

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Р.А. Часнойть
13.11.2008 г.
Регистрационный № 116-1108

**УДАЛЕНИЕ ИЗ СЫВОРОТКИ АНТИРЕЗУС АНТИТЕЛ
ДРУГОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ**

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

В практической работе по определению резус-принадлежности крови наибольшее удобство представляет использование сывороток антирезус группы крови АВ(IV), не содержащих групповых агглютининов α и β (антитела анти-А, анти-В). Такие сыворотки являются универсальными, так как позволяют определять резус-принадлежность в крови любой группы по системе АВ0.

Сыворотки антирезус, принадлежащие к группам 0(I), А(II) и В(III), также могут быть превращены в универсальные путем абсорбции или нейтрализации в них групповых агглютининов α и β .

Помимо групповых агглютининов использованию сыворотки антирезус мешают также имеющиеся в отдельных случаях изоиммунные антитела другой специфичности, чаще всего анти-С и анти-Е. Если эти антитела имеют низкий титр, они могут быть удалены при помощи абсорбции или путем разведения сыворотки.

Использование универсальных сывороток антирезус упрощает работу и исключает получение ошибочных результатов из-за несоответствия сыворотки антирезус и исследуемых эритроцитов по другим групповым антигенам.

Для освобождения сыворотки антирезус от агглютининов α , β и от антител анти-С и анти-Е можно применять разные способы:

нейтрализацию групповых агглютининов α и β соответствующим групповым веществом, содержащимся в амниотической жидкости;

нейтрализацию групповых агглютининов α и β естественным групповым веществом А и В (фругломин А, фругломин В);

абсорбцию групповых агглютининов α и β резус-отрицательными эритроцитами, находящимися в сгустках крови после снятия с них сыворотки;

нейтрализацию групповых агглютининов α и β путем разведения сыворотки;

абсорбцию антител анти-С и анти-Е эритроцитами этой специфичности; нейтрализацию антител анти-С и анти-Е путем разведения сыворотки.

1. Использование амниотической жидкости для нейтрализации групповых агглютининов α и β *

Получение амниотической жидкости для использования ее при изготовлении сывороток антирезус

Амниотическую жидкость собирают в родильных домах от каждой роженицы отдельно в чистые флаконы. От одной роженицы может быть получено от 100 до 1500 мл.

* Амниотическая жидкость нейтрализует α и β антитела, относящиеся к классу IgM; неполные α и β антитела, относящиеся к классу IgG, при этом не нейтрализуются. Наличие агглютинации означает наличие в амниотической жидкости групповых агглютининов крови роженицы. Такой образец непригоден для работы

На этикетке флакона указывают фамилию роженицы, дату взятия, количество и, по возможности, группу крови новорожденного.

Дополнительно берут образец крови для обследования на маркеры вирусных инфекций.

Групповая принадлежность амниотической жидкости соответствует группе крови новорожденного.

Оплата за сбор амниотической жидкости производится учреждениями службы крови из средств на заготовку крови на договорной основе.

Нейтрализация групповых агглютининов α и β при помощи амниотической жидкости

Групповую принадлежность амниотической жидкости устанавливают путем определения групповой принадлежности крови новорожденного или методом истощения агглютининов α и β в гемагглютинирующей сыворотке группы 0(I). Для этого в пробирке смешивают равные объемы (по 1 мл) стандартной гемагглютинирующей сыворотки с титром 1:64 и испытуемой амниотической жидкости. Смесь перемешивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре. Затем смесь сыворотки и амниотической жидкости исследуют на плоскости со стандартными эритроцитами группы A(II) и B(III). Соотношение эритроцитов и смеси должно соответствовать примерно 1:10, экспозиция 5-7 минут.

Трактовка результатов:

наличие агглютинации в каплях с эритроцитами группы A (II) и группы B(III) указывает на отсутствие в амниотической жидкости групповых антигенов A и B, т. е. на принадлежность ее к группе 0(I). Такая амниотическая жидкость непригодна для нейтрализации групповых агглютининов;

отсутствие агглютинации в капле с эритроцитами группы A(II) и наличие агглютинации в капле с эритроцитами группы B (III) указывает на принадлежность амниотической жидкости к группе A(II);

отсутствие агглютинации в капле с эритроцитами группы B(III) и наличие ее с эритроцитами группы A(II) указывает на принадлежность амниотической жидкости к группе B(III);

отсутствие агглютинации в каплях, как с эритроцитами группы A(II), так и группы B(III), указывает на принадлежность амниотической жидкости к группе AB(IV).

