

ИНСТРУКЦИЯ МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
13 ноября 2008 г. № 114-1108

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
Министра здравоохранения
Республики Беларусь

Р.А.Часнойть

13.11.2008

**Приготовление и использование стандартных
сывороток и универсального реагента антирезус для
определения резус-принадлежности крови человека**

Учреждение-разработчик: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии»

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

Минск, 2008

Стандартные сыворотки антирезус служат для определения резус-принадлежности эритроцитов людей и приготавливаются из донорской крови, содержащей активные резус-антитела, возникшие вследствие сенсибилизации к резус-фактору.

Источники получения сыворотки антирезус

Кровь (плазма) для изготовления сывороток антирезус может быть получена: а) от женщин, сенсибилизированных к резус-фактору во время беременности; б) от больных, перенесших трансфузионные реакции или осложнения, которым производят кровопускание в процессе их лечения (обменные трансфузии, плазмаферез) и от тех же лиц после их излечения; в) от доноров, дающих кровь для переливания больным, в тех (редких) случаях, когда у них обнаружены в крови резус-антитела; г) от доноров, специально иммунизированных резус-положительными эритроцитами.

**Показатели пригодности крови для изготовления из нее стандартной сыворотки
антирезус**

Показателем пригодности крови для приготовления из нее стандартной сыворотки антирезус является ее активность, т.е. титр резус-антител.

Ввиду возможного снижения титра антител при обработке сыворотки следует привлекать к донорству лиц, в крови которых содержатся антитела анти-D с титром, превышающим окончательные требования, предъявляемые к стандартным сывороткам. Для полных: антител титр должен быть не ниже, чем 1:32, для неполных антител при исследовании их в непрямой пробе Кумбса – не ниже чем 1:128, а при исследовании реакцией с применением желатина в пробирках или реакцией в сывороточной среде на плоскости – не ниже 1:64.

Исходный титр резус-антител при изготовлении универсального реагента должен быть не ниже 1:64.

Методы и дозы взятия крови

Взятие крови от лиц, сенсibilизированных к резус-антигену предыдущими беременностями или трансфузиями крови, а также от специально иммунизированных доноров, состояние здоровья которых соответствует требованиям, предъявляемым к донорам, дающим кровь для переливания больным, допускается в дозах, предусмотренных «Инструкцией о порядке медицинского осмотра доноров, взятия у них крови и ее компонентов».

Плазму естественно иммунизированных женщин, содержащую резус-антитела, рекомендуется получать также методом плазмафереза, однако только вне периода беременности.

Оплата на усиление питания лицам, из крови которых изготавливается сыворотка антирезус, при любом методе взятия крови и последующего отделения сыворотки или плазмы производится в соответствии с постановлением Совета Министров Республики Беларусь.

Первичная обработка сыворотки и плазмы

При получении плазмы из крови донора методом плазмафереза плазма не позже, чем через 2–3 дня должна быть дефибринирована. Для этого плазму переливают из пластикового контейнера во флакон, добавляют в нее 20 %-й раствор хлорида кальция из расчета 3 мл на 100 мл плазмы и содержимое флакона тщательно перемешивают. Через несколько минут после этого, а затем еще раз через 30 минут, флакон с плазмой встряхивают для отделения сгустка от стенок флакона и оставляют на 2 часа при комнатной температуре, после чего помещают на ночь в холодильник при +4 – +8 °С. На следующий день сыворотку отделяют от сгустка в другой флакон и консервируют борной кислотой из расчета 2–3 г на 100 мл сыворотки или азидом натрия – 1 г на 1 л.

Если кровь берут обычным путем в сухой флакон, то через несколько минут после взятия крови, а затем еще раз через 30 минут, флакон встряхивают для отделения сгустка от стенок и оставляют на 2 часа при комнатной температуре, после чего помещают на ночь в холодильник при +4 – +8 °С. На следующий день сыворотку отделяют от сгустка, переносят в другой флакон и консервируют. При высоком титре резус-антител можно получить дополнительное количество сыворотки антирезус путем приготовления смывов со сгустка. Для этого сгусток измельчают (разрезают на много частей) и заливают его до половины объема изотоническим раствором NaCl или сывороткой группы АВ(IV) с высокими конглотинирующими свойствами, стандартным раствором для разведения или 5 %-м раствором альбумина.

