

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

LABORATORY DIAGNOSIS

Новые технологические возможности прямого антиглобулинового теста

New Technology Capabilities of Direct Antiglobulin Test

Е.А. Попонина, Е.В. Бутина, А.В. Йовдий, О.Д. Максимов, Г.А. Зайцева, И.В. Парамонов

EA Poponina, EV Butina, AV Iovdii, OD Maksimov, GA Zaitseva, IV Paramonov

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА», ул. Красноармейская, д. 72, Киров, Российская Федерация, 610027

Kirov Research Institute of Hematology and Transfusiology, 72 Krasnoarmeiskaya str., Kirov, Russian Federation, 610027

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Актуальность. Прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ) предназначен для выявления фиксированных на поверхности эритроцитов антител и компонентов комплемента. Гелевые методики дают возможность дифференцировать класс и подкласс иммуноглобулинов при положительном ПАГТ, что позволяет изучить характер анемии и оценить риск возникновения иммунного гемолиза.

Цель. Изучить частоту положительного ПАГТ у онкогематологических больных, установить класс и подкласс иммуноглобулинов, фиксированных на эритроцитах, оценить их участие в развитии гемолитических осложнений.

Материалы и методы. Изучен дифференцированный ПАГТ у 393 онкогематологических пациентов клиники ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА» в гелевом тесте с использованием реактивов и оборудования Bio-Rad (США).

Результаты. Частота выявления положительного ПАГТ у онкогематологических больных варьировала при разных заболеваниях от 6,2 до 25,2 %, в общей группе она была 15,5 %. При острых лейкозах она составила 6,2 %, при миелодиспластическом синдроме — 6,3 %, хроническом миелолейкозе — 10 %, лимфоме Ходжкина — 11,9 %, хроническом лимфолейкозе — 15,4 %, неходжкинских лимфомах — 21 %, множественной миеломе — 25,2 %. У пациентов со множественной миеломой, острыми лейкозами, лимфомой Ходжкина, хроническим миелолейкозом положительный результат был обусловлен наличием IgG подклассов 2 и 4. У больных хроническим лимфолейкозом и неходжкинскими лимфомами на поверхности эритроцитов выявлены IgG подкласса 1, IgM и компоненты комплемента C3c, C3d. Показано, что наличие IgG2/IgG4 не сопровождалось клиническими и лабораторными признаками иммунного гемолиза, IgG1 вызывал разрушение эритроцитов в 50 % случаев, тогда как обнаружение компонентов комплемента C3c, C3d в 100 % случаев было связано с проявлениями гемолиза.

Заключение. Положительный результат ПАГТ следует интерпретировать с учетом лабораторных и клинических данных. Дифференцированное исследование помогает прогнозировать развитие гемолитических осложнений у пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

Background. Direct antiglobulin test (DAT) is used to identify erythrocyte-fixed antibodies and complement components. Gel methods are applied to differentiate immunoglobulin class and subclass in positive DAT, which allows to study the nature of anemia and assess the risk of immune hemolysis.

Aim. To assess the rate of positive DAT in oncohematological patients, to determine class and subclass of erythrocyte-fixed immunoglobulins, and to evaluate their contribution in hemolytic complications.

Materials & Methods. In 393 oncohematological patients at the Kirov Research Institute of Hematology and Transfusiology differentiated DAT was studied using gel test with Bio-Rad (USA) testing sets.

Results. The rate of positive DAT in oncohematological patients varied for different diseases from 6.2 % to 25.2 %, in the total group it was 15.5 %. It accounted for 6.2 % in acute leukemias, 6.3 % in myelodysplastic syndrome, 10 % in chronic myeloid leukemia, 11.9 % in Hodgkin's lymphoma, 15.4 % in chronic lymphocytic leukemia, 21 % in non-Hodgkin's lymphoma, and 25.2 % in multiple myeloma. In multiple myeloma, acute leukemia, Hodgkin's lymphoma, and chronic myeloid leukemia patients the positive test was associated with IgG subclasses 2 and 4. In chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma patients IgG1 subclass 1, IgM and C3c, C3d complement components were detected on erythrocyte surfaces. It was shown that IgG2/IgG4 detection was not accompanied by any clinical or laboratory signs of immune hemolysis, IgG1 was responsible for destruction of erythrocytes in 50 % of cases, whereas the detection of C3c, C3d complement components was associated with hemolytic manifestations in 100 % of cases.

