

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Р.А. Часнойть
13.11.2008г.
Регистрационный № 113-1108

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ
КРОВИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский
научно-практический центр гематологии и
трансфузиологии»

АВТОРЫ:

д.м.н., профессор Потапнев М.П., к.м.н., доцент Свирновская Э.Л.,
Дворина Е.М., Будько Т.В., Полкова Е.В.

Минск, 2008

Определение резус-принадлежности заключается в выявлении на эритроцитах людей антигена D системы Резус.

В систему Резус входят шесть антигенов D, d, C, c, E, e, которые определяют с помощью соответствующих антисывороток. Антиген d серологически не выявляется. Существуют также разновидности антигенов резус: D^u, C^w, c^v, c^x и другие.

Антигены системы Резус встречаются со следующей частотой:

D – 85%;

C – 70%, c – 80%;

E – 30%, e – 97,5%.

Антигены системы Резус обладают способностью вызывать образование изоиммунных антиэритроцитарных антител. Наиболее активным в этом отношении является антиген D, который и определяет термин резус-фактор. Именно по наличию или отсутствию антигена D все люди делятся на резус-положительных и резус-отрицательных.

Различные сочетания антигенов резус в крови отдельных людей составляют 28 групп системы Резус (таблица 1). В четырнадцати из них содержится антиген D – они являются резус-положительными, а другие четырнадцать не содержат антигена D (нижняя часть таблицы) – их относят к резус-отрицательным.

І. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Определение резус-принадлежности

Определение резус-принадлежности производится врачом лабораторной диагностики или фельдшером-лаборантом, имеющим специальную подготовку.

Определение резус-принадлежности реципиентов производится стандартной сывороткой (или моноклональным реагентом) анти-D, что дает возможность выявить резус-положительную (Rh+) и резус-отрицательную (rh-) принадлежность крови. В отличие от реципиентов, определение резус-принадлежности крови доноров производится в два этапа: сначала кровь доноров исследуется стандартной сывороткой анти-D, а затем кровь доноров, давшую отрицательную реакцию с сывороткой анти-D, исследуют дополнительно стандартными сыворотками антирезус, содержащими антитела анти-C и анти-E. Антитела анти-C и анти-E могут быть в сыворотке как в чистом виде, так и в сочетании с антителами анти-D, например: анти-D+C; анти-D+E или анти-D+C+E.

Таблица 1

Система Резус антигенов эритроцитов человека

№ п/п	Резус-положительные эритроциты			
	Фенотип	Частота в %	Генотип	Частота в %
1-2	CCDEE C ^w CDEe	0,00		
3	CCDEe	0,07	CDE/CDe	
4	CcDEE	0,035	CDE/cdE cDE/CdE	0,006 0,029
5	CcDEe	13,69	CDe/cDE CDE/cDe CDe/cdE cDE/Cde CDE/cde	12,24 0,01 0,97 0,27 0,19
6	C ^w cDEe	1,23		
7	ccDEe	11,82	cDE/cde cDE/cDe cDe/cdE	10,04 0,72 0,06
8	ccDEE	2,49	cDE/cDE cDE/cdE	2,16 0,33
9	CcDee	31,93	CDe/cde CDe/cDe cDe/Cde	29,90 1,98 0,05
10	C ^w cDee	2,38		
11	CCDee	16,81	CDe/Cde CDe/CDE	16,01 0,80
12	C ^w CCDee	2,60		
13	C ^w C ^w De	0,00		
14	ccDee	2,21	cDe/cde cDe/cDe	2,10 0,11
Резус-отрицательные эритроциты				
15	ccddee	12,71	cde/cde	
16	Ccddee	1,54	Cde/cde	
17	CCddee	0,03	Cde/Cde	
18	C ^w ccddee	0,035	C ^w cde/cde	
19	ccddEe	0,35	cde/cdE	
20	CcddEe	0,070	Cde/cdE	
21- 28	C ^w Cddee C ^w C ^w ddee ccddEE CcddEE CCddEE CCddEe CcddEe C ^w CddEe	0,00		

В число резус-отрицательных доноров зачисляются только те лица, кровь которых дает отрицательную реакцию со всеми сыворотками, т.е. не содержит ни одного из этих трех антигенов резус D, C, E.

