

Rozdział

Immunologiczne zasady przetaczania koncentratów krwinek płytkowych (KKP)

1. OGÓLNE ZASADY PRZETACZANIA KONCENTRATÓW KRWINEK PŁYTKOWYCH

1. Przetaczanie KKP ma na celu zmniejszenie krwawienia lub zapobieganie krwawieniom u chorych z małopłytkowością . Postępowanie takie dotyczy głównie chorych z małopłytkowością wynikającą z niedostatecznej produkcji płytek krwi w szpiku.
2. Przetaczanie płytek krwi zaleca się zwykle u chorych z liczbą płytek $< 10 \times 10^9 / l$ (niektórzy zalecają dopiero przy liczbie płytek $< 5 \times 10^9 / l$). Decyzja o przetaczaniu KKP powinna być podjęta po uwzględnieniu stanu klinicznego chorego.
3. U wielokrotnych biorców płytek krwi może wystąpić oporność na przetaczane płytki (liczba płytek nie wzrasta zgodnie z oczekiwaniem i /lub skaza krwotoczna nie ulega wyraźnemu zmniejszeniu).
4. Przyczyny oporności mogą być natury nieimmunologicznej i immunologicznej.
 - a) nieimmunologiczne przyczyny: głównie gorączka, infekcja, hypersplenizm, rozsiane krzepnięcie śródnaczyniowe (DIC), aktualne leczenie amfoterycyną B, czynniki wpływające na zahamowanie produkcji płytek np: koagulopatia lub niewydolność nerek,
 - b) immunologiczne przyczyny: alloimmunizacja antygenami leukocytów (Human Leukocyte Antigens - HLA), znacznie rzadziej swoistymi antygenami krwinek płytkowych (Human Platelet Antigens - HPA).

2. OCENA EFEKTYWNOŚCI PRZETACZANYCH KRWINEK PŁYTKOWYCH

Nie ma dobrych kryteriów oceny efektywności przetaczanych płytek krwi. W praktyce opiera się ona na:

1. Ocenie klinicznej, tj. ustąpieniu krwawień i zaprzestaniu pojawiania się wybroczyn lub wylewów podskórnych.
2. Ocenie wzrostu liczby płytek krwi u chorego (najczęściej przyjmuje się za zadawalający wzrost o $10 \times 10^9 / l$ po 1 godz. albo o $5 \times 10^9 / l$ po 20-24 godz.)
3. Obliczeniu skorygowanego wskaźnika wzrostu płytek po przetoczeniu KKP (corrected count increment -CCI) na podstawie wzoru:

$$CCI = \frac{\text{liczba płytek po przetoczeniu}(10^{11}) - \text{liczba płytek przed przetoczeniem}(10^{11})}{\text{liczba płytek krwi w KKP } (10^{11})} \times \text{powierzchnia ciała (m}^2)$$

CCI oznacza potransfuzyjny wzrost liczby płytek przypadający na 1 m^2 powierzchni ciała po przetoczeniu 1×10^{11} płytek krwi. Jako efektywny uznawany jest CCI wyższy od 10 000 po 1 godzinie od przetoczenia, natomiast jako nieefektywny CCI < 7500 po 1 godzinie i CCI < 5000 po 24 godzinach.

Opierając się na ocenie wzrostu liczby płytek krwi po przetoczeniu KKP, jako oporność uznajemy brak odpowiedniego wzrostu płytek (pkt 2 i 3) po kolejnych 2 lub 3 przetoczeniach.

3. IMMUNOLOGICZNE ZASADY PRZETACZANIA PŁYTEK KRWI U

CHORYCH BEZ OPORNOŚCI NA PRZETACZANE KKP

1. KKP powinny być przetaczane choremu od dawcy zgodnego w antygenach układu ABO; można od tej zasady odstąpić, gdy u chorych z bezwzględny wskazaniami do przetoczenia KKP dawca zgodny jest nieosiągalny. Przetoczenie płytek krwi niezgodnych w antygenach ABO może nie być efektywne, a czasami nawet prowadzić do ostrego epizodu hemolitycznego, jeżeli w osoczu dawcy grupy 0, A lub B, jest wysokie miano alloprzeciwciał anty-A lub anty-B.
2. Niezgodność w antygenie RhD nie ma wpływu na skuteczność przetaczanych płytek. Należy jednak pamiętać, że niewielka ilość krwinek czerwonych RhD dodatnich w KKP może stwarzać ryzyko wytworzenia przeciwciał anty-D. Jeżeli przetacza się płytki od dawcy Rh dodatniego, zwłaszcza kobiecie Rh ujemnej w okresie rozrodczym, wtedy należy podać 50 µg lub 100 µg immunoglobuliny anty-RhD, w zależności od ilości krwinek czerwonych w preparacie KKP (zwykle 20 µg immunoglobuliny anty-RhD na 1ml przetoczonych krwinek Rh dodatnich). Aby zapobiec immunizacji antygenem RhD, po podaniu niezgodnych płytek krwi otrzymanych drogą aferezy, gdzie zanieczyszczenia krwinkami czerwonymi są niewielkie, wystarczy podanie 50 µg immunoglobuliny anty-D.
3. Zgodności między dawcą i biorcą w zakresie antygenów HLA i HPA w tej grupie chorych w zasadzie się nie przestrzega.
4. U chorych, u których planuje się przeszczep szpiku trzeba unikać przetaczać KKP a w szczególności KKP przygotowanych od członków najbliższej rodziny.