Conclusion. Positive DAT should be interpreted in light of laboratory and clinical data. Differentiated test helps to predict hemolytic complications in oncohematological patients.

Ключевые слова: прямой антиглобулиновый тест, класс и подкласс иммуноглобулинов, иммунный гемолиз.

Keywords: direct antiglobulin test, immunoglobulin class and subclass, immune hemolysis.

Получено: 27 апреля 2020 г.

Принято в печать: 20 августа 2020 г.

Received: April 27, 2020

Accepted: August 20, 2020

Для переписки: Елена Александровна Попонина, канд. мед. наук, ул. Красноармейская, д. 72, Киров, Российская Федерация, 610027; тел.: +7(8332)54-51-83; e-mail: senkina.elena@rambler.ru

Для цитирования: Попонина Е.А., Бутина Е.В., Йовдий А.В. и др. Новые технологические возможности прямого антиглобулинового теста. Клиническая онкогематология. 2020;13(4):426–9.

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-4-426-429

For citation: Elena Aleksandrovna Poponina, MD, PhD, 72 Krasnoarmeiskaya str., Kirov, Russian Federation, 610027; Tel.: +7(8332)54-51-83; e-mail: senkina.elena@rambler.ru

For correspondence: Poponina EA, Butina EV, Iovdii AV, et al. New Technology Capabilities of Direct Antiglobulin Test. Clinical oncohematology. 2020;13(4):426–9. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-4-426-429

ВВЕДЕНИЕ

Одной из причин возникновения анемии при онкогематологических заболеваниях является аутоиммунное разрушение эритроцитов. Оно происходит вследствие взаимодействия эритроцитов с аутоантителами, направленными против собственных антигенов организма, либо с компонентами комплемента. Аутоантитела могут быть представлены иммуноглобулинами (Ig) классов G, A, M. У каждого класса иммуноглобулинов существует оптимальная температура реагирования, различная возможность связывать комплемент и взаимодействовать с рецепторами макрофагов в селезенке и печени, что в итоге влияет на их способность вызывать иммунный гемолиз [1–4].

По данным литературы, наиболее опасными для возможного развития гемолиза считаются антитела IgG подклассов 1 и 3. IgG подкласса 2 малоактивен. IgG4 не вызывает гемолиз и не способен активировать комплемент. Антиэритроцитарные аутоантитела IgG1 и IgG3 служат причиной развития тепловой аутоиммунной гемолитической анемии. Они действуют при температуре 37 °С, их также называют неполными тепловыми агглютининами. Эритроциты, покрытые IgG, фагоцитируются макрофагами преимущественно селезенки, несущими на своей поверхности рецепторы IgG (внутриклеточный гемолиз). Активировавшиеся на мембране эритроцитов компоненты комплемента действуют в качестве опсонин, усиливая их захват макрофагами. Часто происходит незавершенный фагоцитоз эритроцитов с «отщипыванием» части мембраны, что приводит к образованию сфероцитов, разрушающихся в селезенке [5].

Имуноглобулины класса A (IgA) считаются потенциально малоопасными для развития гемолиза, однако зарегистрированы случаи тяжелой гемолитической анемии, связанной с IgA [6]. Авторы публикации предполагали, что основной причиной разрушения эритроцитов служили IgM, которые не были выявлены при исследовании из-за интенсивного разрушения связанных ими эритроцитов еще до проведения пробы.

Антиэритроцитарные аутоантитела, относящиеся к IgM, служат причиной холодовой гемолитической анемии. IgM связываются с эритроцитами больного при

температуре ниже 37 °С (оптимально 4 °С), склеивают эритроциты в агглютинаты, на которых в последующем фиксируются компоненты комплемента. Повышение температуры до 37 °С приводит к отсоединению IgM, но C3b-компоненты комплемента остаются на поверхности эритроцитов, выполняют роль опсонин, помогают макрофагам (преимущественно в печени) осуществлять захват эритроцитов с последующим внутриклеточным гемолизом. Активация комплемента с образованием мембраноатакующего комплекса на поверхности эритроцитов и внутрисосудистым гемолизом, как правило, прерывается с помощью регулирующих молекул CD55, CD59 на мембране [7, 8].