Иногда такие дополнительные исследования требуется проводить и у других лиц – у больных с подозрением на изосенсибилизацию и у беременных женщин.

Результат определения резус-принадлежности крови доноров записывается специалистом в журнале регистрации результатов исследования и на лицевом листе «Медицинской карты донора» с указанием даты и за подписью лиц, производивших определение, а также заносится в электронную базу данных единого донорского центра (на станциях переливания крови).

Результат определения резус-принадлежности крови больных и других лиц записывается в специальный журнал и на бланке с указанием даты и за подписью лиц, производивших определение. Этот бланк вклеивается в историю болезни и, кроме того, результат, указанный на этом бланке, записывается лечащим врачом в правом верхнем углу лицевого листа истории болезни и скрепляется его подписью с указанием даты.

2. Учет групповой принадлежности сыворотки антирезус

Сыворотки антирезус, если изготавливаются из крови доноров, должны быть "универсальными", т.е. лишенными групповых антител анти-А и анти-В. Такие сыворотки пригодны для определения резус-принадлежности крови людей любой группы по системе АВ0.

Если сыворотки антирезус готовят от доноров с различными группами крови по системе АВ0, то в этих случаях при определении резус-принадлежности необходимо учитывать групповую специфичность сыворотки. Сывороткой антирезус группы 0(I) определяется резус-принадлежность только в эритроцитах группы 0(I); сывороткой антирезус группы А(II) – только в эритроцитах групп 0(I) и А(II); сывороткой антирезус группы В(III) – только в эритроцитах групп 0(I) и В(III); сывороткой антирезус группы АВ(IV) и специально приготовленной "универсальной" сывороткой резус-принадлежность определяется в эритроцитах группы АВ(IV) и любой другой группы крови.

3. Контрольные исследования

При каждом исследовании или проводимой серии исследований необходимо для проверки специфичности и активности сыворотки антирезус ставить контроль. Для контроля применяются стандартные резус-положительные эритроциты группы 0(I) или той же группы, что и исследуемая кровь, и стандартные резус-отрицательные эритроциты группы 0(I).

О стандартных эритроцитах см. инструкцию «Взятие и учет крови, получаемой от доноров малыми дозами для приготовления стандартных эритроцитов».

4. Особенности стандартных сывороток антирезус

Стандартные сыворотки для определения резус-принадлежности могут содержать резус-антитела разные по форме – полные (класса IgM) и неполные (класса IgG) (см. инструкцию «Исследование сыворотки на наличие резус-антител»). Каждые из этих антител активны только в особых условиях, поэтому методика определения резус-принадлежности зависит от того, какие резус-антитела находятся в стандартной сыворотке.

Метод использования каждой стандартной сыворотки антирезус указывается в сопроводительной инструкции.

II. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Метод определения резус-принадлежности эритроцитов зависит от формы антител в стандартной сыворотке и способа ее изготовления.

При выдаче сыворотки антирезус к ней прилагается краткая сопроводительная инструкция с описанием того метода, для которого предназначена данная серия выдаваемой сыворотки.

1. Определение резус-принадлежности реакцией конглотинации с желатином в пробирке с подогревом при +46 – +48°C

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

Стандартная сыворотка антирезус анти-D с неполными антителами;
стандартные эритроциты Rh⁺ и rh⁻ для контроля;
центрифужные или другие пробирки вместимостью 10 мл;
водяная баня +46 – +48°C;
суховоздушный термостат +46 – +48°C;
10%-ый раствор желатина (желатин можно сохранять с консервантом – сульфацилом натрия (альбуцид) из расчета 100 мг альбуцида на 10 мл 10 %-го раствора желатина);
лупа с 2-4-кратным увеличением.

Предварительная обработка испытуемой крови и стандартных эритроцитов проводится в следующем порядке.

Кровь для исследования следует брать в количестве 5-8 мл в пробирку без стабилизатора. На пробирке надписать фамилию, инициалы и группу крови лица, от которого взята кровь.

Обычно после свертывания крови на дне пробирки остается небольшое количество свободных эритроцитов, которые следует употребить для исследования. Если этих эритроцитов недостаточно, следует встряхнуть сгусток для отделения большего количества эритроцитов.