4. IMMUNOLOGICZNE ZASADY PRZETACZANIA PŁYTEK KRWI U CHORYCH OPORNYCH NA PRZETACZANE KKP

4.1. Przyczyny oporności

1. Najczęstszą immunologiczną przyczyną oporności są przeciwciała HLA skierowane do antygenów HLA klasy I, które są obecne również na krwinkach płytkowych, ale ich ekspresja na nich jest na ogół słabsza niż na limfocytach. Do wytwarzania przeciwciał HLA przyczyniają się leukocyty zawarte w preparatach krwinek czerwonych lub płytkowych. Nowoczesne metody zubożania preparatów w leukocyty (patrz: wytwarzanie preparatów krwiopochodnych - rozdz.6) znacznie zmniejszają ryzyko immunizacji antygenami HLA (z ok.30-70% do <10% chorych), ale jej nie eliminują. Wytworzone przeciwciała HLA mogą być okresowo niewykrywalne. Tabela 1 przedstawia listę antygenów HLA klasy I, z uwzględnieniem podziału niektórych antygenów na podgrupy (ang. split), natomiast ryciny 1 i 2 antygeny krzyżowo reagujące (ang. cross reactive antigens). Przeciwciała oraz antygeny HLA wykrywa się przy pomocy testu limfocytotoksyczności (LCT) (patrz str. ...).
2. Przyczyną oporności chorych na przetaczania KKP może być również immunizacja antygenami HPA, które znajdują się na glikoproteinach (GP) IIb/IIIa, Ib i Ia/IIa (tabela 2). Częstość wytwarzania tych przeciwciał nie jest w pełni poznana. Ocenia się, że występuje u mniej niż 10% chorych. Przeciwciała płytkowe można wykrywać w teście immunofluorescencyjnym (Platelet ImmunoFluorescence Test -PIFT), jak również w testach immunoenzymatycznych (patrz str.11). Swoiste przeciwciała płytkowe najczęściej są skierowane do antygenów; HPA1a, HPA1b, HPA5b, HPA3a. Czasami nie udaje się określić swoistości przeciwciał płytkowych. Mogą to być autooprzeciwciała. Rozróżnienie autoimmunizacji od alloimmunizacji jest trudne, jakkolwiek określenie fenotypu lub genotypu płytek chorego może ułatwić wykluczenie alloimmunizacji. Rola przeciwciał HPA w oporności na przetaczane KKP nie jest jeszcze dobrze udokumentowana. Udział tych przeciwciał jest bezsporny tylko w zespole poprzetoczeniowej szczy małopłytkowej

oraz alloimmunologicznej małopłytkowości noworodków (patrz str.6)

Tabela 1.: Antygeny HLA klasy I (locus A,B,C) rozpoznawane serologicznie, wg. raportu WHO z 1996r.

locus A	locus B		locus C
A1	B5	B51(5)	Cw1
A2	B7	B52(5)	Cw2
A3	B8	B53	Cw3
A9	B12	B54(22)	Cw4
A10	B13	B55(22)	Cw5
A11	B14	B56(22)	Cw6
A19	B15	B57(17)	Cw7
A23(9)	B16	B58(17)	Cw8
A24(9)	B17	B59	Cw9(w3)
A25(10)	B18	B60(40)	Cw10(w3)
A26(10)	B21	B61(40)	
A28	B22	B62(15)	
A29(19)	B27	B63(15)	
A30(19)	B35	B64(14)	
A31(19)	B37	B65(14)	
A32(19)	B38(16)	B67	
A33(19)	B39(16)	B70	
A34(10)	B40	B71(70)	
A36	B41	B72(70)	
A43	B42	B73	
A66(10)	B44(12)	B75(15)	
A68(28)	B45(12)	B76(15)	
A69(28)	B46	B77(15)	
A74(19)	B47	B78	
A80	B48	B81	
	B49(21)	Bw4	
	B50(21)	Bw6	

Rycina 1.: Antygeny HLA z locus A krzyżowo-reagujące, wg. Pel Freez Clinical System, 1996

w modyfikacji własnej

Rycina 2.: Antygeny HLA z locus B krzyżowo-reagujące, wg. Pel Freez Clinical System, 1996

w modyfikacji własnej

Tabela2.: Swoiste antygeny krwinek płytkowych

Układ	Antygen	Poprzednia nazwa	Lokalizacja na glikoproteinie
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Zw ^a , Pl ^{A1} Zw ^b , Pl ^{A2}	GPIIIa
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko ^b Ko ^a , Sib ^a	GPIb _α
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Bak ^a , Lek ^a Bak ^b	GPIIb
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Yuk ^b , Pen ^a Yuk ^a , Pen ^b	GPIIIa
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	Br ^b , Zav ^b Br ^a , Zav ^a , He ^a	GPIa
HPA-6W	HPA-6bW	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa
HPA-7W	HPA-7bW	Mo ^a	GPIIIa
HPA-8W	HPA-8bW	St ^a	GPIIIa
HPA-9W	HPA-9bW	Max ^a	GPIIb
HPA-10W	HPA-10bW	La ^a	GPIIIa
HPA-11W	HPA-11bW	Gro ^a	GPIIIa
HPA-12W	HPA-12bW	Iy ^a	GPIb _β
HPA-13W	HPA-13bW	Sit ^a	GPIa
HPA-	HPA-	Oe ^a	GPIIIa
HPA-	HPA-	Va ^a	GPIIIa
HPA-	HPA-	Pe ^a	GPIb _α

