

Incinerarea deșeurilor contaminate trebuie să se facă în conformitate cu prevederile autorităților de sănătate publică și de protecție a mediului, ca și cu normele de biosiguranță din laborator.

Siguranța chimică, incendiară, electrică și a echipamentelor

O breșă/discontinuitate în sistemul de securizare al microorganismelor patogene poate fi rezultatul indirect al unor accidente chimice, incendii, accidente electrice.

Este esențială menținerea unor standarde ridicate de siguranță în aceste domenii, în orice laborator. Reguli și regulamente de funcționare pentru toate aceste domenii trebuie elaborate de autoritatea națională sau locală competentă, al cărei sprijin trebuie solicitat în caz de necesitate. Astfel activitatea responsabilului de biosiguranță trebuie să includă:

- Consultanța tehnică privind biosiguranța și biosecuritatea;
- Efectuarea auditului intern periodic în acest domeniu având ca obiect metodele, procedurile de lucru, materialele și echipamentul utilizat;
- Asigurarea unui program de instruire continuă în domeniul biosiguranței cu verificarea cunoștințelor tuturor colaboratorilor laboratorului;
- Asigurarea gestionării corecte a deșeurilor;
- Investigarea cauzelor accidentelor la toate etapele de prelucrare a materialelor potențial infecțioase și informarea directorului instituției asupra măsurilor întreprinse;
- Realizarea procedurilor de intervenție în cazurile de accidente la toate etapele de prelucrare a materialelor potențial infecțioase;
- Controlul permanent al respectării biosiguranței și biosecurității de către colaboratorii laboratorului;

În acest context, precauțiile de biosecuritate trebuie să devină parte integrantă a activității de rutină a laboratorului.

Bibliografie

1. ANDRIEȘ L., CERNEȚCHI O., BARBA D. et al. *Imunologie Clinică: compendiu*, Chișinău, Tipografia Centrală, 2014, 554 p.
2. ANDRIEȘ L., CEBOTARI L., CERNEȚCHI O. et al. *Izoimunologia în teoria și practica contemporană: compendiu*. Chișinău: CEP Medicina, 2007, 179 p.
3. *Ghid Național de biosiguranță pentru laboratoare*. Chișinău, 2011, 166 p.
4. *Ghid Național de reglementări pentru transportul substanțelor infecțioase*. Chișinău, 2011, 35 p.
5. ROBACK T.D., COMBS M.R., GROSSMAN B.J. et al. *Technical Manual*, 16 th edition, 2008, 1039 p.
6. МИНЕЕВА Н.А. *Группы крови человека. Основы иммуногематологии* – СПб., 2004-188 с.