Допустимо хранить кровь в течение двух суток при температуре $+4^{\circ} - +8^{\circ}\text{C}$.

Можно брать кровь в пробирку 10 мл с изотоническим раствором NaCl, лимоннокислого натрия или другого стабилизатора (0,25 мл на 1 мл крови). В этом случае эритроциты необходимо отмыть, для чего в пробирку долить десятикратный объем изотонического раствора NaCl, содержащее перемешать и центрифугировать. Отмытые эритроциты использовать для исследования.

Непосредственно перед исследованием кровь может быть взята из места укола пальца стеклянной палочкой и немедленно помещена в пробирку с заранее введенной сывороткой антирезус, смешанной с желатином в соотношении 1:2.

Техника определения

В штатив устанавливают два ряда пробирок по числу исследуемых образцов эритроцитов в каждом ряду и по две пробирки для стандартных резус-положительных и резус-отрицательных эритроцитов. На каждой двух пробирках надписывают фамилию и инициалы лица, кровь которого будет исследоваться. Пробирки нумеруют. В одинаково обозначенные пробирки (в два ряда) вводят по 1 капле (0,05 мл) исследуемых эритроцитов, а в контрольные – по 1 капле (0,05 мл) стандартных Rh⁺ и rh⁻ эритроцитов.

В пробирки первого ряда добавляют по 1 капле (0,05 мл) сыворотки антирезус.

Во все пробирки (в два ряда) добавляют по 2 капли (0,1 мл) 10%-го раствора желатина, предварительно подогретого до разжижения.

Второй ряд является контролем для исключения возможного неспецифического склеивания исследуемых эритроцитов (прямая желатиновая проба).

Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием и штатив с пробирками помещают в водяную баню при $+46 - +48^{\circ}\text{C}$ на 15 минут или в суховоздушный термостат с той же температурой на 25-30 минут.

При извлечении пробирок из водяной бани или термостата доливают в них 5-8 мл изотонического раствора NaCl и перемешивают содержимое путем 1-2-кратного перевертывания пробирок.

Трактовка результатов

Пробирки просматривают на свет невооруженным глазом или через лупу.

Результат оценивают по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов.

При положительном результате агглютинаты легко различимы в виде красных комочков в прозрачной, почти обесцвеченной жидкости.

При отрицательном результате в пробирке видна равномерно окрашенная в светло-красный цвет, опалесцирующая жидкость (рисунок 1).

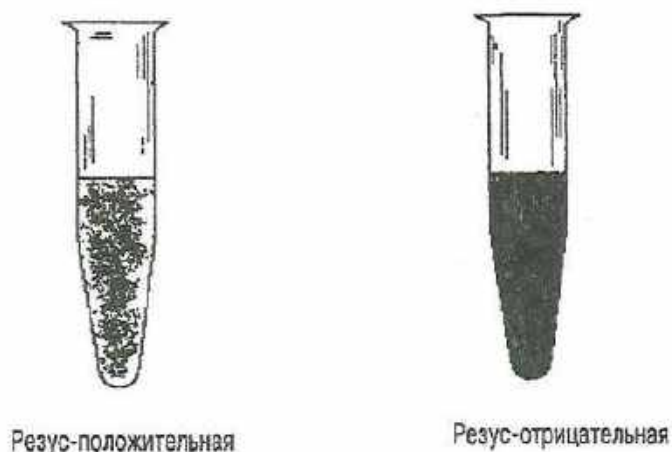


Рисунок 1. Результат реакции определения резус-принадлежности методом с применением желатина

Образцы эритроцитов, давшие агглютинацию с сывороткой анти-D, являются резус-положительными (Rh⁺). Образцы эритроцитов, не давшие агглютинации с сывороткой анти-D – резус-отрицательными (rh⁻).

Однако результаты учитывают как истинные только после проверки контрольных образцов, подтверждающих специфичность и активность сыворотки антирезус, т.е. при отсутствии агглютинации со стандартными резус-отрицательными эритроцитами одноименной группы или группы 0(I) и наличии агглютинации со стандартными резус-положительными эритроцитами одноименной группы или группы 0(I). В пробирках второго (контрольного) ряда агглютинации быть не должно.