3. Nie wykrycie wymienionych w p. 1 i 2 przeciwciał, może świadczyć, że zastosowanymi metodami ich nie wykryto albo, że istnieją nieimmunologiczne przyczyny oporności (patrz str.1).

4.2. Sposoby doboru dawców

Dotychczas istnieją różne sposoby postępowania u chorych opornych na przetaczane KKP.

4.2.1. Przetaczanie KKP z zachowaniem zgodności lub częściowej zgodności w antygenach HLA klasy I (locus A i B) między dawcą a biorcą

Dotyczyć to może zarówno chorych uodpornionych jak i chorych z niewykrywalnymi przeciwciałami HLA. W tym celu należy:

1. określić antygeny HLA klasy I u chorego (oznaczenie to wykonać wcześniej niż bezpośrednio przed przetoczeniem, ponieważ np. w związku z leczeniem jednorazowe badanie nie zawsze jest wystarczające),
2. poszukać odpowiedniego dawcy płytek, w rejestrze dawców z oznaczonymi antygenami HLA. Znalezienie dawcy zgodnego z biorcą w 4 antygenach HLA klasy I (2 antygeny z locus A i 2 antygeny z locus B) jest niezwykle trudne, dlatego można przetaczać KKP przy częściowej zgodności antygenów HLA pomiędzy dawcą a biorcą. Tabela 3 przedstawia różne stopnie zgodności z uwzględnieniem antygenów krzyżowo-reagujących, splitów oraz antygenów nieoznaczonych. Wśród osób z antygenami nieoznaczonymi mogą znajdować się homozygoty w zakresie danego antygeny. Z powodu dużego polimorfizmu antygenów układu HLA rejestr dawców z oznaczonymi antygenami HLA powinien zawierać co najmniej 2000 dawców.

Tabela 3. Różne stopnie zgodności w zakresie antygenów HLA klasy I locus A i B między biorcą a dawcą

Stopień zgodności	Liczba antygenów zgodnych	Liczba antygenów krzyżowo - reagujących lub tzw. splitów lub nieoznaczonych ^{*)}
Zgodny	4	0
częściowo zgodny	3	1
częściowo zgodny	2	2
częściowo zgodny	1	3
częściowo zgodny	0	4

^{*)} Dopuszcza się również niezgodność 1 lub 2 antygenów

4.2.2. Wyselekcjonowanie dawców płytek krwi dla biorcy, na podstawie ujemnych prób zgodności.

Postępowanie takie dotyczy chorych uodpornionych (przeciwciała wykryte w teście LCT i /lub w testach z użyciem płytek krwi np. fluorescencyjnym czy enzymatycznym). Najbardziej rozpowszechniona jest próba zgodności w teście LCT, ale niektóre ośrodki przeprowadzają ją w teście z płytkami krwi, w którym wykryto przeciwciała.

4.2.3. Chorem, u których udało się określić swoistość przeciwciał HLA można przetaczać płytki krwi od dawcy, który nie posiada na limfocytach antygeny, w stosunku do którego są skierowane przeciwciała. Swoistość wykrytych przeciwciał trzeba jednak kontrolować po każdym przetoczeniu, stąd ten rodzaj doboru jest rzadko stosowany.

4.2.4. Chorem, u których wykryto swoiste przeciwciała płytkowe wraz z potwierdzeniem u nich braku danego antygeny, powinno się przetaczać płytki krwi od dawcy, który nie

posiada tego antygenu (rejestr dawców z oznaczonymi HPA). W praktyce przypadki takie spotyka się rzadko.

***UWAGA:** W różnych ośrodkach na świecie stosowane są różne sposoby doboru płytek krwi. Wybór postępowania jest uzależniony od przyczyny oporności, stosowanych metod badania przeciwciał w danym ośrodku oraz liczby dostępnych dawców z oznaczonymi antygenami HLA w rejestrze. Nie jest ostatecznie udokumentowane, który sposób postępowania jest najlepszy, czasami są one stosowane równolegle.*

Rycina 3 przedstawia schemat postępowania u chorych wymagających przetaczań KKP w oparciu o własne doświadczenia i informacje z piśmiennictwa.

Rycina 3.: Schemat postępowania u chorych wymagających przetoczeń KKP

Schemat postępowania doboru płytek krwi proponowany dla Regionalnych Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Polsce zależy także możliwości danego ośrodka.

