

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Р.А. Часнойть
13.11.2008 г.
Регистрационный № 115-1108

**ИССЛЕДОВАНИЕ СЫВОРОТКИ ЧЕЛОВЕКА
НА НАЛИЧИЕ РЕЗУС-АНТИТЕЛ**

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

Резус-антитела относятся к так называемым аллоиммунным (изоиммунным) антителам. Их наличие не является нормальным свойством сыворотки человека, а появляются они в крови резус-отрицательных людей лишь при особых обстоятельствах.

Условиями, способствующими образованию резус-антител, являются введение резус-отрицательному человеку резус-положительной крови или беременность резус-отрицательной женщины резус-положительным плодом.

Определение резус-антител наряду с определением резус-принадлежности больного и донора необходимо для предупреждения переливания резус-несовместимой крови, а также для диагностики возможного заболевания плода или новорожденного гемолитической болезнью. Исследование аллоантиэритроцитарных антител у реципиентов с гемотрансфузиями или беременностями в анамнезе должно проводиться перед каждым переливанием эритроцитсодержащих сред. У беременных женщин исследование сыворотки на содержание антител к антигенам эритроцитов проводят в первые 16-20 недель беременности, в случае отсутствия антител в сыворотке – повторно в 30-32 недели. При обнаружении антител или наличии в анамнезе гемотрансфузий, выкидышей, мертворождений, либо гемолитической болезни новорожденных исследование антител проводят в динамике ежемесячно, а также после родов.

Определение резус-антител требуется также при подготовке материала для приготовления стандартных сывороток антирезус в ОПК и СПК.

Резус-антитела бывают различными по специфичности: анти-D, анти-C, анти-E, анти-c, анти-e; по форме: полные и неполные.

Специфичность антител определяется тем, с каким из антигенов они реагируют. Форма антител определяется тем, каким образом они реагируют с эритроцитами, содержащими специфические для них резус-антигены.

Полные антитела, соединяясь с резус-антигенами эритроцитов, вызывают агглютинацию этих эритроцитов при реакции в солевой среде. Неполные антитела в этих условиях лишь соединяются с эритроцитами, но не вызывают агглютинации, так что внешне эта реакция ничем не проявляется.

Для того, чтобы установить, произошла ли реакция между неполными резус-антителами и эритроцитами, необходимы специальные условия, в частности, добавление различных коллоидов (желатин, полиглокин), или использование антиглобулиновой сыворотки для пробы Кумбса, реагирующей с человеческим белком (непрямая проба Кумбса). При всех перечисленных условиях реакция между резус-антителами и эритроцитами, содержащими резус-антиген, в конечном итоге также проявляется в виде агглютинации эритроцитов.

Разные методы определения резус-антител требуют оптимальных для них температурных условий.

I. ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Учет специфичности антител и стандартных эритроцитов

Наиболее часто при иммунизации резус-отрицательных людей повторными трансфузиями крови или беременностями образуются антитела анти-D, но при этих же условиях могут образоваться и другие резус-антитела. Поэтому при определении антител в сыворотке крови человека эту сыворотку испытывают с резус-положительными эритроцитами, обязательно содержащими антигены резус: D, C, E, c, e.

Если антигены C и E на эритроцитах специально не определялись, то число резус-положительных образцов должно быть не менее 20 для того, чтобы среди них обязательно встретились все антигены резус.

В качестве контроля на специфичность реакции, а также для выявления антител анти-c и анти-e в исследование включаются стандартные резус-отрицательные — ccddee — эритроциты и, если возможно, собственные эритроциты лица, сыворотка которого испытывается.

Такое исследование является предварительным. Для уточнения специфичности требуются дополнительные специальные исследования.

2. Учет формы антител

Чаще всего при иммунизации резус-антигеном образуются неполные антитела; иногда одновременно с ними образуются и полные. Кроме того, встречаются случаи, при которых у человека образуются только полные резус-антитела.

Поэтому определение резус-антител следует производить не менее, чем двумя методами, одним из которых обязательно должен быть метод солевой агглютинации, выявляющий полные антитела, а другим — любой метод, выявляющий неполные антитела.