Групповую принадлежность записывают на этикетке, которую наклеивают на флакон с амниотической жидкостью.

Контроль амниотической жидкости на специфичность

Следует учитывать возможность попадания в амниотическую жидкость крови роженицы, в связи с этим необходимо исследовать каждый образец амниотической жидкости на наличие групповых агглютининов.

Исследование амниотической жидкости с эритроцитами группы А(II) и В(III) проводится аналогично определению групповой принадлежности крови.

Фильтрация и консервирование амниотической жидкости

После определения групповой принадлежности и контроля на специфичность амниотическую жидкость фильтруют через обычный бумажный фильтр или под вакуумом через фарфоровую воронку Бюхнера, в которую помещают измельченную фильтровальную бумагу толщиной 5-7 мм. После фильтрации амниотическая жидкость становится прозрачной.

Консервирование производится борной кислотой из расчета 2 г на 100 мл или азидом натрия – 1 г на 1000 мл.

Срок хранения амниотической жидкости – 12 месяцев при +4 – +8°C.

Высушивание амниотической жидкости

С целью удлинения срока годности амниотическую жидкость высушивают по 150-250 мл во флаконах емкостью 250-500 мл. На флаконы наклеивают этикетки с указанием группы амниотической жидкости по системе АВ0, ее исходного количества и даты высушивания.

Высушенную амниотическую жидкость хранят при комнатной температуре. Срок годности – 5 лет.

Проведение нейтрализации групповых агглютининов

Амниотическая жидкость содержит растворенную групповую субстанцию, соответствующую группе крови плода. Она может быть использована как в нативном виде, так и предварительно высушенная и затем растворенная дистиллированной водой. Для нейтрализации агглютининов α и β в сыворотке антирезус группы $0\alpha\beta$ (I) используют амниотическую жидкость группы АВ(IV) или смесь образцов амниотической жидкости групп А(II) и В(III). Для нейтрализации агглютининов β в сыворотке группы А β (II) используют амниотическую жидкость группы В(III). Для нейтрализации агглютининов α в сыворотке антирезус группы В α (III) используют амниотическую жидкость группы А(II).

Для полного истощения групповых агглютининов в исходной сыворотке антирезус проводят подбор оптимального соотношения амниотической жидкости и нейтрализуемой сыворотки антирезус, для чего:

в штатив устанавливают пять пробирок с обозначениями 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, во все пробирки вносят по 2 капли амниотической жидкости – нативной или растворенной после высушивания;

в первую пробирку добавляют 4 капли нейтрализуемой сыворотки, во вторую - 6 капель, в третью - 8 капель, в четвертую - 10 капель, в пятую - 12 капель;

содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре;

после 10-ти минутной экспозиции смесь из каждой пробирки контролируют на плоскости по полноте нейтрализации со стандартными резус-отрицательными эритроцитами, содержащими антиген, соответствующий нейтрализуемым агглютинином;

последнее разведение, в котором отсутствует агглютинация (время наблюдения 5 минут), принимается за оптимальное соотношение амниотической жидкости и нейтрализуемой сыворотки;

если агглютинация отсутствует во всех разведениях, готовят разведения: 1:7, 1:8, 1:9 и продолжают исследование, как сказано выше;

после того, как выбрано оптимальное соотношение, к основному объему сыворотки антирезус добавляют соответствующее количество амниотической жидкости и перемешивают их. Через 10-20 минут после перемешивания вновь проверяют сыворотку на полноту абсорбции на плоскости с 6-8 образцами резус-отрицательных эритроцитов группы А(II) и В(III). Далее сыворотку исследуют и обрабатывают в соответствии с инструкцией по применению «Использование стандартных сывороток и универсального реагента антирезус для определения резус-принадлежности крови человека».