5. PRZETACZANIE KKP U CHORYCH Z MAŁOPŁYTKOWOŚCIAMI IMMUNOLOGICZNYMI

5.1. Noworodkowa alloimmunologiczna trombocytopenia

Noworodkowa alloimmunologiczna trombocytopenia (Neonatal AlloImmune Thrombocytopenia-NAIT) jest spowodowana uodpornieniem się matki na swoiste antygeny płytek płodu, odziedziczone od ojca, a nieobecne na płytkach krwi matki. W około 85% przypadków, NAIT spowodowana jest immunizacją matki w stosunku do antygenu HPA-1a płodu. W pozostałych przypadkach immunizacja najczęściej występuje w stosunku do HPA 5b,1b,3a. Noworodkowi, u którego wystąpiła NAIT powinno się przetaczać płytki krwi bez antygenu HPA, w stosunku do którego wystąpiła alloimmunizacja. W takich przypadkach, jeżeli brak jest odpowiedniego dawcy płytek, dawczynią może być matka, po usunięciu z preparatu osocza zawierającego przeciwciała płytkowe (patrz rozdział: Preparaty krwiopochodne do transfuzji dopłodowych).

5.2. Poprzetoczeniowa skaza małopłytkowa

Poprzetoczeniowa skaza małopłytkowa (Post Transfusion Purpura-PTP) jest to opóźnione powikłanie występujące w około 5-11 dni po transfuzji krwi lub jej preparatów zawierających płytki krwi. Przyczyną PTP jest najczęściej obecność alloprzeciwciał HPA-1a, znacznie rzadziej HPA-1b, -3a, 3b. Przeciwciała te powstają w wyniku wtórnej odpowiedzi immunologicznej, u osób pierwotnie uodpornionych antygenami płytek krwi (najczęściej w wyniku ciąży, rzadziej po przetoczeniu krwi lub jej preparatów). Wytworzone alloprzeciwciała niszczą nie tylko przetoczone płytki, ale także własne płytki chorego, a mechanizm niszczenia autologicznych płytek nie jest w pełni poznany. Nie zaleca się u chorych z PTP przetaczania KKP. W przypadkach konieczności przetaczania choremu z PTP koncentratu krwinek czerwonych powinny być one pozbawione płytek i osocza, w którym są obecne rozpuszczalne antygeny płytkowe. Ogólnie uznaną metodą leczenia PTP jest podanie dożylnie immunoglobuliny G (i.v.IgG) w dawce 0,4 g/kg m.c/dz przez 5 dni.

5.3. Małopłytkowość autoimmunologiczna

Małopłytkowość autoimmunologiczna spowodowana jest obecnością autoprzeciwciał płytkowych skierowanych do podstawowych glikoprotein błony krwinki płytkowej np. GPIIb/IIIa czy GPIb. Swoistości tych przeciwciał na ogół nie udaje się określić. U chorych tych nie zaleca się przetaczania KKP, ponieważ autoprzeciwciała niszczą również płytki krwi dawcy. Podobne obserwacje dotyczą chorych z niedokrwistością autoimmunohemolityczną po przetoczeniu KKCz. KKP powinny być przetaczane tylko tym chorym, u których skaza krwotoczna stanowi zagrożenie życia.

6. METODY WYKRYWANIA PRZECIWCIAŁ MAJĄCYCH ZNACZENIE PRZY PRZETACZANIU KKP

W związku z rolą jaką przeciwciała HLA i HPA odgrywają u chorych, którym przetacza się KKP, poniżej podano metody ich wykrywania.

6.1. Metoda wykrywania przeciwciał limfocytotoksycznych - test limfocytotoksyczności (LCT)

Powszechnie stosowanym testem do wykrywania przeciwciał HLA jest test LCT. Zasada działania testu polega na tym, że przeciwciała limfocytotoksyczne przy udziale dopełniacza uszkadzają błonę komórkową limfocytów, co prowadzi do obumarcia komórek; błona martwych komórek przepuszcza barwnik eozynę, komórki stają się większe, płaskie i nie odbijają światła -reakcja dodatnia; żywe komórki nie wchłaniają barwnika, są małe i odbijają światło - reakcja ujemna.

6.1.1. Specjalny sprzęt

1. Mikroskop odwrócony.
2. Mikrostrzykawki Hamiltona o pojemności 50 µl i 250 µl z dozownikami.
3. Mikropłytki plastikowe (typ Terasaki).

6.1.2. Odczynniki

1. Płyn do izolacji limfocytów o gęstości 1.077g/ml. Odważkę 9.556g fikolu rozpuścić w 134 ml wody destylowanej ogrzanej do 90° C. Po oziębieniu do temperatury pokojowej dodać 20 ml 75% Uropoliny (Polfa). Gęstość roztworu powinna wynosić 1.077 g/ml. Rozpuszczony fikol można rozporcjować i przechowywać w temp.-25° C. Po rozmrożeniu, przed użyciem doprowadzić do pH 6.8 za pomocą 1N NaOH. Można używać gotowe płyny do izolacji limfocytów o gęstości j/w.
2. Dopełniacz króliczy zamrożony lub liofilizowany. Dopełniacz musi być zużyty w tym samym dniu (bezpośrednio po rozmrożeniu lub rozpuszczeniu, jeżeli był liofilizowany), a pozostała reszta nie może być zamrożona i ponownie użyta.
3. Każda partia dopełniacza powinna być uprzednio skontrolowana w teście LCT, przy użyciu co najmniej 2 różnych surowic z określonymi przeciwciałami anty-HLA oraz

dwóch zawiesin limfocytów z antygenami HLA, do których są skierowane przeciwciała (kontrola dodatnia) oraz z antygenami HLA, z którymi te przeciwciała nie reagują (kontrola ujemna). Kontrolą ujemną jest surowica bez przeciwciał.