II. ИССЛЕДОВАНИЕ СЫВОРОТКИ НА НАЛИЧИЕ НЕПОЛНЫХ РЕЗУС-АНТИТЕЛ НЕПРЯМОЙ ПРОБОЙ КУМБСА

1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Кровь для приготовления эритроцитов берут в количестве 0,5-1 мл в обычные пробирки емкостью не менее 10 мл, содержащие 0,25 мл изотонического раствора лимоннокислого натрия. Пробирки нумеруют и пишут на них фамилию, инициалы, группу крови и резус-принадлежность лица, от которого взята кровь.

Пробирки доливают доверху изотоническим 0,9%-ым раствором NaCl, затем содержимое пробирок перемешивают, центрифугируют и отсасывают надосадочную жидкость. Такое отмывание повторяют дважды. После отмывания на дне пробирки остаются отмывые эритроциты, которые и применяют для исследования сыворотки.

2. Техника исследования

В штатив устанавливают и нумеруют пробирки высотой 4-10 см с внутренним диаметром 0,5-0,8 см. Число и нумерация пробирок должны соответствовать числу и нумерации образцов эритроцитов, с которыми исследуется сыворотка.

Во все пробирки вводят по 3 капли (0,15 мл) испытуемой сыворотки.

Со дна каждой пробирки, содержащей отмывые стандартные эритроциты, очень тонкой пастеровской пипеткой или наконечником автоматической пипетки набирают маленькую каплю (0,01 мл) эритроцитов и переносят ее в пробирку с испытуемой сывороткой согласно нумерации пробирок.

В качестве отрицательного контроля используют сыворотку, заведомо не содержащую антиэритроцитарные антитела. В качестве положительного контроля используют сыворотку, заведомо содержащую антитела к антигенам стандартных эритроцитов.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают путем встряхивания и помещают для инкубации в термостат на 45 минут при температуре +37°C. За это время резус-антитела, если они имеются в испытуемой сыворотке, фиксируются на эритроцитах.

После инкубации в пробирки доливают доверху изотонический раствор NaCl, содержимое пробирок перемешивают и центрифугируют, после чего надосадочную жидкость отсасывают. Такое отмывание эритроцитов повторяют 3-4 раза.

В каждую пробирку к отмывым таким образом эритроцитам добавляют 4-7 капель изотонического раствора NaCl для получения 5%-ой взвеси (так как при отмывании эритроциты частично захватываются, интенсивность взвеси контролируют глазом).

Одну каплю (0,05 мл) взвеси эритроцитов из каждой пробирки переносят на белую фарфоровую или любую другую белую пластинку со смачиваемой поверхностью и к каждой капле прибавляют по 1 капле (0,05 мл) антиглобулиновой сыворотки для пробы Кумбса.

Сыворотку тщательно перемешивают с эритроцитами (стеклянной палочкой или углом предметного стекла), после чего пластинку слегка покачивают. При этом наблюдают результат (наличие или отсутствие агглютинации эритроцитов).

Агглютинация обычно начинается в течение первых 10-30 секунд, но при слабом титре резус-антител – может наступить до 20 минут.

3. Трактовка результата

Наличие агглютинации в каплях с образцами резус-положительных эритроцитов и отсутствие ее с резус-отрицательными и собственными эритроцитами указывает на наличие в сыворотке неполных резус-антител.

Отсутствие агглютинации со всеми образцами эритроцитов указывает на то, что неполные резус-антитела – анти-D, C, E, c и e – не выявлены.

4. Титрование сыворотки, содержащей неполные резус-антитела

В штатив устанавливают 10 пробирок с обозначениями 1:2, 1:4, 1:8 и т. д. до 1:1024.

Во все пробирки вводят по 3 капли (0,15 мл) изотонического раствора NaCl.

В первую пробирку (с обозначением 1:2) пастеровской пипеткой или автоматической пипеткой с наконечником вводят 3 капли (0,15 мл) исследуемой сыворотки. Из первой пробирки, после перемешивания ее содержимого, переносят 3 капли в следующую пробирку и т. д. до последней пробирки, из которой 3 капли удаляют. В результате в пробирках получают разведения испытуемой сыворотки от 1:2 до 1:1024.

Во все пробирки добавляют по одной маленькой капле (0,01 мл) стандартных резус-положительных эритроцитов или смеси эритроцитов, полученных от 4-5 резус-положительных лиц и приготовленных так же, как готовят стандартные эритроциты.