Флакон со сгустком, залитым жидкостью, плотно закрывают пробкой и несколько раз переворачивают для того, чтобы лучше вымыть из сгустка сыворотку антирезус, а затем помещают в холодильник при температуре +4 – +8 °С. На следующий день сыворотку-смыв сливают в другой сосуд и оставляют в холодильнике до полного оседания эритроцитов, после чего переливают в другой сосуд и полученный смыв исследуют на активность резус-антител. Смыв соединяют с первоначально полученной сывороткой или обрабатывают далее отдельно, предварительно добавляя в него борную кислоту из расчета 2–3 г на 100 мл сыворотки или азид натрия – 1 г на 1 л. Приготовление смыва можно повторить. Изотонический раствор NaCl применяется для смывов в тех случаях, когда предполагается последующее использование сыворотки антирезус реакцией агглютинации в солевой среде (в маленьких пробирках) или реакцией конглотинации с применением желатина или полиглюкина.

После такой первичной обработки сыворотку хранят при +4 – +8 °С не менее 2–3 недель и затем приступают к дальнейшим исследованиям.

Исследование сыворотки на активность резус-антител

Исследование сыворотки следует производить через 2–3 недели после ее заготовки и консервирования ввиду того, что в этот период может происходить снижение титра антител. Исследование начинают с проверки групповой принадлежности сыворотки по системе АВ0. Полученные результаты сверяют с паспортными записями на флаконе с сывороткой. Следует учесть, что если исследуется смыв со сгустка, полученный сывороткой группы АВ(IV) или стандартным раствором для разведения группы АВ(IV), то может произойти нейтрализация групповых антител α и β . Если это будет установлено, то делают соответствующие изменения в паспортных записях. Далее определяют в сыворотке присутствие полных и неполных антител с помощью методов, описанных в «Инструкции по исследованию сыворотки на наличие резус-антител».

Для испытания применяется не менее трех образцов стандартных эритроцитов одноименной с испытуемой сывороткой группы или группы 0(I), содержащих в том или ином сочетании три антигена резус: D, C и E, а также два образца резус-отрицательных (ссddee) эритроцитов. Положительный результат с резус-положительными эритроцитами и отрицательный с резус-отрицательными эритроцитами подтверждает наличие в сыворотке резус-антител. После этого сыворотку титруют тем же методом, которым в ней были выявлены антитела. Например, если сыворотка дала положительный результат в солевой среде, ее титруют в солевой среде; если сыворотка дала положительный результат в непрямой пробе Кумбса или в реакции с применением желатина, ее титруют, используя эти методы; если сыворотка оказалась активной при использовании обоих методов, она титруется также с помощью двух методов (методы титрования см. в «Инструкции по исследованию сыворотки на наличие резус-антител»).

Сыворотку считают пригодной для дальнейшей обработки и исследования, если в ней выявляют антитела любым методом и если при этом антитела достаточно активны. Активность антител определяется их титром, который на этом этапе исследования должен быть для полных антител не ниже 1:32, а для неполных антител в непрямой пробе Кумбса не ниже 1:64, реакциями с применением желатина или полиглокуина и в сывороточной среде на плоскости – не ниже 1:64.

Сыворотки сохраняют в холодильнике при +4 – +8 °С еще не менее 2 недель, после чего повторно титруют.

Примечание. В тех случаях, когда сыворотка антирезус принадлежит к группе 0 α β (I), A β (II) или B α (III) для удобства последующего использования ее рекомендуется абсорбировать, т.е. удалить из нее групповые агглютинины, сделав таким образом ее универсальной.

Если в сыворотке присутствуют слабые антитела анти-C или анти-E, их необходимо также удалить из сыворотки путем абсорбции.

После абсорбции (нейтрализации) сыворотку антирезус вновь исследуют и титруют как сказано выше.

Способы удаления или нейтрализации антител изложены в инструкции по применению «Удаление из сыворотки антирезус антител другой специфичности».

Повторное титрование сыворотки

Повторное титрование сыворотки производят, используя метод, который дал положительный результат при первом исследовании сыворотки. Если титр антител сохранился или снизился не более, чем на одну ступень, но так, что все же остался не ниже цифр, указанных в пункте «Заключение о пригодности сыворотки», сыворотку можно стандартизировать.