4. Eozyna żółtawa -5% roztwór wodny.
5. Formalina 38% o pH 7.2 (pH doprowadzamy przy pomocy 1N NaOH).
6. Olej parafinowy.
7. Buforowany roztwór NaCl (PBS) o pH 7.2.
8. Antykoagulant - 5% roztwór Na₂ EDTA lub K₃ EDTA.

6.1.3. Izolacja limfocytów do testu

1. Limfocyty najlepiej jest izolować ze świeżej krwi. Wymagane jest aby około 95% stanowiły żywe limfocyty bez zanieczyszczenia innymi komórkami, zwłaszcza granulocytami. Jeżeli zachodzi konieczność przesyłania krwi, wówczas trzeba przestrzegać, żeby krew była pobrana sterylnie, najlepiej do probówek systemu „vacutainer” i przesyłana w temperaturze pokojowej.
2. Krew może być pobrana na heparynę (20 jednostek heparyny sodowej na 1ml krwi), Na₂ EDTA lub K₃ EDTA (1 ml 5%EDTA i 9 ml krwi).
3. Krew należy odwirować 10 min przy 1500 obr/min (170 x g) i usunąć bogatopłytkowe osocze, (płytki krwi z osocza można wykorzystać do wykrywania przeciwciał płytkowych, patrz str....). Pozostałą krew dopełnić PBS do pierwotnej objętości i rozcieńczyć 1:1 w PBS.
4. Rozcieńczoną krew nawarstwić delikatnie na płyn do izolacji limfocytów w proporcji; część płynu i 2 części rozcieńczonej krwi. Wirować 10 min przy 1500 obr./min (170 x g), a następnie 10 min. przy 3000 obr./min (700 x g).
5. Limfocyty zebrać z interfazy tj. pierścienia ułożonego między płynem do izolacji a osoczem. Komórki płukać trzykrotnie PBS, dwa razy wirując 5 min przy 1500 obr/min (170 x g) i jeden raz 5 min przy 2000 obr./min (300 x g).
6. Osad limfocytów zawiesić w PBS i doprowadzić do gęstości 2×10^6 /ml.

6.1.4. Wykonanie testu

1. Płytki plastikowe należy odpowiednio opisać. Wszystkie wgłębienia płytki wypełnić dokładnie olejem parafinowym. Podczas nalewania parafiny należy zwracać uwagę, aby nie dostawały się pęcherzyki powietrza.
2. Do każdego zagłębienia płytki (pod parafiną) wkrapla się, za pomocą mikrostrzykawki Hamiltona, 1 µl badanej surowicy, surowicy z przeciwciałami HLA (kontrola dodatnia) oraz surowicy grupy AB bez przeciwciał (kontrola ujemna). Przy każdej zmianie surowicy, mikrostrzykawkę należy dokładnie przepłukać ok.5 razy PBS, aby uniknąć przeniesienia surowicy z jednego wgłębienia płytki do drugiego. Najczęściej dalsze etapy testu wykonuje się bezpośrednio po wdropleniu surowic, ale płytki z surowicami można przechowywać w lodówce do 3 dni, a dłużej w zamrażarce przez kilka miesięcy w temp.-70° C.
3. Do surowic dodać po 1 µl zawiesiny limfocytów izolowanych jak pkt. 6.1.3. i inkubować przez 30 min w temperaturze 20-24° C (najlepiej w termostacie).
4. Dodać 5 µl dopełniacza i inkubować 60 minut w temperaturze 20-24° C.
5. Dodać 1 µl 5% eozyny, a po kilku minutach 5 ul roztworu formaliny.
6. Wynik badania odczytuje się w mikroskopie odwróconym (powiększenie obiektywu 10x, okularu 16x lub 12.5x), najwcześniej po 30 minutach. Najbardziej miarodajne wyniki otrzymuje się następnego dnia. Reakcję ocenia się szacunkowo w skali 8-punktowej, biorąc pod uwagę odsetek martwych limfocytów, w porównaniu z kontrola dodatnią i ujemną (tabela 4).

