

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Р.А. Часнойть
13.11.2008 г.
Регистрационный № 118-1108

**ВЫЯВЛЕНИЕ ИММУННЫХ АНТИ-А, АНТИ-В АНТИТЕЛ
К АНТИГЕНАМ ЭРИТРОЦИТОВ СИСТЕМЫ АВ0**

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

Антитела к эритроцитарным антигенам системы АВ0 — α и β — являются нормальными (естественными). Они относятся к полным антителам — агглютиниnam, хорошо реагируют в солевой среде, лучше выявляются при комнатной температуре и хуже — при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Добавление в реакцию коллоидных веществ не усиливает активности этих антител, непрямой пробой Кумбса их не выявляют.

Нормальные антитела α и β легко абсорбируются из сыворотки при добавлении группоспецифических веществ. Они чувствительны к воздействию высокой температуры: прогревания при $+70^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут достаточно, чтобы эти антитела полностью потеряли активность.

Кроме нормальных (естественных) антител α и β , у человека могут появиться еще иммунные антитела этой системы, которые были обозначены символами анти-А и анти-В.

Иммунные антитела не присутствуют регулярно в крови людей, но могут возникнуть вследствие изоиммунизации при парентеральном поступлении в организм несовместимого в групповом отношении антигена, при иногруппной беременности, при ошибочном переливании крови, несовместимой по системе АВ0, а также при проведении некоторых прививок и иммунизации.

При иногруппной беременности, послужившей причиной гемолитической болезни плода, иммунные антитела анти-А или анти-В почти всегда присутствуют в крови матери к моменту рождения больного ребенка. При этом им обычно сопутствует высокий титр нормальных антител α и β .

При ошибочном переливании несовместимой крови иммунные антитела анти-А или анти-В появляются обычно на 5-7 день, достигая максимума к 15-25 дню с последующим падением их титра.

В крови у таких больных одновременно повышается титр нормальных антител α и β на 3-8 ступеней, также с последующим снижением после 25-30 дня.

Иммунные антитела анти-А и анти-В могут быть как в полной, так и неполной форме. Они активны при $+37^{\circ}\text{C}$, могут иметь несколько более высокий титр при проведении реакции в коллоидной среде, по сравнению с солевой, и выявляться в непрямой пробе Кумбса. Иммунные антитела не абсорбируются при добавлении группоспецифической субстанции Витебского. Они стойки к температурному воздействию и сохраняют активность при прогревании сыворотки в течение 10 минут при температуре $+70^{\circ}\text{C}$, т.е. при условиях, при которых нормальные антитела α и β полностью инактивируются. Выявление изоиммунных антител может служить ценным диагностическим признаком, в частности, при решении вопроса о причинах гемотрансфузионных осложнений и гемолитической болезни новорожденных. Эти исследования рекомендуются для использования в практике. Наиболее

демонстративным отличием нормальных антител α и β от иммунных антител анти-А и анти-В является их поведение при воздействии высокой температуры. На этих различиях и основано применение разных методов для выявления нормальных антител α и β и изоиммунных антител анти-А и анти-В (см. разделы II-V). Активность иммунных антител проявляется в виде способности вызывать агглютинацию эритроцитов при проведении реакции в солевой среде или, как конечный результат, в непрямой пробе Кумбса.

Кроме этих антител, вследствие иммунизации, вызванной теми же причинами, могут одновременно образоваться гемолизины, которым свойственна также групповая специфичность.

I. Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

Для определения антител α , β и иммунных антител анти-А, анти-В требуются:

- стандартные эритроциты группы А(II) и В(III) или смесь эритроцитов от 5-6 доноров отдельно каждой группы;
- стандартная сыворотка для пробы Кумбса;
- изотонический раствор NaCl;
- пробирки центрифужные;
- пробирки маленькие высотой 2-2,5 см с внутренним диаметром 5-6 мм и с гладким дном округлой формы;
- пробирки высотой 4-10 см для пробы Кумбса;
- белые пластинки со смачиваемой поверхностью;
- штативы;
- термостат +37°C;
- центрифуга;
- водяная баня +70°C.

II. Определение полных иммунных антител к эритроцитарным антигенам системы АВ0 в реакции солевой агглютинации

1. Подготовительная работа

Стандартные эритроциты или смеси эритроцитов группы А(II) и В(III) дважды отмывают изотоническим раствором NaCl путем центрифугирования, после чего на дне пробирки остается эритроцитная масса, из которой приготавливают 2-3%-ую взвесь отдельно каждой группы.

Исследуемую сыворотку в количестве 0,5-1 мл разводят в четыре раза изотоническим раствором NaCl во избежание коагуляции при нагревании, затем разливают поровну в две пробирки, одну из которых прогревают в тече-

ние 10 минут при $+70^{\circ}\text{C}$, точно соблюдая температуру и время. Таким образом, получается две порции сыворотки – нативной и прогретой, каждая из которых разведена 1:4.

Определение антител начинается реакцией агглютинации в солевой среде в маленьких пробирках. Если в этом методе полных иммунных антител не обнаружено, исследование далее дополняют непрямой пробой Кумбса.