Содержимое пробирок перемешивают и штатив помещают на 45 минут в термостат при температуре +37°C.

После инкубации эритроциты отмывают и из них готовят 5%-ую взвесь. Затем из каждой пробирки переносят 1 каплю (0,05 мл) взвеси на белую пластинку и к каждой капле взвеси прибавляют 1 каплю (0,05 мл) антиглобулиновой сыворотки для пробы Кумбса, которую смешивают с эритроцитами. Далее в течение 5 минут наблюдают результат при покачивании пластинки.

Максимальное разведение, в котором наблюдается агглютинация (время наблюдения – 5 минут), принимается за титр выявленных неполных резус-антител. Если агглютинация эритроцитов наблюдается во всех разведениях сыворотки, то, следовательно, титр резус-антител выше 1:1024. В этих случаях следует продолжить разведение сыворотки и далее продолжать исследование, как описано выше.

Для сокращения времени проведения исследования и повышения его чувствительности целесообразно использовать модификации антиглобулинового теста: 1) с использованием раствора низкой ионной силы (LISS); 2) «спин»-метод.

5. Проведение непрямого антиглобулинового теста с LISS

Эритроциты отмывают один раз 0,9%-ым раствором NaCl и один раз LISS, объем добавляемых растворов должен быть в 20 раз больше объема эритроцитов. Готовят рабочую (5-10%-ую) взвесь эритроцитов в LISS.

В пробирке смешивают 1 объем взвеси эритроцитов и 2 объема исследуемой сыворотки.

В качестве отрицательного контроля используют сыворотку, заведомо не содержащую антиэритроцитарные антитела. В качестве положительного контроля используют сыворотку, заведомо содержащую антитела к антигенам тест-эритроцитов.

Опыт и контроли инкубируют при +37°C в течение 15 минут или 7 минут на водяной бане при температуре +46 – +48°C.

После инкубации эритроциты отмывают 3-4 раза 100-кратным избытком 0,9%-го раствора NaCl.

Готовят 5-10%-ую взвесь отмытых сенсibilизированных эритроцитов в растворе 0,9%-го раствора NaCl.

На плоскости смешивают 1 каплю взвеси эритроцитов и 2 капли антиглобулиновой сыворотки. Результат оценивают в течение 10 минут при покачивании планшета.

Наличие агглютинации в опытной пробе свидетельствует о содержании в исследуемой сыворотке антител к антигенам эритроцитов. Отсутствие агглютинации – исследуемая сыворотка не содержит антител к антигенам эритроцитов.

6. «Спин»-метод для оценки результатов прямого и непрямого антиглобулиновых тестов

В пробирке смешивают 1 объем 5%-ой взвеси отмытых сенсibilизированных эритроцитов и 2 объема антиглобулиновой сыворотки.

В качестве контроля в «спин»-методе используют: для непрямого антиглобулинового теста – смесь 1 объема отмытых эритроцитов и 2 объемов антиглобулиновой сыворотки; для прямого теста – смесь 1 объема отмытых эритроцитов и 2 объемов 0,9%-го раствора NaCl.

Опытную и контрольные пробирки центрифугируют 1 минуту при 1000 об/мин, встряхивают и визуально оценивают результаты исследования. Контроли должны быть всегда отрицательными и свидетельствовать о соб-

людении режима центрифугирования. При получении отрицательного результата в опытной пробирке — каплю исследуемой взвеси переносят на стекло и микроскопируют при малом увеличении.

Наличие агглютинации при визуальном или микроскопическом исследовании свидетельствует о содержании в исследуемой сыворотке антител к антигенам эритроцитов. Отсутствие агглютинации означает, что исследуемая сыворотка не содержит антител к антигенам эритроцитов.