Tabela 4. Interpretacja wyników badań w teście LCT

Punkty	% martwych komórek	Interpretacja testu
1	do 10	ujemny
2	11 - 20	wątpliwie ujemny
4	21 - 50	słabo dodatni
6	51 - 80	dodatni
8	81 -100	silnie dodatni
0		nie do oceny

6.1.5. Zastosowanie testu LCT do badań

1. Wykrywanie przeciwciał limfocytotoksycznych w surowicach wielokrotnych biorców krwi. Badania wykonuje się z taką liczbą zawiesin limfocytów, aby były reprezentowane najczęściej występujące antygeny HLA (zwykle wystarczy 10 zawiesin limfocytów).
2. Test LCT w zastosowaniu do próby zgodności wykonuje się z surowicą chorego i zawiesiną limfocytów dawcy KKP. Oznaczanie antygenów HLA klasy I (locus A,B,C) limfocytów dokonuje się za pomocą zestawu surowic wzorcowych (po kilka surowic danej swoistości). Zestawy takie produkowane są przez wiele firm i zawierają od 60 do 180 surowic o różnych swoistościach. Każda firma dołącza do zestawów testowych protokoły z opisami surowic diagnostycznych oraz ampułki z dopełniaczem. Każdy antygen HLA-A, -B, -C powinien być określony przez dwie monoswoiste surowice, albo przez trzy surowice, które oprócz przeciwciał skierowanych do danego antygeny, zawierają także inne swoiste przeciwciała anty-HLA.

6.2. Metody wykrywania przeciwciał płytkowych

Do wykrywania przeciwciał płytkowych najczęściej stosuje się metody oparte na zasadzie testu antyglobulinowego. Surowicę, w której poszukuje się przeciwciał inkubuje się z allogenicznymi płytkami krwi, a następnie z surowicą antyglobulinową, która jest sprzężona z fluorochromem lub enzymem. Jeżeli surowica antyglobulinowa jest: a/ znakowana fluoresceiną (test immunofluorescencyjny) wtedy wyniki badań ocenia się w mikroskopie fluorescencyjnym lub cytometrze przepływowym, b/ sprzężona z enzymami: fosfatazą zasadową lub peroksydazą (test immunoenzymatyczny) to wyniki badań ocenia się w spektrofotometrze.

Istnieje możliwość kupienia gotowych zestawów testów enzymatycznych produkowanych przez różne firmy, wraz z niezbędnymi odczynnikami i dokładnym przepisem badania. Obecnie na rynku są dostępne następujące testy enzymatyczne na mikro płytkach, które są opłaszczone:

- a) krwinkami płytkowymi (test taki wykrywa nie tylko swoiste przeciwciała płytkowe, ale także przeciwciała HLA),
- b) glikoproteinami wyizolowanymi z błon krwinek płytkowych np: GPIIb/IIIa, GPIb czy GPIa/IIa, które są nośnikami odpowiednich swoistych antygenów HPA (test taki wykrywa swoiste przeciwciała płytkowe).

W przeciwieństwie do w/w testów enzymatycznych, **test immunofluorescencyjny z płytkami krwi - PIFT** nie jest produkowany komercyjnie i dlatego poniżej podany jest przepis na jego wykonanie.

6.2.1. Specjalny sprzęt

1. Mikroskop fluorescencyjny lub cytofluorometr przepływowy (CF)
2. Mikro płytki plastikowe z okrągłymi wgłębieniami (Falcon)
3. Wirówka do wirowania płytek plastikowych. (PIFT można wykonywać w probówkach, wtedy nie jest potrzebna taka wirówka).

6.2.2. Odczynniki

1. Stężony bufor EDTA: 31.25g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 16.50g Na₂EDTA, 45.0g NaCl, ml H₂O - rozpuścić na gorąco.
2. Rozcieńczony bufor EDTA (przygotowuje się w dniu badania ze stężonego buforu EDTA: 10 ml stężonego buforu EDTA, 90 ml H₂O, 1 ml 20% albuminy wołowej, doprowadzić 3M NaOH do pH 7.2.
3. Chlorek amonu do lizy erytrocytów: 4.15g NH₄Cl, 0.5g KHCO₃, 0.8 ml 5% EDTA, ml H₂O. Jeżeli wyniki badań będą oceniane w CF, izolowane płytki krwi nie muszą być pozbawiane erytrocytów na drodze lizy chlorkiem amonu.
4. Paraformaldehyd - 1% w PBS - do utrwalania płytek krwi.
5. Surowice antyglobulinowe F(ab')₂ sprzężone z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) skierowane przeciwko globulinom ludzkim klasy IgG+IgM+IgA (wieloswoiste) lub IgG czy IgM (monoswoiste). Dla każdej surowicy antyglobulinowej należy ustalić jej odpowiednie rozcieńczenie do testu PIFT. Kierując się zalecanym rozcieńczeniem, na dołączonej ulotce z firmy, przygotować kilka rozcieńczeń surowicy, wyższych i niższych od zalecanego. Do tego celu należy użyć surowicę z mocnymi przeciwciałami płytkowymi oraz surowicę grupy AB, bez przeciwciał (kontrola ujemna). Wybrać takie największe rozcieńczenie surowicy antyglobulinowej, które daje mocne reakcje z przeciwciałami płytkowymi, przy braku reaktywności z surowicą bez przeciwciał.
6. Płyn do mrożenia płytek krwi: rozcieńczony bufor EDTA i DMSO w proporcji 10 :1.
7. Płyn do rozmrażania płytek krwi: rozcieńczony bufor EDTA i ACD w proporcji 10 :1.
8. Chlorochina - 20% o pH 4 (roztwór chlorochiny doprowadzić do właściwego pH przy użyciu 5N HCL)
9. Antykoagulant - 5% Na₂EDTA lub K₃EDTA.