Наличие агглютинации в какой-либо пробирке контрольного ряда (прямая желатиновая проба положительная) говорит о неспецифичности реакции. При этих условиях положительный результат с сывороткой ан-

тирезус не может быть учтен как истинный. В таких случаях рекомендуется отмыть исследуемые эритроциты теплым изотоническим раствором NaCl для элюирования с них аутоантител и повторить исследование. При сомнительном результате для определения резус-принадлежности следует применить другие методы исследования.

2. Определение резус-принадлежности при помощи стандартного универсального реагента (в пробирках без подогрева)

Метод определения резус-принадлежности без подогрева позволяет быстро проводить исследование без применения особого лабораторного оборудования.

Метод основан на использовании сывороток антирезус, содержащих поликлональные неполные анти-D антитела, изготовленных в сочетании с коллоидными растворами (альбумин, полиглокин), в присутствии которых неполные резус-антитела приобретают способность агглютинировать резус-положительные эритроциты при комнатной температуре.

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

Стандартный универсальный реагент антирезус – анти-D;
33%-ый раствор полиглокина;
стандартные эритроциты Rh⁺ и rh⁻ для контроля;
центрифужные или другие пробирки вместимостью 10 мл;
лупа с 2-4-кратным увеличением.

Предварительная обработка исследуемой крови не требуется. Может быть использована кровь, взятая непосредственно перед исследованием из места укола пальца, консервированная кровь и осадок эритроцитов в пробирке после образования сгустка крови, взятой без стабилизатора.

Допустимо хранить кровь в течение 2 суток при +4 – +8⁰С.

Техника реакции

В штатив устанавливают два ряда пробирок по числу исследуемых образцов эритроцитов в каждом ряду и по две пробирки для стандартных резус-положительных и резус-отрицательных эритроцитов. На пробирках надписывают фамилию и инициалы лица, кровь которого исследуется.

Во все пробирки первого ряда вводят по 1 капле (0,05 мл) стандартного универсального реагента антирезус.

Во все пробирки второго (контрольного) ряда вводят по 2 капли (0,1 мл) изотонического раствора NaCl и по 1 капле (0,05 мл) 33%-го раствора полиглокина.

В каждую пару одинаково обозначенных пробирок вводят согласно маркировке по 1 капле (0,05 мл) исследуемой крови. В пробирки, предназначенные для контроля, вводят стандартные резус-положительные и резус-отрицательные эритроциты.

Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием и затем медленно поворачивают по оси, наклоняя почти до горизонтального положения так, чтобы содержимое растекалось по стенкам. Такое растекание крови по стенкам пробирок делает реакцию более выраженной. Как правило, агглютинация наступает уже в течение первой минуты, но для образования устойчивого комплекса антиген-антитело и четко выраженной реакции, а также ввиду возможности замедленной реакции при слабо выраженной агглютинабельности эритроцитов, контакт эритроцитов с реагентом при поворачивании пробирок проводят не менее 5 минут при комнатной температуре (+18° – +22°C).

Через 5 минут в пробирки добавляют по 2-3 мл изотонического 0,9%-го раствора NaCl и перемешивают содержимое 2-3-кратным перевертыванием пробирок, не встряхивая.

Трактовка результатов

Пробирки просматривают на свет невооруженным глазом или через лупу. Результат трактуют по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов.

При наличии агглютинации в виде крупных комочков или хлопьев из склеенных эритроцитов на фоне просветленной жидкости исследуемую кровь считают резус-положительной (Rh+). При отсутствии агглютинации (в пробирке сохраняется гомогенное окрашивание) исследуемую кровь следует считать резус-отрицательной (rh-) (рисунок 2).