III. ИССЛЕДОВАНИЕ СЫВОРОТКИ НА НАЛИЧИЕ НЕПОЛНЫХ РЕЗУС-АНТИТЕЛ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЖЕЛАТИНА

1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Кровь для приготовления эритроцитов берут не более, чем за 2-3 дня до исследования в количестве 3-5 мл в обычные пробирки без стабилизатора. Пробирки нумеруют и пишут на них фамилию, инициалы, группу крови и резус-принадлежность лица, от которого взята кровь. При этом обычно после свертывания крови на дне пробирки остается небольшое количество эритроцитов, которые и применяют для исследования. Эритроциты берут со дна пробирки пастеровской пипеткой или наконечником автоматической пипетки. Если при этом захватывается небольшое количество собственной сыворотки, это не влияет на ход реакции.

Если эритроцитов, оставшихся свободными после свертывания крови, недостаточно, то допускается интенсивное встряхивание сгустка для отделения дополнительного количества эритроцитов.

Можно брать кровь с цитратом натрия. В этом случае эритроциты необходимо отмыть изотоническим раствором NaCl.

Для установления титра антител эритроциты готовят *ex tempore*. В пробирку к 1 части эритроцитов добавляют 9 частей 10%-го раствора желатина, подогретого до разжижения. При этом получается 10%-ая взвесь эритроцитов в желатине.

2. Техника исследования

В штатив устанавливают тонкостенные пробирки высотой около 10 см, которые нумеруют. Число и нумерация пробирок должны соответствовать числу и нумерации образцов эритроцитов, с которыми исследуется сыворотка.

В пробирки в соответствии с их нумерацией вводят по 1 капле (0,05 мл) эритроцитов, приготовленных в качестве стандартов.

Во все пробирки прибавляют по 2 капли (0,1 мл) 10%-го раствора желатина, подогретого до разжижения (раствор желатина необходимо

тщательно просмотреть перед применением; при помутнении или появлении хлопьев, а также при потере свойства застудневать при температуре $+4 - +8^{\circ}\text{C}$ желатин не пригоден).

После этого во все пробирки вводят по 1-2 капли (0,1 мл) испытуемой сыворотки, пробирки встряхивают для перемешивания их содержимого и помещают в водяную баню при температуре $+46 - +48^{\circ}\text{C}$ на 20 минут или в суховоздушный термостат на 45 минут.

По извлечению из водяной бани в пробирки наливают по 5-8 мл изотонического раствора NaCl . Содержимое пробирок перемешивают путем одно-, двукратного перевертывания их и наблюдают результат в виде наличия или отсутствия агглютинации эритроцитов.

3. Трактовка результатов

Результат реакции просматривают на свет.

Содержимое пробирок, в которых при просмотре невооруженным глазом агглютинация не видна, необходимо микроскопировать.

Для этого каплю содержимого пробирки помещают с помощью стеклянной палочки на предметное стекло и просматривают под малым увеличением.

Наличие агглютинации в пробирках с образцами резус-положительных эритроцитов и отсутствие ее с резус-отрицательными и собственными эритроцитами указывает на содержание в испытуемой сыворотке неполных резус-антител.

Отсутствие агглютинации со всеми образцами эритроцитов указывает на то, что неполные резус-антитела анти-D, C, E, а также с и e – не выявлены.

4. Титрование сыворотки, содержащей неполные резус-антитела

В штатив устанавливают 10 пробирок с обозначениями: 1:2, 1:4, 1:8 и т.д. до 1:1024.

Во все пробирки вводят по 2 капли (0,1 мл) изотонического раствора NaCl .

В первую пробирку этой же пипеткой вводят 2 капли (0,1 мл) исследуемой сыворотки. Из первой пробирки после перемешивания 2 капли переносят во вторую, из второй – в третью, из третьей – в четвертую и так до последней пробирки, из которой 2 капли удаляют. В результате в пробирках получают разведения сывороток от 1:2 до 1:1024.

Во все пробирки добавляют по 2 капли стандартных резус-положительных эритроцитов или смеси эритроцитов, полученных от 4-5 резус-положительных лиц и приготовленных, как сказано выше, в виде 10%-ой взвеси в желатине.

Пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при температуре $+46 - +48^{\circ}\text{C}$ на 15 минут или в суховоздушный термостат на 30 минут.

По извлечению пробирок из водяной бани в них доливают по 5-8 мл изотонического раствора NaCl и наблюдают результат. Максимальное разведение, в котором наблюдается агглютинация, принимается за титр выявленных неполных резус-антител.