6.2.3. Izolacja płytek krwi

1. Krew pobraną na EDTA (1 ml EDTA i 9 ml krwi), wirować 10 min, przy 1500 obr./min (170 x g).
2. Ściągnąć bogatopłytkowe osocze i wirować przez 5 minut przy 3000 obr./min (700 x g).
3. Osad płytek krwi zalać płynem do lizy erytrocytów (1-2 ml) i inkubować w łaźni lodowej od 5 do 10 minut. Ten etap izolacji wykonuje się wtedy, jeżeli badania są odczytywane w mikroskopie fluorescencyjnym.
4. Płytki krwi płukać trzy razy rozcieńczonym buforem EDTA, wirując po 5 minut przy 3000 obr./min (700 x g).
5. Do osadu płytek krwi dodać 2 ml 1% paraformaldehydu i komórki utrwalać przez 5 minut w temp. 20-22° C; do testu PIFT można również używać płytki krwi nieutrwalone.
6. Płytki krwi płukać tak jak w pkt. 4 i doprowadzić do gęstości około 250 x 10⁶/ml.

6.2.3.1. Przygotowanie płytek krwi mrożonych

1. Płytki krwi izolowane tak jak w pkt. 6.2.3, rozporcjować do probówek np. po 200 µl i następnie w czasie 10-15 minut, dodawać bardzo powoli, (po kropli), ciągle wstrząsając, taką samą objętość płynu do mrożenia płytek krwi. Probówki zamrozić w temp.-84°C (w ciekłym azocie).
2. Przed wykonaniem testu PIFT, płytki krwi szybko rozmrozić i odpłukać 3 razy w płynie do rozmrażania płytek krwi, następnie zawiesić w rozcieńczonym buforze EDTA i doprowadzić do odpowiedniej gęstości.

6.2.3.2. Przygotowanie płytek krwi ze złączonymi chlorochiną antygenami HLA.

Płytki krwi izolować tak w pkt 6.2.3, ale dodatkowo, przed utrwaleniem paraformaldehydem, do osadu płytek krwi dodać 1 ml 20% chlorochiny i inkubować 20 minut w temp.20-22°C, mieszając komórki co 5 minut. Po trzykrotnym odpłukaniu od chlorochiny, kontynuować dalsze etapy izolacji płytek krwi tak jak w pkt 6.2.3.

6.2.4. Dobór płytek krwi do testu

1. Do wykrywania przeciwciał w surowicach wielokrotnych biorców krwi, wystarczy

wyzolować płytki krwi od dwóch dawców. Ponieważ w teście PIFT wykrywa się także przeciwciała HLA, należy równolegle wykonać test LCT z limfocytami od tych samych dawców krwi, których płytki krwi będą użyte do testu PIFT, w celu zorientowania się czy reaktywność surowicy z płytkami krwi jest spowodowana przeciwciałami HLA czy swoistymi przeciwciałami płytkowymi. Jeżeli w surowicy wykrywane są przeciwciała HLA, a chcemy w niej wykryć przeciwciała HPA, test PIFT można wykonać z płytkami krwi traktowanymi chlorochiną złuszczającą antygeny HLA z powierzchni komórek.

2. Do wykonania próby krzyżowej używa się płytek krwi od dawców przeznaczonych do przetaczania dla danego chorego.
3. W przypadkach, kiedy nie dysponujemy świeżo izolowanymi płytkami krwi, do testu PIFT można także używać płytek krwi, które były wcześniej zamrożone.

6.2.5. Wykonanie testu

1. Do zagłębienia mikro płytki nanieść po 30 µl: surowic badanych, 2-3 surowice bez przeciwciał- grupy AB (kontrola ujemna), surowicę ze swoistymi przeciwciałami płytkowymi-anty-HPA1a (kontrola dodatnia) i dodać po 30 µl izolowanych płytek krwi. Mikro płytkę inkubować 30 minut w 37° C.
2. Wyplukać mikro płytkę, poprzez dodanie do zagłębienia po 200 µl rozcieńczonego buforu EDTA i wirowanie po 3 minuty przy 2500 obr/min (800 x g - jeżeli test wykonujemy na płytkach plastikowych) lub 3 minuty przy 3000 obr/min (1100 x g - jeżeli test wykonujemy w probówkach). Płukanie wykonać trzykrotnie. Po każdym wirowaniu wytrząsnąć płyn płuczący i osuszyć mikro płytkę na ligninie.
3. Dodać 30 µl odpowiedniego rozcieńczenia surowicy antyglobulinowej sprzężonej z FITC. Mikro płytkę zabezpieczyć przed światłem folią aluminiową i inkubować 30 min. w temp. 20-22° C, po czym trzykrotnie płukać tak jak w pkt 2.
4. Po ostatnim płukaniu wytrząsnąć płyn płuczący z wgłębienia mikro płytki (ale nie osuszać na ligninie). Jeżeli odczyt badania przeprowadzany jest:
 - a) w mikroskopie fluorescencyjnym - do każdego wgłębienia mikro płytki dodać po kropli PBS z dodatkiem glicerolu (1 kropla glicerolu i 4 kropli PBS). Następnie kroplę zawiesiny krwinek płytkowych przenieść na szkiełko podstawowe i po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym oglądać w mikroskopie,
 - b) w cytofluorometrze przepływowym - z każdego wgłębienia mikro płytki przenieść po 5 µl osadu komórek do 700 µl rozcieńczonego buforu EDTA. Badania w CF odczytywać tego samego dnia, w wyjątkowych przypadkach można czytać badania następnego dnia, ale należy mikro płytkę zabezpieczyć przed światłem i przechowywać w temp. 4° C.