В целях упрощения получения универсальных сывороток из сывороток антирезус группы Аβ(II) и Βα(III) их можно предварительно смешивать, что позволяет нейтрализовать одновременно агглютинины α и β амниотической жидкостью группы АВ(IV) или смесью амниотической жидкости группы А(II) и группы В(III). Предварительное смешивание сыворотки противоположных групп целесообразно еще и потому, что при этом происходит частичная взаимная нейтрализация групповых агглютининов, что снижает количество амниотической жидкости, необходимое для полной нейтрализации, а, следовательно, снижается степень разведения абсорбируемой сыворотки.

Высушенную амниотическую жидкость перед употреблением разводят дистиллированной водой до исходного объема. После растворения используют аналогично нативной.

При низком титре сыворотки антирезус, ограничивающем ее разведение, для нейтрализации агглютининов целесообразно использовать сухой по-

рошок. К нейтрализации приступают с определения оптимального соотношения сыворотки антирезус и сухого порошка, полученного из амниотической жидкости, для чего:

в штатив устанавливают 4 пронумерованные пробирки, в которые вносят по 0,5 мл сыворотки антирезус;

в первую пробирку добавляют 2 мг высушенной амниотической жидкости, во вторую – 4 мг, в третью – 8 мг, а в четвертую – 16 мг. Содержимое пробирок перемешивают до полного растворения порошка и оставляют при комнатной температуре;

через 10 минут проводят испытание на плоскости на полноту нейтрализации с эритроцитами групп А(II) и В(III) и выбирают оптимальное соотношение ингредиентов;

выбранное соотношение используют для изготовления основного объема сыворотки;

Далее сыворотку исследуют и обрабатывают в соответствии с инструкцией по применению «Использование стандартных сывороток и универсального реагента антирезус для определения резус-принадлежности крови человека».

2. Нейтрализация групповых агглютининов α и β естественными групповыми веществами специфичности А и В (фруглюмином А и В)

Групповые специфические вещества А и В являются высокомолекулярными полисахаридами, изготавливаются в производственных условиях из слизистой оболочки свиных и лошадиных желудков путем их ферментативного переваривания с последующим осаждением и очисткой органическими растворителями. Количество группового специфического вещества, необходимого для нейтрализации антител в сыворотке, зависит от активности вещества. Для нейтрализации групповых агглютининов к сыворотке антирезус добавляют групповое специфическое вещество из расчета:

к 1000 мл сыворотки антирезус группы 0(I) – 0,1 г группового вещества А и 0,1 г группового вещества В;

к 1000 мл сыворотки антирезус группы А(II) – 0,1 г группового вещества В;

к 1000 мл сыворотки антирезус группы В(III) – 0,1 г группового вещества А.

Для растворения группового вещества необходимое его количество сначала растирается стеклянной палочкой в пробирке с небольшим количеством (1 мл) сыворотки антирезус, подогретой до $+37^{\circ}\text{C}$. Затем это групповое вещество переносят в общее количество сыворотки антирезус, тщательно многократно смывая его сывороткой. Сыворотку антирезус перемешивают с групповым веществом и помещают в термостат на 3 часа, перемешивая каждые 30 минут. После этого сыворотку помещают в холодильник при $+4^{\circ}\text{C}$ не менее, чем на трое суток, а затем исследуют на пластинке на содержание групповых

агглютининов с 6-8 образцами резус-отрицательной крови группы А(II) и В(III).

Отсутствие агглютинации означает, что групповые агглютинины полностью нейтрализованы. Наличие агглютинации означает неполную нейтрализацию групповых агглютининов. В случае неполной нейтрализации групповых агглютининов к сыворотке вновь добавляют такое же или большее (до 0,5 г) количество группового вещества и вся процедура повторяется.

При полной нейтрализации групповых агглютининов сыворотку исследуют и обрабатывают далее в соответствии с инструкцией по применению «Приготовление и использование стандартных сывороток и универсального реагента антирезус для определения резус-принадлежности крови человека».