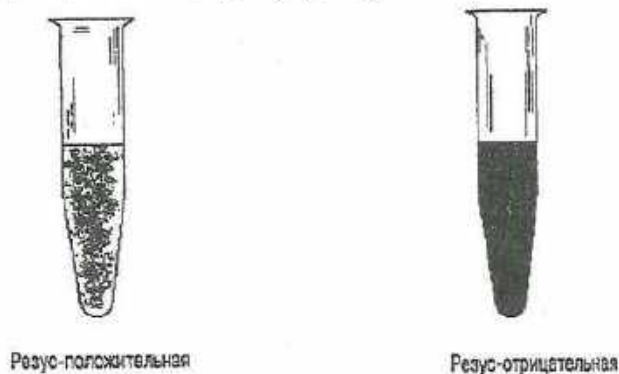


Рисунок 2. Результат определения резус-принадлежности с помощью универсального реагента

Однако эти результаты следует учитывать как истинные только после проверки контрольных образцов, т.е. при положительной реакции – со стандартными резус-положительными эритроцитами, при отрицательной – с резус-отрицательными, а также после просмотра результатов во втором контрольном ряду. Во всех пробирках второго контрольного ряда агглютинации быть не должно.

Наличие агглютинации в какой-либо пробирке контрольного ряда указывает на неспецифическое склеивание эритроцитов и, следовательно, не позволяет учесть результат исследования как истинный.

В этом случае рекомендуется отмыть исследуемые эритроциты теплым изотоническим раствором NaCl для элюирования с них аутоантител и повторить исследование.

В сомнительных случаях для определения резус-принадлежности следует применить метод агглютинации в солевой среде, используя сыворотку с полными антителами.

3. Определение резус-принадлежности реакцией конгломинации в сывороточной среде на плоскости (чашке Петри) с подогревом

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

Стандартные сыворотки антирезус анти-D с неполными антителами;
стандартные эритроциты Rh⁺ и rh⁻ для контроля;
пластмассовые пластины, чашки Петри;
водяная баня +46 – +48°C;
контрольная сыворотка группы АВ(IV).

Предварительная обработка исследуемой крови и стандартных эритроцитов

Кровь для исследования берут в количестве 3-5 мл в обычные пробирки без стабилизатора. На пробирке надписывают фамилию, инициалы и группу крови лица, от которого берется кровь. Обычно после свертывания крови на дне пробирки остается небольшое количество эритроцитов, которые следует употреблять для реакции. Если этих эритроцитов недостаточно, следует интенсивно встряхнуть сгусток для отделения большего количества эритроцитов.

Эритроциты используют для исследования в виде 5-10%-ой взвеси в собственной сыворотке. Взвесь готовят в этих же пробирках путем встряхивания содержимого.

Допустимо хранить кровь в течение 2-х суток при +4 – +8°C.

Техника определения

На пластмассовую пластину, чашку Петри в соответствии с маркировкой наносят по одной большой капле (0,1 мл) сыворотки антирезус в три ряда по горизонтали, всего в шесть точек (3 – одной серии сывороток и 3 – другой). Кроме того, в одну точку наносят большую каплю (0,1 мл) стандартной сыворотки группы АВ(IV), не содержащей резус-антител (контроль на неспецифическую агглютинацию).

К первой капле каждой серии сыворотки добавляют 1 каплю (0,05 мл) взвеси исследуемых эритроцитов, ко второй капле каждой серии – 1 каплю (0,05 мл) контрольных резус-положительных эритроцитов, одноименных с группой крови больного или группы 0(I), и к третьей капле каждой серии – 1 каплю (0,05 мл) контрольных резус-отрицательных эритроцитов, обязательно одноименных с группой крови больного по системе АВ0. В контрольную каплю с сывороткой группы АВ(IV), не содержащей резус-антител, добавляют 1 каплю (0,05 мл) исследуемых эритроцитов. Капли перемешивают стеклянной палочкой и пластину опускают в водяную баню при +46 – +48°C на 10 минут.

Трактовка результатов

Результаты исследований просматривают при легком покачивании пластины, чашки Петри и оценивают по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов.

При положительном результате агглютинаты легко различимы на почти обесцвеченном фоне жидкости.

При отрицательном результате капля остается равномерно окрашенной в красный цвет.