Стандартизация сыворотки антирезус

Стандартизация заключается в исследовании специфичности антител и в определении пригодности ее для практического использования. Для стандартизации сыворотку исследуют с помощью того же метода, в котором оказались активными содержащиеся в сыворотке антитела. Испытание ведется со стандартными эритроцитами одноименной группы или группы 0(I), содержащими различные антигены резус, в том числе каждый из этих антигенов в отдельности: ccDee, Ccddee и ceddEe, и резус-отрицательными – ccddee. В число резус-отрицательных включают образцы эритроцитов, содержащих и не содержащих факторов Даффи (Fy) и Келл (K). Если при стандартизации сыворотка дает положительный результат со всеми образцами резус-положительных эритроцитов, независимо от их антигенной структуры, и отрицательный результат с эритроцитами Ccddee, ceddEe и резус-отрицательными – ccddee, то значит в сыворотке содержатся резус-антитела анти-D. Если в сыворотке таким образом выявлены антитела специфичности анти-D, то ее титруют при использовании того же метода.

Если сыворотка при стандартизации дает положительный результат с некоторыми образцами резус-положительных эритроцитов и с эритроцитами Ccddee или ceddEe, но дает отрицательный результат с эритроцитами ccDee и с резус-отрицательными – ccddee, то это значит, что в сыворотке содержатся резус-антитела анти-C или анти-E.

Антитела анти-C и анти-E также титруют, используя метод, при помощи которого они были выявлены.

Если сыворотка при стандартизации дает положительный результат одновременно со всеми образцами резус-положительных эритроцитов, а также с эритроцитами Ccddee и ceddEe, но отрицательный результат со всеми резус-отрицательными эритроцитами ccddee, то это значит, что сыворотка содержит антитела соответственно к двум или трем антигенам резус, т.е. анти-D+C анти-D+E или анти-D+C+E.

Каждое из антител титруют отдельно теми методами, при использовании которых они оказались активными.

Следует отметить, что различные резус-антитела в одной и той же сыворотке бывают полными и неполными и поэтому могут быть соответственно активными в той или иной среде. В этих случаях их титрование следует проводить, используя разные методы.

Если исследуемая сыворотка дала положительный результат избирательно среди резус-отрицательных образцов, это значит, что в ней содержатся другие антитела, например, анти-Даффи или анти-Келл.

Исследование и обработку таких сывороток см. в инструкции по применению «Приготовление стандартных редких сывороток для определения различных изоантигенов человека».

Заключение о пригодности сыворотки

Сыворотка считается стандартной и пригодной для практического использования, если она содержит одну или несколько разновидностей резус-антител в любой форме (полные или неполные) с титром анти-D антител: в солевой среде – не ниже 1:32; в непрямой пробе Кумбса – не ниже 1:128; для реакции с применением желатина или полиглобулина – не ниже 1:64.

Ввиду редкости антител анти-C и анти-E допускается использование таких сывороток с более низким титром (на 1 разведение) при условии хорошо выраженного положительного результата. Сыворотки, отвечающие этим требованиям, считаются стандартными сыворотками данной специфичности.

Назначение сыворотки антирезус

Сыворотка антирезус, признанная стандартной, должна быть использована в зависимости от формы имеющихся в ней антител: реакцией агглютинации в солевой

среде, реакцией с применением желатина, реакцией в сывороточной среде на плоскости. Кроме того, сыворотка, содержащая неполные резус-антитела, может быть использована для приготовления стандартного универсального реагента антирезус с применением 33 %-го раствора полиглюкина.

Во всех случаях сыворотка и реагент, предназначенные для практического использования, должны быть расфасованы и паспортизированы.

Розлив и паспортизация стандартных сывороток антирезус

После стандартизации и заключения о пригодности сыворотки фильтруют и разливают в маленькие флаконы по 5–10 мл в зависимости от потребности. На флаконы наклеивают этикетки с наименованием учреждения-изготовителя, номера серии, обозначения группы крови по системе АВ0, специфичности, формы антител антирезус, количества и срока годности (рисунок 1).