3. Абсорбция групповых агглютининов резус-отрицательными эритроцитами на свертках крови группы АВ(IV)

Не отмые сгустки крови группы АВ(IV), оставшиеся после отсасывания сыворотки антирезус, допустимо хранить при $+4 - +8^{\circ}\text{C}$ в течение 1-2 суток.

Для абсорбции охлажденный сгусток измельчают при помощи стеклянной палочки и добавляют к нему также охлажденную сыворотку антирезус в количестве $1/6-1/3$ объема по отношению к объему, занимаемому измельченным свертком (к 300 мл свертка приливают 50-100 мл абсорбируемой сыворотки, в зависимости от активности групповых антител). Сыворотку тщательно смешивают со сгустком, оставляют на 18-20 часов при $+4 - +8^{\circ}\text{C}$, после чего отделяют от сгустка путем центрифугирования.

Далее сыворотку проверяют на плоскости с 6-8 образцами резус-отрицательных эритроцитов и, в случае полной абсорбции групповых агглютининов, обрабатывают и исследуют далее в соответствии с инструкцией «Приготовление и использование стандартных сывороток и реагента антирезус для определения резус-принадлежности крови человека».

4. Нейтрализация групповых агглютининов α и β при помощи разведения сыворотки

Для нейтрализации сыворотку антирезус разводят изотоническим раствором NaCl, специально подобранной сывороткой группы АВ(IV) или стандартным раствором для разведения. Нейтрализация групповых антител при помощи разведения возможна только лишь при большом различии титра групповых и резус-антител.

Например, если титр групповых антител 1:8, сыворотку следует развести не менее чем в 16 раз, что возможно только в том случае, если титр резус-антител в ней после разведения сохранится не ниже требований, предъявляемых к стандартной сыворотке антирезус.

агглютининов с 6-8 образцами резус-отрицательной крови группы А(II) и В(III).

Отсутствие агглютинации означает, что групповые агглютинины полностью нейтрализованы. Наличие агглютинации означает неполную нейтрализацию групповых агглютининов. В случае неполной нейтрализации групповых агглютининов к сыворотке вновь добавляют такое же или большее (до 0,5 г) количество группового вещества и вся процедура повторяется.

При полной нейтрализации групповых агглютининов сыворотку исследуют и обрабатывают далее в соответствии с инструкцией по применению «Приготовление и использование стандартных сывороток и универсального реагента антирезус для определения резус-принадлежности крови человека».

3. Абсорбция групповых агглютининов резус-отрицательными эритроцитами на свертках крови группы АВ(IV)

Не отмывые сгустки крови группы АВ(IV), оставшиеся после отсасывания сыворотки антирезус, допустимо хранить при $+4 - +8^{\circ}\text{C}$ в течение 1-2 суток.

Для абсорбции охлажденный сгусток измельчают при помощи стеклянной палочки и добавляют к нему также охлажденную сыворотку антирезус в количестве $1/6-1/3$ объема по отношению к объему, занимаемому измельченным свертком (к 300 мл свертка приливают 50-100 мл абсорбируемой сыворотки, в зависимости от активности групповых антител). Сыворотку тщательно смешивают со сгустком, оставляют на 18-20 часов при $+4 - +8^{\circ}\text{C}$, после чего отделяют от сгустка путем центрифугирования.

Далее сыворотку проверяют на плоскости с 6-8 образцами резус-отрицательных эритроцитов и, в случае полной абсорбции групповых агглютининов, обрабатывают и исследуют далее в соответствии с инструкцией «Приготовление и использование стандартных сывороток и реагента антирезус для определения резус-принадлежности крови человека».

4. Нейтрализация групповых агглютининов α и β при помощи разведения сыворотки

Для нейтрализации сыворотку антирезус разводят изотоническим раствором NaCl, специально подобранной сывороткой группы АВ(IV) или стандартным раствором для разведения. Нейтрализация групповых антител при помощи разведения возможна только лишь при большом различии титра групповых и резус-антител.

Например, если титр групповых антител 1:8, сыворотку следует развести не менее чем в 16 раз, что возможно только в том случае, если титр резус-антител в ней после разведения сохранится не ниже требований, предъявляемых к стандартной сыворотке антирезус.