Образцы эритроцитов, давшие агглютинацию с сывороткой анти-D, являются резус-положительными (Rh+). Образцы эритроцитов, не давшие агглютинацию с сывороткой анти-D, являются резус-отрицательными (rh-). Однако эти результаты учитывают как истинные только при совпадении их в обеих сериях сыворотки антирезус и после проверки контрольных образцов эритроцитов, подтверждающих специфичность и активность сыворотки антирезус, т.е. при отсутствии агглютинации со стандартными резус-отрицательными эритроцитами одноименной группы и наличии агглютинации со стандартными резус-положительными эритроцитами одноименной группы или группы 0(I), а также при отрицательном результате в контрольной капле с сывороткой группы АВ(IV), не содержащей резус-антител. Наличие агглютинации в этой капле говорит о неспецифическом склеивании эритроцитов и, следовательно, положительный результат с сывороткой антирезус не может

быть учтен как истинный. В этих случаях резус-принадлежность следует определять, применяя другие методы исследования.

4. Определение резус-принадлежности эритроцитов реакцией агглютинации в солевой среде

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

Стандартные сыворотки антирезус анти-D с полными антителами;
стандартные эритроциты Rh⁺ и rh⁻ для контроля;
пробирки высотой 1,5-2,0 см и диаметром 0,5-0,6 см с гладким дном округлой формы или планшеты для иммунологических реакций;
лупа с 2-4-кратным увеличением;
термостат на +37°C.

Предварительная обработка исследуемой крови и стандартных эритроцитов

Кровь для исследования берут в количестве 0,5-1 мл в обычные пробирки, содержащие 0,25 мл (5 капель) раствора лимоннокислого натрия или другого стабилизатора. На пробирке надписывают фамилию, инициалы и группу крови лица, от которого взята кровь. Эритроциты необходимо отмыть, для чего в пробирки доливают доверху изотонический раствор NaCl, содержимое их перемешивают и центрифугируют.

Кровь можно брать без стабилизатора. При этом после свертывания крови обычно в пробирке остается некоторое количество свободных эритроцитов. Если этих эритроцитов недостаточно, следует интенсивно встряхнуть сгусток для отделения большего количества эритроцитов. Полученные таким образом эритроциты отмывают, как указано выше.

Из отмытых эритроцитов приготавливают 2%-ую взвесь, для чего 1 каплю эритроцитов переносят в соответственно обозначенную пробирку, содержащую 49 капель изотонического раствора NaCl. Полученную 2%-ую взвесь эритроцитов используют для исследования.

Допустимо хранить кровь в течение 2 суток при +4 – +8°C.

Техника определения

В штатив устанавливают два ряда пробирок по числу исследуемых образцов эритроцитов в каждом ряду и две – для контролей. Предварительно штатив накрывают листом бумаги. На нем слегка накалывают отверстия, сквозь которые и устанавливают пробирки. Против каждой пары пробирок

на бумаге надписывают фамилию и инициалы лица, кровь которого будет исследоваться. Во все пробирки (лунки планшета) первого ряда вводят по 1 капле (0,05 мл) сыворотки антирезус одной серии, во все пробирки (лунки) второго ряда – по 1 капле (0,05 мл) сыворотки антирезус другой серии и во все пробирки (лунки) обоих рядов по 1 капле изотонического раствора NaCl.

В соответственно обозначенные пары пробирок (лунок планшета) добавляют по 1 капле (0,05 мл) 2%-ой взвеси испытуемых эритроцитов, а в контрольные – по 1 капле (0,05 мл) 2%-ой взвеси контрольных стандартных резус-положительных и резус-отрицательных эритроцитов. Содержимое тщательно перемешивают встряхиванием и помещают в термостат при +37°C на 1 час. Можно затем оставить пробирки при комнатной температуре еще на 1,5-2 часа до учета результата.

За это время эритроциты оседают на дно, предварительно войдя в контакт с сывороткой антирезус.

Трактовка результатов

Пробирки (планшеты) следует рассматривать по продольной оси над источником света, закрытым матовым стеклом.

Результат оценивают по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов, что выражается в разной форме их осадка на дне.

При положительном результате осадок эритроцитов располагается на дне неравномерным слоем. Видна шероховатость, губчатость или зернистость его структуры. Края осадка никогда не бывают ровными, они изогнуты, иногда завернуты внутрь. В некоторых случаях эритроциты располагаются в виде волнистого венчика вокруг более светлой центральной части. При отрицательном результате осадок эритроцитов располагается равномерным слоем без шероховатостей и неровностей, иногда с небольшим просветлением в центре. Границы его представляют собой правильно очерченный круг.