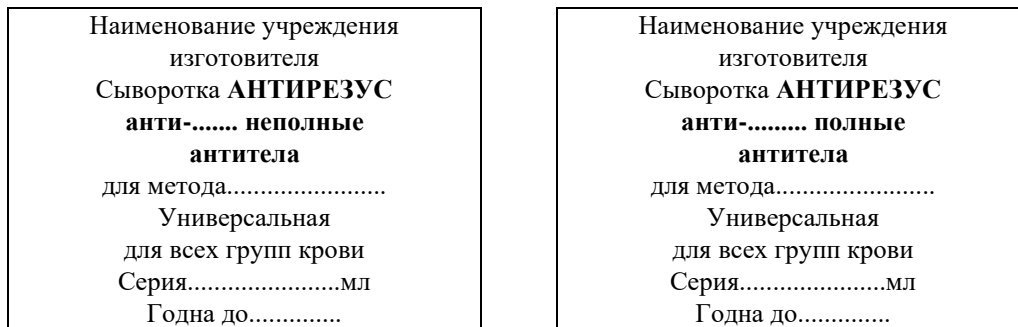


Рисунок 1. Этикетки для стандартных сывороток антирезус*

* На этикетки наносят по диагонали четыре желтые полосы. Возможно печатать этикетки на желтом фоне.

Хранение и срок годности стандартной сыворотки антирезус

Расфасованные стандартные сыворотки антирезус рекомендуется хранить в холодильнике при $+4 - +8$ °С на срок до шести месяцев или в замороженном состоянии при температуре -18 °С и ниже – не более двух лет.

После размораживания или при хранении ее при $+4 - +8$ °С срок годности стандартных сывороток антирезус устанавливают шесть месяцев.

Активность резус-антител в большинстве случаев сохраняется и дольше. Поэтому по истечении срока годности сыворотки могут быть проверены и при сохранении их специфичности и титра срок годности продлевают: для сыворотки, хранившейся при $+4 - +8$ °С, – на два месяца.

Выдача стандартной сыворотки антирезус

При выдаче стандартной сыворотки антирезус необходимо приложить к ней инструкцию по использованию. Для сыворотки антирезус это особенно важно, так как сыворотки, содержащие антитела разные по форме (полные и неполные) и приготовленные для разных методов исследования, активны только при применении определенного метода и будут неактивными или неспецифическими при неправильном их использовании. Инструкции по использованию для каждого метода даны в дополнениях 1, 2, 3.

Изготовление универсального реагента антирезус для определения резус-принадлежности в пробирках без подогрева

Универсальный реагент антирезус пригоден для определения резус-фактора крови, независимо от ее групповой принадлежности по системе АВ0. Реагент готовят из содержащих неполные резус-антитела сывороток, предварительно обработанных, исследованных и признанных пригодными как стандартные.

Для изготовления реагента отбирают сыворотки группы АВ(IV) или другой группы, но освобожденные от групповых агглютининов α и β путем удаления или нейтрализации.

Для изготовления реагента пригодны сыворотки антирезус с титром не ниже чем 1:64. Если исходные сыворотки имеют более высокий титр, допускается их разведение до титра 1:64 изотоническим раствором NaCl или сывороткой группы АВ(IV). Титрование сывороток производят с применением 33 %-го раствора полиглюкина.

В штатив устанавливают 10 пробирок с обозначением 1:2, 1:4 и т.д. до 1:1024. Во все пробирки вводят по 2 капли изотонического раствора NaCl.

Затем в первую пробирку вводят той же пипеткой 2 капли исследуемой сыворотки антирезус, из первой пробирки после перемешивания содержимого переносят 2 капли во вторую, из третьей – в четвертую и т.д. до последней, из которой 2 капли удаляют.

Затем во все пробирки добавляют по 1 капле резус-положительных эритроцитов или их смеси и по одной капле 33 %-го раствора полиглюкина.

Примечание. Смесь эритроцитов готовят из крови 4–6 доноров группы 0(I) резус-положительной, взятой не более чем за 2–3 дня.

Пробирки встряхивают для перемешивания содержимого, затем наклоняют почти до горизонтали и в таком положении медленно поворачивают по оси так, чтобы содержимое растеклось по стенкам пробирки. Такой контакт сыворотки с эритроцитами при поворачивании пробирок продолжают 5 минут.