6.2.6. Ocena testu fluorescencyjnego

- a) W mikroskopie (przy powiększeniu 400x). Reakcję dodatnią ocenia się na podstawie obecności charakterystycznego świecenia płytek krwi (jasna fluoryzująca obwódka wokół komórek), w porównaniu z kontrolą ujemną (brak świecenia). Intensywność świecenia oceniana jest od 1+ do 4+.
- b) W cytofluorometrze przepływowym analizować od 5000 do 10 000 komórek. Wyniki testu wyraża się na podstawie ilości komórek świecących (procent, mediana lub średni kanał świecenia - mean channel). Kontrolą ujemną jest reakcja płytek krwi z surowicami bez przeciwciał od dawców grupy AB. Za wynik dodatni przyjmowane są wartości średnie świecenia kontroli ujemnej $\pm 3SD$ lub $4SD$.

Tabela 1. Antygeny HLA klasy I (locus A,B,C), rozpoznawane serologicznie, wg raportu WHO z 1996r.

locus A	locus B		locus C
A1	B5	B51(5)	Cw1
A2	B7	B52(5)	Cw2
A3	B8	B53	Cw3
A9	B12	B54(22)	Cw4
A10	B13	B55(22)	Cw5
A11	B14	B56(22)	Cw6
A19	B15	B57(17)	Cw7
A23(9)	B16	B58(17)	Cw8
A24(9)	B17	B59	Cw9(w3)
A25(10)	B18	B60(40)	Cw10(w3)
A26(10)	B21	B61(40)	
A28	B22	B62(15)	
A29(19)	B27	B63(15)	
A30(19)	B35	B64(14)	
A31(19)	B37	B65(14)	
A32(19)	B38(16)	B67	
A33(19)	B39(16)	B70	
A34(10)	B40	B71(70)	
A36	B41	B72(70)	
A43	B42	B73	
A66(10)	B44(12)	B75(15)	
A68(28)	B45(12)	B76(15)	
A69(28)	B46	B77(15)	
A74(19)	B47	B78	
A80	B48	B81	
	B49(21)	Bw4	
	B50(21)	Bw6	

Tabela 2. Swoiste antygeny krwinek płytkowych

Układ	Antygen	Poprzednia nazwa	Lokalizacja na glikoproteinie
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Zw ^a , Pl ^{A1} Zw ^b , Pl ^{A2}	GPIIIa
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko ^b Ko ^a , Sib ^a	GPIb _α
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Bak ^a , Lek ^a Bak ^b	GPIIb
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Yuk ^b , Pen ^a Yuk ^a , Pen ^b	GPIIIa
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	Br ^b , Zav ^b Br ^a , Zav ^a , Hc ^a	GPIa
HPA-6W	HPA-6bW	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa
HPA-7W	HPA-7bW	Mo ^a	GPIIIa
HPA-8W	HPA-8bW	Sr ^a	GPIIIa
HPA-9W	HPA-9bW	Max ^a	GPIIb
HPA-10W	HPA-10bW	La ^a	GPIIIa
HPA-11W	HPA-11bW	Gro ^a	GPIIIa
HPA-12W	HPA-12bW	Iy ^a	GPIIb _β
HPA-13W	HPA-13bW	Sit ^a	GPIa
HPA-	HPA-	Oe ^a	GPIIIa
HPA-	HPA-	Va ^a	GPIIIa
HPA-	HPA-	Pe ^a	GPIb _α

Tabela 3. Różne stopnie zgodności w zakresie antygenów HLA klasy I locus A i B między biorcą a dawcą

Stopień zgodności	Liczba antygenów zgodnych	Liczba antygenów krzyżowo - reagujących lub tzw.splitów lub nieoznaczonych *
Zgodny	4	0
częściowo zgodny	3	1
częściowo zgodny	2	2
częściowo zgodny	1	3
częściowo zgodny	0	4

* Dopuszcza się również niezgodność 1 lub 2 antygenów

Tabela 4. Interpretacja wyników badań w teście LCT

Punkty	% martwych komórek	Interpretacja testu
1	do 10	ujemny
2	11 - 20	wątpliwie ujemny
4	21 - 50	słabo dodatni
6	51 - 80	dodatni
8	81 -100	silnie dodatni
0		nie do oceny