Диаметр осадка при отрицательном результате всегда меньше, чем при положительном.

Образцы эритроцитов, давшие агглютинацию с сывороткой анти-D, являются резус-положительными (Rh+), образцы эритроцитов, не давшие агглютинации с сывороткой анти-D – резус-отрицательными (rh-).

Однако результаты учитывают как истинные при совпадении их в обеих сериях сыворотки антирезус и после проверки контрольных образцов, подтверждающих специфичность и активность сыворотки антирезус, т.е. при отсутствии агглютинации со стандартными резус-отрицательными эритроцитами и наличии агглютинации со стандартными резус-положительными.

Примечание: полные антитела не выявляют слабый антиген D^u.

5. Определение резус-принадлежности крови с использованием моноклонального реагента анти-D

Действующим началом реагента анти-D являются моноклональные человеческие анти-D антитела, которые продуцируются гетерогрибридной, полученной в результате слияния человеческой лимфобластоидной линии и миеломной клеточной линии мыши.

Моноклональные антитела принадлежат к иммуноглобулинам класса М, являются полными антителами, т.е. вызывают прямую агглютинацию эритроцитов, содержащих D-антиген.

В связи с тем, что IgM антитела не вызывают агглютинации некоторых образцов эритроцитов со слабовыраженным D-антигеном (D^u), определение резус-принадлежности реципиентов и доноров отличаются. Реципиенты с группой крови D^u рассматриваются как резус-отрицательные и определение их резус-принадлежности ограничивается только тестированием моноклональным реагентом анти-D.

Доноры, содержащие D^u антиген, рассматриваются как резус-положительные и определение их резус-принадлежности идет в два этапа.

Образцы донорской крови, которые при исследовании реагентом анти-D были определены как D-отрицательные, необходимо дополнительно исследовать с помощью других анти-D реагентов, содержащих неполные антитела класса IgG: поликлональной сывороткой или моноклональным анти-D IgG реагентом на присутствие D^u антигена (таблица 2).

Таблица 2

Трактовка результатов определения резус-принадлежности реципиентов и доноров

Исследуемые эритроциты	Результат реакции с реагентом		Резус-принадлежность
	Моноклональные анти-D полные антитела	Моноклональные анти-D неполные антитела	
Реципиенты	-		Отрицательная
	+		Положительная
Доноры	+		Положительная
	-	+	Положительная D^u
	-	-	Отрицательная

Определение D-антигена системы Резус реакцией агглютинации на плоскости

На пластинку со смачиваемой поверхностью нанести большую каплю (0,1мл) реагента. Рядом поместить маленькую каплю (0,01-0,05 мл) исследуемой крови и смешать кровь с реагентом. Четко выраженная агглютинация наступает через 30-60 секунд. Результат реакции учитывается через 5 минут.

Определение D-антигена системы Резус реакцией агглютинации в пробирках

В круглодонную пробирку внести 1 каплю (около 0,1 мл) реагента и добавить 1 каплю 5%-ой суспензии исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе. Содержимое пробирки тщательно перемешать встряхиванием. Инкубировать пробирки при комнатной температуре 30 минут. После инкубации пробирку центрифугировать при 1500-2000 об/мин. в течение 1 минуты. Мягко покачивая пробирку, отслоить осадок от дна. При отрицательном результате осадок эритроцитов разбивается, образуя непрозрачную гомогенную суспензию. При положительном результате в пробирке видны агглютинаты на фоне прозрачной жидкости.

Определение D-антигена системы Резус реакцией агглютинации в микроплате

В лунку 96-ячеечной микроплаты внести 0,05 мл реагента и 0,05 мл 2%-ой суспензии исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе (эритроциты предварительно дважды отмываются). Через 45-60 минут инкубации при комнатной температуре визуально оценить результат реакции по рисунку осадка эритроцитов: при отрицательном результате осадок эритроцитов собирается в точку, при положительном – имеет большой диаметр, располагается неравномерным слоем, имеет неровные или завернутые края.

Контроль специфичности

Для контроля специфичности реакции необходимо включать стандартные D-положительные и D-отрицательные эритроциты.