Если агглютинация эритроцитов наблюдается во всех разведениях сыворотки, то, следовательно, титр резус-антител выше 1:1024. В этих случаях следует продолжить разведение сыворотки и далее проводить исследование, как указано выше.

IV. ИССЛЕДОВАНИЕ СЫВОРОТКИ НА НАЛИЧИЕ НЕПОЛНЫХ АНТИТЕЛ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИГЛЮКИНА (В ПРОБИРКАХ БЕЗ ПОДОГРЕВА)

1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Кровь для приготовления эритроцитов берут не более чем за 2-3 дня до исследования в обычные пробирки. Пробирки нумеруют и пишут на них фамилию, инициалы, группу крови и резус-принадлежность лица, от которого взята кровь. Может быть использована любая кровь: непосредственно взятая из пальца, эритроциты из осадка в пробирке после образования свертка и консервированная, отмытая изотоническим раствором NaCl.

2. Техника исследования

В штатив устанавливают пробирки вместимостью 8-10 мл, которые нумеруют. Число и нумерация пробирок должны соответствовать числу и нумерации образцов эритроцитов, с которыми исследуется сыворотка.

Во все пробирки вводят по 2 капли исследуемой сыворотки.

Согласно нумерации в пробирки вводят по 1 капле стандартных эритроцитов.

Во все пробирки вводят по 1 капле 33%-го раствора полиглюкина.

Пробирки встряхивают для перемешивания их содержимого, затем наклоняют почти до горизонтального положения и медленно поворачивают по горизонтальной оси так, чтобы содержимое растекалось по их стенкам. Контакт эритроцитов с исследуемой сывороткой при поворачивании пробирок продолжают 5 минут.

Через 5 минут в пробирки наливают 3-4 мл изотонического раствора NaCl, осторожно перемешивают содержимое путем 2-3-кратного перевертывания пробирки (*не взбалтывать!*) и наблюдают результат в виде наличия или отсутствия агглютинации эритроцитов.

3. Трактовка результатов

Результаты просматривают на свет невооруженным глазом.

Наличие агглютинации в пробирках с образцами резус-положительных эритроцитов и отсутствие ее с резус-отрицательными и собственными эритроцитами указывает на содержание в исследуемой сыворотке резус-антител.

Отсутствие агглютинации со всеми образцами эритроцитов указывает на то, что неполные антитела анти-D, С, Е, а также с и е – не выявлены.

V. ИССЛЕДОВАНИЕ СЫВОРОТКИ НА НАЛИЧИЕ ПОЛНЫХ АНТИТЕЛ В РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ В СОЛЕВОЙ СРЕДЕ

1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Кровь для приготовления стандартных эритроцитов берут в количестве 1-2 мл (и более, смотря по потребности) в пробирки вместимостью 8-10 мл, содержащие изотонический раствор лимоннокислого натрия (из расчета 0,25 мл на 1 мл крови). Пробирки нумеруют и пишут на них фамилию и инициалы лица, от которого взята кровь.

После взятия крови в пробирки доливают доверху изотонический раствор NaCl, затем содержимое их перемешивают, центрифугируют и отсасывают надосадочную жидкость. Такое отмывание повторяют дважды.

Можно брать кровь и без стабилизатора. В этом случае 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 отмывтых эритроцитов готовят 2%-ую взвесь в других пробирках, взятых по числу образцов стандартных эритроцитов и так же пронумерованных.

Для приготовления 2%-ой взвеси в эти пробирки капают по 2,5 мл (49 капель) изотонического раствора NaCl и в каждую пробирку в соответствии с ее нумерацией переносят одну каплю эритроцитов. Содержимое пробирок перемешивают для получения равномерной 2%-ой взвеси эритроцитов, которая применяется для исследования сыворотки.

2. Техника исследования

В штатив устанавливают ряд маленьких пробирок (высотой 2-2,5 см с внутренним диаметром 0,5-0,6 см, с гладким дном округлой формы) по числу образцов эритроцитов, с которыми испытывается сыворотка. Предварительно

штатив покрывают листом бумаги, в котором накалывают отверстия, сквозь которые устанавливают пробирки. Против каждой пробирки на бумаге пишут порядковый номер, а также фамилию, инициалы, группу крови и резус-принадлежность лица, от которого взята кровь.