При высокой концентрации антиэритроцитарных IgM, когда недостаточно активности естественных регуляторных ингибиторов комплемента, возможно внутрисосудистое разрушение эритроцитов. В такой ситуации каскад комплемента активируется до C5b с присоединением компонентов C6, C7, C8 и C9, формируя мембраноатакующий комплекс, что ведет к образованию перфораций в мембране и последующему разрыву эритроцитов в сосудистом русле [9].

Существует смешанный вариант гемолитической анемии, при котором в плазме пациента обнаруживаются аутоантитела как тепловые (класса IgG), так и холодовые (класса IgM) [3].

Для выявления антител и компонентов комплемента, фиксированных на поверхности эритроцитов *in vivo*, разработана прямая проба Кумбса — прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ). Современные возможности дифференцированного ПАГТ (определение классов и подклассов иммуноглобулинов, а также компонентов комплемента, фиксированных на эритроцитах: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, C3c, C3d) позволяют не только продемонстрировать наличие аутоантител и/или комплемента на мембране эритроцитов, но и оценить их полуколичественно, а также подтвердить участие конкретного класса или подкласса антител в патологическом процессе [10, 11].

Цель настоящего исследования — изучить частоту выявления положительного ПАГТ у онкогематологических больных, установить класс и подкласс иммуноглобулинов, фиксированных на эритроцитах, и оценить их вклад в развитие гемолитических осложнений при онкогематологических заболеваниях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Результаты ПАГТ проанализированы у 393 онкогематологических больных, впервые госпитализированных в клинику ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА». Из них у 114 пациентов диагностирован острый лейкоз (ОЛ), у 95 — множественная миелома (ММ), у 42 — лимфома Ходжкина (ЛХ), у 10 — хронический миелолейкоз (ХМЛ), у 26 — хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), у 81 — неходжкинские лимфомы (НХЛ), у 16 — миелодиспластический синдром (МДС), у 9 — прочие онкогематологические заболевания. Возраст обследованных составил 2–87 лет (медиана 53 года). В группу сравнения включено 200 здоровых доноров крови.

Прямая проба Кумбса проводилась в гелевом тесте с использованием реактивов и оборудования (автоматический иммуногематологический анализатор ИН-1000) компании Bio-Rad (США). Для скрининга антиэритроцитарных аутоантител применялись карты DiaMed-ID-LISS/Coombs Anti-IgG+C3d. Силу реакции оценивали от (+) до (++++), в зависимости от расположения агглютинатов в геле микропробирки в соответствии с инструкцией производителя. При получении положительного результата проводили дифференцирование классов иммуноглобулинов и компонентов комплемента с помощью карт DC-Screening I, содержащих гель с моноспецифическими антителами к человеческим иммуноглобулинам классов G, A, M, а также компонентам комплемента C3c и C3d. При выявлении IgG на поверхности эритроцитов пациента исследовали подклассы IgG (IgG1, IgG3 или IgG2/IgG4), а также их разведение 1:1 и 1:100 с применением карт DAT IgG1/IgG3.

Уровень гемоглобина, эритроцитов, ретикулоцитов, общего и непрямого билирубина исследовали по общепринятым методикам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех доноров крови ПАГТ был отрицательный, тогда как у онкогематологических больных положительный результат ПАГТ получен в 15,5 % случаев. Частота положительного ПАГТ варьировала в зависимости от диагноза.

При ОЛ положительный ПАГТ выявлен у 6,2 % ($n = 7$) из 114 обследованных пациентов. Интенсивность реакции оценена как (+). Положительная проба была обусловлена только IgG2/IgG4, что, согласно литературным данным, связано с низким риском гемолитических осложнений. Действительно, несмотря на то что у всех больных ОЛ с положительным ПАГТ выявлена анемия, клинических и лабораторных признаков гемолиза не зарегистрировано. Следует отметить преходящий характер положительного ПАГТ при ОЛ. Так, повторные исследования ПАГТ через 1–8 мес. (медиана 5 мес.) показали отрицательный результат.

При обследовании больных ММ положительный ПАГТ получен в 25,2 % случаев ($n = 24$). Выраженность положительной пробы была (+) у 45,8 % пациентов, (++) — у 54,2 %. Фиксированные на эритроцитах антитела представлены IgG подклассов 2 и 4. У 87,5 % пациентов с ММ положительный ПАГТ сопровождался анемией, однако ни у одного из них признаков гемолиза не установлено. Следует отметить, что при ММ преобладали пациенты с положительным ПАГТ с продукцией моноклонального IgG. Возможно, его неспецифическое связывание с эритроцитами могло быть причиной агглютинации, выявляемой в ПАГТ.