Через 5 минут во все пробирки добавляют по 2–3 мл изотонического раствора NaCl и перемешивают содержимое путем 1–2-кратного переворачивания пробирок (не встряхивать!).

Результат наблюдают в проходящем свете невооруженным глазом или через лупу.

Оценку результата производят по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов в виде комочков или хлопьев на фоне полностью или частично обесцвеченной жидкости.

Максимальное разведение, в котором имеется агглютинация эритроцитов, принимают за титр исследуемой сыворотки.

Установив, что титр резус-антител в данном методе не ниже 1:64, переходят к дальнейшему исследованию, для чего готовят пробный образец реагента.

Изготовление пробного образца реагента антирезус

К двум объемам сыворотки антирезус с неполными антителами добавляют один объем 33 %-го раствора полиглобулина, тщательно перемешивают и далее проводят исследование смеси на специфичность и активность.

Исследование на специфичность и активность

Пробный образец реагента исследуют с 2–3 образцами резус-положительных эритроцитов, а также с резус-отрицательными ccddee группы 0(I), A(II) и B(III). Кроме того, в исследование включают эритроциты фенотипа Ccddee и ccddEe. Среди резус-отрицательных должны быть образцы положительные и отрицательные по факторам Даффи (Fy) и Келл (K).

Для исследования устанавливают ряд пробирок по числу образцов эритроцитов, пробирки маркируют. На дно пробирок помещают одну каплю исследуемого реагента и затем, в соответствии с маркировкой, в пробирки вводят по одной капле эритроцитов. Содержимое пробирок тщательно перемешивают, затем пробирки наклоняют почти до горизонтального положения, медленно поворачивают и т.д., как сказано выше.

Трактовка результата

Результат учитывают по отсутствию или наличию агглютинации эритроцитов и скорости ее наступления в каждой пробирке.

Специфичность оценивают по отсутствию агглютинации с D-отрицательными эритроцитами различного фенотипа в каждой отдельной пробирке.

Если агглютинация произошла во всех пробирках с резус-положительными образцами, а со всеми резус-отрицательными образцами и образцами Ccddee и ccddEe – реакция отрицательная, пробный образец считают специфическим.

Активность пробного образца можно оценивать одновременно с оценкой специфичности.

Если агглютинация резус-положительных эритроцитов проявилась при поворачивании наклоненной пробирки в течение первой минуты и через 5 минут после добавления изотонического раствора NaCl агглютинаты образуют крупные хлопья на фоне полностью просветленной жидкости и при этом титр антител, определенный на предыдущем этапе исследования, не ниже 1:64, реагент считают пригодным для практического использования.

Изготовление серии стандартного универсального реагента антирезус

После заключения о пригодности пробного образца можно готовить стандартный универсальный реагент в полном объеме исходя из потребности. Изготовленный реагент вновь контролируют теми же методами, т.е. титруют и исследуют на специфичность и активность и делают заключение о его пригодности.

После этого реагент фильтруют, разливают по 5–10 мл во флаконы, которые тщательно закупоривают и наклеивают на них этикетки с указанием учреждения, изготовившего реагент, название реагента, специфичности, номера серии, количества и срока годности (рисунок 2).

Наименование учреждения-изготовителя
Универсальный реагент антирезус анти- для метода в пробирках без подогрева

Рисунок 2. Форма этикетки для стандартного универсального реагента антирезус*

* На этикетки наносят по диагонали четыре желтые полосы. Возможно печатать этикетки на желтом фоне.

Хранение и срок годности

Реагент хранят в холодильнике при +4 – +8 °С.

Срок годности – 6 месяцев. Активность и специфичность реагента контролируют один раз в месяц в лаборатории, его изготовившей.

Выдача стандартного универсального реагента антирезус

Реагент антирезус выдается в другие учреждения в комплекте с 33 %-м раствором полиглюкина и с инструкцией по использованию (дополнение 2).

Порядок регистрации этапов изготовления сыворотки и реагента антирезус

Все этапы работы по изготовлению сывороток, предназначенных для разных методов определения резус-принадлежности, а также реагента антирезус, регистрируются в «Журнале регистрации продуктов крови для изготовления стандартной сыворотки антирезус (реагента, реактива)» (форма № 432/у-07) и в «Журнале регистрации изготовленной стандартной сыворотки антирезус (реагента, реактива)» (форма № 432/у-07).