6. Определение резус-принадлежности в непрямом антиглобулиновом тесте (непрямая проба Кумбса) с помощью неполных анти-D антител

Параллельно с исследованием образцов тестируемой крови проводят контрольное исследование со стандартными резус-положительными и резус-отрицательными эритроцитами.

Техника определения

Из исследуемой крови готовят 2-5%-ую взвесь отмытых эритроцитов. С этой целью:

вносят в пробирку 5 капель (около 0,25 мл) исследуемой крови, трижды отмытой в 5-10 мл физиологического раствора;

ресуспендируют осадок эритроцитов в 2-3 мл физиологического раствора или, что предпочтительнее, в 2-3 мл раствора низкой ионной силы – LISS (в этом случае произойдет более прочная и быстрая фиксация антител на эритроцитах);

маркируют чистую пробирку;

вносят в нее 1 каплю реагента анти-D;

добавляют 1 каплю 2-5%-ой взвеси исследуемых эритроцитов;

если эритроциты суспендированы в физиологическом растворе, то инкубируют смесь при 37°C в течение 45 минут; если используются эритроциты в LISS, то 10-15 минут;

трехкратно отмывают эритроциты в 5-10 мл физиологического раствора;

удаляют физиологический раствор;

добавляют 1 каплю антиглобулинового реагента к осадку эритроцитов и тщательно перемешивают;

центрифугируют 15-20 секунд при 2000-3000 об/мин (900-1000g);

аккуратно ресуспендируют осадок эритроцитов и визуально определяют наличие или отсутствие агглютинации. При наличии агглютинации кровь является резус-положительной. При отсутствии агглютинации – резус-отрицательной. Слабая агглютинация возможна при экспрессии антигена D^u;

записывают результаты исследования.

В настоящее время для определения резус-принадлежности эритроцитов используются также идентификационные карты для определения групп крови АВ0 и резус-принадлежности в гелевом тесте (ID-карты «ДиаМед» и других производителей), метод с использованием специальных карточек с высушенными на них тестовыми реактивами («Biotest» и других производителей), микропланшеты Эригайт с нанесенными моноклональными антисыворотками (компании «Biotest AG», Германия и других производителей), кар-

ты универсальные серологические (с микроколонками) Сэллбайнд (компания «Sanquin Reagents», Голландия и других производителей).

Техника проведения исследования резус-принадлежности с использованием этих методов приводится в инструкции «Определение групп крови системы АВ0 при помощи изогемагглютинирующих сывороток», а также с использованием подробной инструкции-производителя.

III. ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. При определении резус-принадлежности, независимо от метода определения, результат учитывается как истинный после проверки контрольных образцов, подтверждающих специфичность и активность каждой серии сыворотки антирезус, т.е. при отсутствии агглютинации со стандартными резус-отрицательными эритроцитами одноименной группы или группы 0(I) и наличии агглютинации со стандартными резус-положительными эритроцитами одноименной группы или группы 0(I) и в других контрольных пробах, применяемых для каждого метода.

2. Если при определении резус-принадлежности наблюдается слабая или сомнительная реакция, следует повторно исследовать кровь данного лица другими сериями сывороток антирезус и другими методами, включая метод агглютинации в солевой среде с сыворотками, содержащими полные антитела.

Если при этом все серии сывороток, содержащих неполные антитела, дадут также слабую или сомнительную реакцию, а с полными антителами реакция будет отрицательная, это значит, что эритроциты содержат слабую разновидность антигена резус, так называемый антиген D^u , частота которого составляет около 1%. В этих случаях резус-принадлежность крови больного или беременной женщины указывают как резус-отрицательную (rh-), а резус-принадлежность крови донора – как резус-положительную (Rh+), не допуская, таким образом, переливания его крови резус-отрицательным реципиентам.

IV. ИССЛЕДОВАНИЕ ДРУГИХ АНТИГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕЗУС

При использовании сывороток, содержащих антитела анти-С, анти-Е, анти-с, анти-е, анти- C^W в чистом виде, а также в сочетании с анти-Д, например D+C, D+E, D+C+E, применяются те же методы, что и при использовании сыворотки антирезус анти-Д. При этом учитывается форма антител.

В качестве контролей обязательно используют эритроциты, содержащие и не содержащие соответствующий антиген.