Положительный ПАГТ наблюдался у 5 (11,9 %) из 42 пациентов с ЛХ. Из них у 20 % сила реакции составила (+), у 80 % — (++) . У всех больных установлены IgG2/IgG4 без признаков гемолитических осложнений.

При ХМЛ положительный результат выявлен у 1 (10 %) из 10 обследованных пациентов, интенсивность реакции равна (+), которая обусловлена наличием IgG2/IgG4, без клинических и лабораторных признаков гемолиза.

При МДС положительный ПАГТ обнаружен в 6,3 % случаев (1 из 16 обследованных пациентов), интенсивность пробы оценена как (+). Идентифицирован IgG2/IgG4; признаков иммунного разрушения эритроцитов не отмечено.

В группе больных НХЛ получен положительный результат ПАГТ в 21 % случаев (17 из 81 пациентов). В группе НХЛ выявлены больные с высокой интенсивностью реакции: у 17,6 и 5,9 % больных она достигала (+++) и (++++), соответственно. У 47,1 % пациентов она составила (+), у 29,4 % — (++) . Больные НХЛ также имели отличия в дифференцированном ПАГТ. У 5 (29,4 %) пациентов на поверхности эритроцитов выявлены компоненты комплемента C3d и/или C3c. Причем в 3 случаях присутствовали только компоненты комплемента C3c и C3d, а у остальных пациентов фиксация C3c, C3d сопровождалась сорбцией IgM на поверхности эритроцитов. Обнаружение компонентов комплемента было связано с клиническими и лабораторными признаками гемолиза у всех больных. У 1 (5,9 %) пациента с НХЛ и положительным ПАГТ с силой реакции (++++), из-за особенностей проведения лабораторного теста вследствие выраженной агглютинации не удалось определить класс аутоантител, сорбирующихся на мембране эритроцитов. У этого пациента также наблюдался лизис эритроцитов. У 11 (64,7 %) больных НХЛ положительный ПАГТ наблюдался за счет IgG2/IgG4; признаков разрушения эритроцитов у них не выявлено.

Положительная проба Кумбса зарегистрирована у 4 (15,4 %) из 26 пациентов с ХЛЛ, выраженность реакции (+), (++) , (+++) и (++++), у них соответствовала 1 (25 %) случаю каждая. Установлено, что у 2 больных положительный ПАГТ обусловлен наличием IgG1, у 1 — C3d-компонента и еще у 1 — IgG2/IgG4. Выявление C3d ассоциировалось с признаками гемолиза, тогда как обнаружение IgG1 только в 1 из 2 случаев сопровождалось гемолитической анемией. Таким образом, признаки гемолиза эритроцитов выявлены у 2 (7,7 %) из 26 больных ХЛЛ. Полученные результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими о гемолитической анемии, осложняющей течение ХЛЛ в 4–10 % случаев [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для дифференциальной диагностики анемии, в частности подтверждения аутоиммунной гемолитической

ской анемии, важен результат ПАГТ [13]. Положительный ПАГТ подтверждает иммунную природу гемолиза. Однако не всегда положительный тест будет сопровождаться клинико-лабораторными проявлениями разрушения эритроцитов. Современные возможности диагностики позволяют выявить относительно небольшие количества иммуноглобулинов и комплемента, фиксировавшиеся на эритроцитах. Согласно литературным данным, положительная прямая проба Кумбса может быть как признаком естественного старения и дегенерации эритроцитов, так и начальным проявлением развивающихся аутоиммунных и опухолевых заболеваний [12, 14–17].

В нашем исследовании у больных ММ, ОЛ, ЛХ, ХМЛ положительный результат ПАГТ был обусловлен IgG2/IgG4 и не сопровождался клинико-лабораторными признаками гемолитической анемии. У больных ХЛЛ и НХЛ на поверхности эритроцитов выявлены IgG1, IgM и компоненты комплемента C3c, C3d, что было связано с проявлениями гемолиза.

Результат ПАГТ должен рассматриваться в комплексе с другими клиническими и лабораторными показателями. Дифференцированная прямая проба Кумбса является важным инструментом, позволяющим прогнозировать риск возникновения гемолитических осложнений у пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00162А.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: все авторы.