Дополнение 1

ИНСТРУКЦИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СТАНДАРТНОЙ СЫВОРОТКИ АНТИРЕЗУС ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ РЕАКЦИЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЖЕЛАТИНА (прилагается при выдаче сыворотки)

Реакция с применением желатина пригодна для работы с сыворотками, содержащими неполные резус-антитела.

При определении резус-принадлежности необходимо учитывать групповую специфичность стандартной сыворотки антирезус по системе АВ0.

Сывороткой антирезус группы АВ(IV) или специально приготовленной универсальной сывороткой антирезус определяют резус-принадлежность в эритроцитах любой группы по системе АВ0. Сывороткой антирезус группы 0(I) определяют резус-принадлежность только в эритроцитах группы 0(I), сывороткой группы А(II) – в эритроцитах группы 0(I) и А(II) и сывороткой антирезус группы В(III) – в эритроцитах группы 0(I) и В(III).

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

Предварительная обработка исследуемой крови и стандартных эритроцитов

Кровь для исследования берут в количестве 5 мл в обычную пробирку без стабилизатора. На пробирке надписывают фамилию, инициалы и группу крови лица, от которого взята кровь.

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

Можно брать кровь с изотоническим раствором лимоннокислого натрия (0,25 мл на 1 мл крови) или другим стабилизатором. В этом случае эритроциты необходимо отмыть, для чего в пробирку долить доверху изотонический раствор NaCl, содержимое ее перемешать и центрифугировать. Отмытые эритроциты используют для исследования. Допустимо хранить кровь в течение двух суток при +4 – + 8 °С.

Техника реакции

В штатив устанавливают два ряда центрифужных пробирок объемом не менее 10 мл по количеству исследуемых образцов эритроцитов и по две пробирки для стандартных резус-положительных и резус-отрицательных эритроцитов. На двух пробирках каждого ряда надписывают фамилию и инициалы лица, кровь которого будет исследоваться.

В одинаково обозначенные пробирки вводят согласно маркировке по 1 капле (0,05 мл) исследуемых эритроцитов, в контрольные пробирки – по 1 капле (0,05 мл) стандартных резус-положительных эритроцитов и по 1 капле (0,05 мл) стандартных резус-отрицательных эритроцитов.

Во все пробирки добавляют по 2 капли (0,1 мл) 10 %-го раствора желатина, предварительно подогретого до разжижения в теплой воде (+46 – +48 °С). Перед употреблением желатин следует просмотреть. При помутнении или появлении хлопьев, а также при потере свойств застудневать при +4 – +8 °С желатин непригоден.

Во все пробирки 1-го ряда добавляют по 1 капле (0,05 мл) стандартной сыворотки антирезус.

2-й ряд служит контролем для исключения возможной неспецифической агглютинации исследуемых эритроцитов, например, за счет аутоантител.

Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием, и штатив с пробирками помещают в водяную баню при +46 – +48 °С на 20 минут или в суховоздушный термостат при той же температуре на 30–45 минут.

По извлечению пробирок из водяной бани или термостата в них доливают 8–10 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 трактуют по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов. При положительном результате агглютинаты легко различимы в виде красных комочков на прозрачном, почти обесцвеченном, фоне жидкости.

При отрицательном результате в пробирке видна равномерно окрашенная слегка опалесцирующая жидкость.

Образцы эритроцитов, давшие агглютинацию с сывороткой анти-D, считают резус-положительными (Rh+); образцы эритроцитов, не давшие агглютинацию с сывороткой анти-D, – резус-отрицательными (rh-). Однако эти результаты следует учитывать 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(1), а также после просмотра результатов во втором ряду. В пробирках второго (контрольного) ряда гемагглютинации быть не должно. Наличие гемагглютинации во втором (контрольном) ряду указывает на неспецифическое склеивание эритроцитов, например, из-за аутоантител и, следовательно, положительный результат с сывороткой антирезус не может быть учтен как истинный.

Для определения резус-принадлежности в таких случаях следует применить стандартную сыворотку антирезус с полными антителами в реакции солевой агглютинации или предварительно отмыть эритроциты теплым изотоническим раствором NaCl для элюирования с них аутоантител.