Вместо пробирок можно использовать планшеты для иммунологических реакций с лунками, имеющими закругленное дно.

Во все пробирки (лунки планшета) вводят по 1 капле (0,05 мл) испытуемой сыворотки и по 1 капле изотонического раствора NaCl.

Штатив с пробирками (планшет) встряхивают для перемешивания их содержимого.

В пробирки (лунки), согласно их нумерации и обозначению, вводят по 1 (0,05 мл) капле 2%-ой взвеси эритроцитов, приготовленных в качестве стандартов.

Содержимое снова перемешивают и штатив (планшет) помещают для инкубации в термостат при +37°C на 1 час и затем оставляют на столе при комнатной температуре на 2-3 часа.

После инкубации штатив с пробирками (планшет) вынимают и наблюдают результат по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов.

3. Трактовка результата

Результат реакции учитывают при помощи лупы с 6-8-кратным увеличением по форме осадка эритроцитов на дне пробирки (лунки) (см. «Инструкцию по определению резус-принадлежности крови методом агглютинации в солевой среде»).

Наличие агглютинации с резус-положительными образцами эритроцитов и отсутствие ее с резус-отрицательными и собственными эритроцитами указывают на присутствие в сыворотке полных резус-антител.

Отсутствие агглютинации со всеми образцами эритроцитов указывает на то, что полные резус антитела анти-D, C, E, а также с и e – не выявлены.

4. Титрование сыворотки, содержащей полные резус-антитела

В штатив устанавливают 10 маленьких пробирок для разведения сывороток 1:2, 1:4, 1:8 и т.д. до 1:1024. Можно использовать планшет для иммунологических реакций.

Во все пробирки (лунки) капают по 2 капли (0,1 мл) изотонического раствора NaCl.

В первую пробирку (лунку) (с обозначением 1:2) вводят 2 капли (0,1 мл) исследуемой сыворотки. После перемешивания из первой пробирки (лунки) переносят 2 капли во вторую, из второй – в третью и т.д. до послед-

ней, из которой 2 капли удаляют. В результате получают разведения сыворотки от 1:2 до 1:1024.

В каждую пробирку (лунку) добавляют по 1 капле (0,05 мл) 2%-ой взвеси стандартных эритроцитов или смеси, приготовленной от 4-5 резус-положительных лиц. Эритроциты для взвеси готовят, как сказано выше.

Содержимое пробирок перемешивают и штатив (планшет) помещают в термостат при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ на 1 час.

После инкубации штатив (планшет) вынимают из термостата и наблюдают результат.

Максимальное разведение, в котором наблюдается агглютинация, принимают за титр выявленных полных резус-антител.

Если агглютинация эритроцитов наблюдается во всех разведениях сыворотки, то, следовательно, титр резус-антител выше 1:1024. В таких случаях следует продолжить разведение сыворотки и далее проводить исследование, как указано выше.

VI. ФЕНОМЕН ЗОНЫ

При очень высокой степени иммунизации организма образующиеся резус-антитела иногда дают феномен зоны. Этот феномен заключается в том, что сыворотка крови таких лиц, будучи взята неразведенной или в небольшом разведении (1:2), может не дать или дать слабую положительную реакцию при ее испытании с резус-положительными эритроцитами. Однако, если такую сыворотку развести, то при некотором разведении (чаще всего 1:8, 1:16, иногда и более) резус-антитела в ней становятся активными и дают хорошо выраженную положительную реакцию. Реже всего феномен зоны бывает выражен в методе конгломинации с желатином или при испытании сыворотки непрямой пробой Кумбса. Поэтому, а также ввиду большей ее чувствительности, проба Кумбса является очень ценной реакцией для выявления неполных резус-антител.

Если все методы, включая непрямую пробу Кумбса, не выявляют в сыворотке резус-антител, а в анамнезе у лица, кровь которого испытывается, есть указания на сенсибилизацию к резус-антигену, то для исключения феномена зоны следует испытать эту сыворотку, взятую в разведениях. Для этого сыворотка разводится и испытывается, как указано для каждого метода в разделах «Титрование сыворотки».