Сбор и обработка данных: Е.А. Попонина, Е.В. Бутина, А.В. Йовдий.

Анализ и интерпретация данных: Е.А. Попонина, Е.В. Бутина, О.Д. Максимов.

Подготовка рукописи: Е.А. Попонина, Е.В. Бутина, Г.А. Зайцева, О.Д. Максимов.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

Административная поддержка: И.В. Парамонов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sokol R, Hewitt S, Stamps B. Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion center. *Br Med J*. 1981;282(6281):2023–7. doi: 10.1136/bmj.282.6281.2023.
2. Минеева Н.В., Кробинец И.И., Бодрова Н.Н., Богданова И.О. Применение прямого антиглобулинового теста для выявления аутоантител при анемиях различного генеза. *Онкогематология*. 2017;12(3):57–62. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-3-57-62.
[Mineeva NV, Krobinec II, Bodrova NN, Bogdanova IO. The use of direct antiglobulin test to detect antibodies in patients with anemia of various origins. *Oncohematology*. 2017;12(3):57–62. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-3-57-62. (In Russ)]
3. Michel M. Classification and therapeutic approaches in autoimmune hemolytic anemia: an update. *Expert Rev Hematol*. 2011;4(6):607–18. doi: 10.1586/ehm.11.60.
4. Judd W, Butch S, Oberman H, et al. The evaluation of a positive direct antiglobulin test in pretransfusion testing. *Transfusion*. 1980;20(1):17–23. doi: 10.1046/j.1537-2995.1980.20180125036.x.
5. Packman C. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev*. 2008;22(1):17–31. doi: 10.1016/j.blre.2007.08.001.
6. Go R, Winters J, Kay N. How I treat autoimmune hemolytic anemia. *Blood*. 2017;129(22):2971–9. doi: 10.1182/blood-2016-11-693689.
7. Berentsen S. Role of Complement in Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfus Med Hemother*. 2015;42(5):303–10. doi: 10.1159/000438964.
8. Crisp D, Pruzanski W. B-Cell neoplasms with homogeneous cold-reacting antibodies (cold agglutinins). *Am J Med*. 1982;72(6):915–22. doi: 10.1016/0002-9343(82)90852-x.
9. Jager U, D'Sa S, Schorghofer C, et al. Inhibition of complement C1s improves severe hemolytic anemia in cold agglutinin disease: a first-in-human trial. *Blood*. 2019;133(9):893–901. doi: 10.1182/blood-2018-06-856930.
10. Parker V, Tormey C. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(2):305–10. doi: 10.5858/arpa.2015-0444-rs.
11. Тураев Р.Г., Бельская Е.Е. Проба Кумбса в лабораторной диагностике иммунопатологических состояний. *Трансфузиология*. 2017;1(18):59–64.
[Turaev RG, Belskaya EE. Direct Coombs test in laboratory diagnosis of immunopathological states. *Transfuziologiya*. 2017;1(18):59–64. (In Russ)]
12. Ricci F, Tedeschi A, Vismara E, et al. Should a Positive Direct Antiglobulin Test Be Considered a Prognostic Predictor in Chronic Lymphocytic Leukemia? *Clin Lymphoma Myel Leuk*. 2013;13(4):441–6. doi: 10.1016/j.clml.2013.02.024.
13. Zantek N, Koepsell S, Tharp D, Cohn C. The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol*. 2012;87(7):707–9. doi: 10.1002/ajh.23218.
14. Rottenberg Y, Yahalom V, Shinar E, et al. Blood Donors with a Positive Direct Antiglobulin Test Are at Increased Risk for Hematologic Malignancies and Cancer in General. *Blood*. 2007;110(11):2903. doi: 10.1182/blood.v110.11.2903.2903.
15. Rottenberg Y, Yahalom V, Shinar E, et al. Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer. *Transfusion*. 2009;49(5):838–42. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02054.x.
16. Hannon J. Management of Blood Donors and Blood Donations From Individuals Found to Have a Positive Direct Antiglobulin Test. *Transfus Med Rev*. 2012;26(2):142–52. doi: 10.1016/j.tmr.2011.08.004.
17. Garratty G. The James Blundell Award Lecture 2007: Do we really understand immune red cell destruction? *Transfus Med*. 2008;18(6):321–34. doi: 10.1111/j.1365-3148.2008.00891.x.