Примечание:

1. Изредка встречаются образцы эритроцитов, дающие слабо выраженную реакцию. В этих случаях следует повторно исследовать их несколькими сериями стандартной сыворотки антирезус высокой активности и, по возможности, сывороткой с полными антителами.

2. При определении резус-принадлежности крови доноров недостаточно разделить их только на резус-положительных и резус-отрицательных по сыворотке анти-D. Для доноров, давших отрицательную реакцию с сывороткой анти-D, необходимо дополнительное исследование сыворотками, содержащими

антитела анти-С и анти-Е. В число резус-отрицательных доноров зачисляются только лица, кровь которых не содержит ни одного из этих антигенов, т.е. фенотипа cсddee.

3. Определение антигенов системы Резус С, Е, с, е и С^w производится сыворотками, содержащими антитела соответствующей специфичности. Эти антитела могут быть в сыворотке как в чистом виде, так и в различных сочетаниях, в том числе и с анти-Д. Эти исследования производятся теми же методами, что и определение резус-антигена Д. В качестве контроля используются эритроциты соответствующего фенотипа. Подробности о технике реакции, оценке результатов, мерах предупреждения возможных ошибок изложены в инструкции по применению «Определение резус-принадлежности эритроцитов крови».

Дополнение 2

ИНСТРУКЦИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ УНИВЕРСАЛЬНОГО РЕАГЕНТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ В ПРОБИРКАХ БЕЗ ПОДОГРЕВА

(прилагается при выдаче реагента)

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

Стандартный универсальный реагент антирезус – анти-Д, анти-СD, анти-DE, анти-СDE;

33 %-й раствор полиглюкина;
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 – +8 °С.

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 полиглюкина.

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 растеклось по ее стенкам. Такое растекание крови по стенкам пробирок делает реакцию более выраженной. Как правило, агглютинация наступает уже в течение первой минуты. 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.

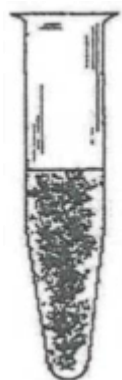
Через 5 минут в пробирки добавляют по 2–3 мл изотонического 0,9 %-го раствора NaCl и перемешивают содержимое 2–3-кратным переворачиванием пробирок, не встряхивая.

Трактовка результатов

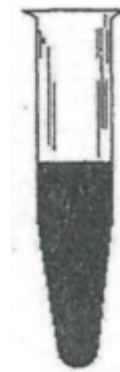
Пробирки просматривают на свет невооруженным глазом или через лупу. Результат трактуют по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов.

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 3). Однако эти результаты следует учитывать как истинные только после проверки контрольных образцов, т.е. при положительной реакции – со стандартными резус-положительными эритроцитами, и отрицательной – с резус-отрицательными эритроцитами, а также после просмотра результатов во втором контрольном ряду.

Во всех пробирках второго контрольного ряда агглютинации быть не должно.



Резус-положительная



Резус-отрицательная

Рисунок 3. Результат определения резус-принадлежности эритроцитов крови с помощью универсального реагента

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.

Определение антигенов G и E системы Резус производится реагентами, содержащими антитела соответствующей специфичности. Эти антитела могут быть в реагенте как в чистом виде, так и в различных сочетаниях, в том числе и с анти-D.

Эти исследования производятся теми же методами, что и определение резус-антигена D. В качестве контролей используются эритроциты соответствующего фенотипа.

Подробности о технике реакции, оценке результатов, мерах предупреждения возможных ошибок см. в инструкции «Определение резус-принадлежности эритроцитов крови».

Условия хранения и применения реагентов

Хранят реагенты в холодильнике при +4 – +8 °С.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению реагентов и квалифицированное проведение анализа.

Срок хранения реагентов – 6 месяцев.

Вскрытые флаконы с реагентами использовать до появления признаков непригодности (помутнения, появления хлопьев).

Дополнение 3

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СТАНДАРТНОЙ СЫВОРОТКИ
АНТИРЕЗУС АНТИ-D ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ**

ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ РЕАКЦИЕЙ АГГЛЮТИНАЦИИ В СОЛЕВОЙ СРЕДЕ (прилагается при выдаче сыворотки)

Реакция агглютинации эритроцитов в солевой среде пригодна для работы с сывороткой, содержащей полные резус-антитела.