Если при наблюдении результата в каких-либо разведениях сыворотки отмечается положительная реакция, следовательно, в испытываемой сыворотке есть антитела. В этих случаях для дальнейшего исследования сыворотки ее следует развести, при этом выбрать то разведение, в котором наблюдалась наиболее выраженная положительная реакция. Для разведения при исследовании применяют изотонический раствор NaCl. Исследование разведенной сы-

воротки проводится, как описано выше, для каждого метода. При установлении титра антител учитывается общее разведение нативной сыворотки, начиная с 1:2.

VII. СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ

Сыворотки, давшие положительный результат со всеми образцами резус-положительных эритроцитов, могут содержать как «чистые» антитела анти-D, так и одновременно антитела к нескольким антигенам: анти-C+D, анти-D+E или анти-C+D+E.

В некоторых случаях исследуемые сыворотки, содержащие резус-антитела, могут вызвать агглютинацию избирательно — не всех образцов резус-положительных эритроцитов. Это может быть связано с тем, что в испытуемой сыворотке имеются антитела: не часто встречающиеся анти-D, а анти-C, анти-E или анти-c.

Положительный результат может также наблюдаться и с резус-отрицательными эритроцитами за счет других антигенов системы Резус — с, е или антигенов других систем.

Для выяснения специфичности резус-антител необходимо специальное исследование сыворотки с набором стандартных эритроцитов, включающих редкие группы ccDee, CCDee, Ccddee, ccddEe, а также резус-отрицательные образцы (ccddee), включающие как содержащие, так и не содержащие антигены Келл (K) и Даффи (Fu). С ними же проводится и титрование сыворотки.

VIII. ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ЭРИТРОЦИТОВ В ГЕЛЕВОМ ТЕСТЕ МИКРОМЕТОДОМ (ID-КАРТЫ ДиаМед)

Идентификационные карты ID-ДиаМед предназначены для выявления антител к антигенам эритроцитов и установления их специфичности. Карты ID-ДиаМед можно использовать взамен или параллельно с:

- желатиновым методом;
- антиглобулиновым тестом (реакцией Кумбса);
- реакцией с применением полиглокина;
- методом в солевой среде.

Идентификационные карты ID-ДиаМед представляют собой пластиковые карточки, в которые встроено по шесть пробирок, содержащих гель сефадекс. В трех пробирках, расположенных слева, находится гель, содержащий антитела к глобулинам человека (моноспецифические анти-IgG или полиспецифические к иммуноглобулинам различных классов). Эти пробирки предназначены для выявления антител к антигенам эритроцитов в антиглобулиновом тесте (реакция Кумбса). В следующих трех пробирках содержится только нейтральный гель, предназначенный для выявления антител к антигенам эритроци-

тов в солевой среде (холодовых, солевых) или антител, активных в ферментном методе.

Исследуемые сыворотки и стандартные эритроциты для выявления антител добавляют в верхнюю часть пробирок. После инкубации и центрифугирования агглютинированные эритроциты остаются в верхней части пробирки, так как не проходят через гель из-за большого размера (положительный результат). Неагглютинированные эритроциты легко проходят через гель и оседают на дне пробирки (отрицательный результат). Характер агглютинации при выявлении антител к эритроцитам зависит от количества антител, их активности и оценивается от 4+ до +.

Подробная инструкция по применению прилагается к каждому набору идентификационных карт ID-ДиаМед фирмы «ДиаМед» (Швейцария), Скангель («Bio-Rad», США) или других производителей.

В настоящее время наряду с применением вышеуказанных методов можно использовать методы:

выявление аллоиммунных антител в микропланшетах Эритайп с нанесенными моноклональными антисыворотками компании «Biotest AG», Германия и других производителей;

карты универсальные серологические (с микроколонками) Сэллбайнд, компании «Sanquin Reagents», Голландия и других производителей. Подробная инструкция по применению прилагается к каждому набору используемых тест-систем.

IX. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заключение о наличии в сыворотке резус-антител можно сделать при положительном результате, полученном любым методом исследования.

Заключение об отсутствии в сыворотке резус-антител можно сделать только при отрицательном результате, полученном при исследовании не менее, чем двумя методами, одним из которых является любой метод, выявляющий неполные резус-антитела, а другим – реакция агглютинации в солевой среде, выявляющая полные резус-антитела. При этом следует учитывать возможный феномен зоны.