Определение резус-фактора эритроцитов крови следует производить двумя сериями стандартных сывороток антирезус. В настоящей инструкции описывается определение двумя сериями сыворотки с использованием одной и той же методики – агглютинации эритроцитов в солевой среде.

При определений резус-принадлежности необходимо учитывать групповую специфичность сыворотки по системе АВ0.

Антирезус сыворотка группы АВ(IV) и специально приготовленная – универсальная – предназначена для определения резус-принадлежности крови любой группы по системе АВ0.

Антирезус сывороткой группы 0(I) определяют резус-принадлежность только в эритроцитах группы 0(I), сывороткой группы А(II) – в эритроцитах группы 0(I) и А(II) и сывороткой группы В(III) – в эритроцитах группы 0(I) и В(III).

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

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) изотонического раствора лимоннокислого натрия или любого 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.

Можно брать кровь и 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 сказано выше.

Из отмытых эритроцитов приготавливают 2 %-ю взвесь, для чего 1 каплю эритроцитов переносят в соответственно обозначенную пробирку, содержащую 49 капель изотонического раствора NaCl. Такую взвесь употребляют для исследования. Допустимо хранить кровь в течение двух суток при +4 – + 8 °С.

Техника реакции

В штатив устанавливают два ряда пробирок высотой 2–2,5 см с внутренним диаметром 0,5–0,6 см и с гладким дном округлой формы – в каждом ряду по числу исследуемых эритроцитов и по две пробирки для контрольных исследований. Предварительно штатив накрывают листом бумаги, в котором слегка накалывают отверстия, сквозь которые устанавливают пробирки. Против каждой пары пробирок надписывают фамилию и инициалы лица, кровь которого исследуется. Можно использовать планшет для иммунологических реакций, имеющий лунки с круглым дном.

Во все пробирки (лунки) первого ряда вносят 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 в оба ряда добавляют по 1 капле изотонического раствора NaCl.

В соответственно обозначенные пары пробирок (лунок) добавляют по 1 капле (0,05 мл) 2 %-й взвеси исследуемых эритроцитов, а в контрольные – по 1 капле (0,05 мл) 2 %-й

взвеси стандартных резус-положительных эритроцитов или по одной капле взвеси стандартных резус-отрицательных эритроцитов.

Содержимое пробирок (лунок) тщательно перемешивают встряхиванием и помещают в термостат при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ на один час (можно затем оставить планшет при комнатной температуре еще на 1–2 часа до учета результатов).

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

Трактовка результатов

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

Результат трактуют 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 шероховатости и неровностей, иногда с небольшим просветлением в центре. Границы его представляют собой правильно очерченный круг. Его диаметр при отрицательном результате всегда меньше, чем при положительном (рисунок 4).

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

Однако результаты можно учитывать как истинные только при совпадении их в обеих сериях стандартной сыворотки антирезус и 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(II).



Рисунок 4. Осадок эритроцитов при определении резус-принадлежности

Примечание:

1. Изредка встречаются образцы эритроцитов, дающие слабо выраженную реакцию. В этих случаях следует повторно исследовать их несколькими сериями стандартной сыворотки антирезус высокой активности. Антиген крови D^u в реакции солевой агглютинации не выявляется.

2. При определении резус-принадлежности крови доноров недостаточно деления их только на резус-положительных и резус-отрицательных по сыворотке анти-D, а необходимо дополнительно исследовать стандартными сыворотками, содержащими антитела анти-C и анти-E. В число резус-отрицательных доноров зачисляются только лица, кровь которых не содержит ни одного из этих антигенов, т.е. фенотипа ccddee.

3. Определение антигенов системы резус-C, E, c и e производится стандартными сыворотками, содержащими антитела соответствующей специфичности. Эти антитела могут быть в сыворотке как в чистом виде, так и в различных сочетаниях, в том числе и с анти-D.

Исследования производятся теми же методами, что и определение резус-антигена D. В качестве контролей используются эритроциты соответствующего фенотипа.

Подробности о технике реакции, оценке результатов, мерах предупреждения возможных ошибок см. в инструкции по применению «Определение резус-принадлежности эритроцитов крови».