2. Техника реакции

При исследовании сыворотки группы А(II) или В(III) в штатив устанавливают в ряд 12 маленьких пробирок. При исследовании сыворотки группы 0(I) – два ряда по 12 пробирок. Штатив предварительно накрывают листом бумаги, в котором накалывают отверстия для установки пробирок. На бумаге надписывают фамилию и группу крови лица, чья сыворотка исследуется, группу крови стандартных эритроцитов и у каждой пробирки – степень разведения помещенной в нее сыворотки (1:4, 1:8, 1:16 и т.д. до 1:8000)*.

Во все пробирки каждого ряда, начиная со 2-ой пробирки, накапывают по 2 капли изотонического раствора NaCl. Затем в 1-ую и во 2-ую пробирки (каждого ряда) накапывают по 2 капли приготовленной непрогретой сыворотки, разведенной в 4 раза.

Во 2-ой пробирке каждого ряда сыворотку смешивают с изотоническим раствором NaCl и 2 капли этой смеси переносят в 3-ю пробирку, из 3-й, также после перемешивания – в 4-ую и т. д. до последней, из которой 2 капли удаляют. В результате в пробирках получается разведение сыворотки от 1:4 до 1:8000.

В другом штативе также готовят разведения предварительно прогретой сыворотки (при этом в штатив обычно достаточно поместить по 6 пробирок – разведение сыворотки от 1:4 до 1:128).

После приготовления разведений сыворотки во все пробирки добавляют по 1 капле 2-3%-ой взвеси стандартных эритроцитов противоположной группы: при исследовании сыворотки группы В(III) – эритроциты группы А(II), при исследовании сыворотки группы А(II) – эритроциты группы В(III) и при исследовании сыворотки группы 0(I) в один ряд пробирок добавляют эритроциты группы А(II), в другой ряд – эритроциты группы В(III).

Содержимое пробирок тщательно перемешивают, после чего штативы оставляют в покое на 1 час: с нативной сывороткой – при комнатной температуре, с прогретой сывороткой – при $+37^{\circ}\text{C}$.

*Вместо пробирок можно использовать планшеты для иммунологических реакций с круглодонными лунками

3. Трактовка результатов

Результат оценивают по форме осадка эритроцитов на дне пробирки, просматривая его через лупу с 6-8 кратным увеличением над источником света.

При наличии агглютинации осадок располагается в виде комочков неравномерным слоем с изогнутыми, иногда завернутыми внутрь краями. При отсутствии агглютинации осадок эритроцитов располагается равномерным слоем в центре дна пробирки в виде правильно очерченного круга. Результаты отмечают на бумаге у каждой пробирки знаком плюс (+) или минус (-).

Наличие агглютинации свидетельствует о присутствии полных антител, а максимальное разведение, в котором оно наблюдается, – об их титре.

Титр антител нативной (непрогретой) сыворотки относится к агглютинациям α или β , титр антител в прогретой сыворотке – к иммунным антителам анти-А или анти-В. В том случае, если агглютинация наблюдается во всех пробирках, следует повторить исследование, продолжив разведение сыворотки.

Отрицательный результат во всех пробирках с прогретой сывороткой говорит об отсутствии иммунных антител полной формы.

III. Определение неполных изоиммунных антител к эритроцитарным антигенам системы АВ0 в непрямой пробе Кумбса

1. Подготовительная работа

Стандартные эритроциты или смеси эритроцитов группы А(II) и В(III) дважды отмывают изотоническим раствором NaCl, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используют для исследования.

2. Техника реакции

При исследовании сыворотки группы А(II) или В (III) в штатив устанавливают 6 пробирок, при исследовании сыворотки группы 0(I) – два ряда по 6 пробирок. Пробирки нумеруют. Штатив предварительно накрывают листом бумаги, в котором накалывают отверстия для установки пробирок. На бумаге делают обозначения, указав у каждой пробирки ее номер и другие сведения, как сказано выше для реакции солевой агглютинации.

Во все пробирки, начиная с пробирки №2, накапывают по 3 капли изотонического раствора NaCl, а затем в пробирки №1 и №2 – по 3 капли исследуемой, предварительно прогретой сыворотки и далее приготавливают ее разведения, как это указано выше для метода солевой агглютинации, но в объеме трех капель.

Во все пробирки пастеровской пипеткой или наконечником автоматической пипетки добавляют по 1 капле (0,01 мл) эритроцитов противоположной группы, смешивают сыворотку с эритроцитами, и штатив помещают для инкубации в термостат на 45 минут при +37°C. За это время иммунные антитела, если они есть в сыворотке, фиксируются на эритроцитах.

После инкубации отмывают эритроциты, для чего в пробирки доливают изотонический раствор NaCl, перемешивают их содержимое и центрифугируют. Надосадочную жидкость удаляют. Такое отмывание повторяют три раза.

После отмывания в каждую пробирку добавляют 3-5 капель изотонического раствора NaCl для получения приблизительно 5%-ой взвеси эритроцитов и из каждой пробирки по одной капле такой взвеси переносят на белую пластинку со смачиваемой поверхностью, пронумеровав предварительно места на пластинке соответственно номерам пробирок. К каждой капле прибавляют по 1 капле сыворотки для пробы Кумбса и перемешивают их стеклянной палочкой. Далее в течение 10 минут наблюдают результат при периодическом покачивании пластинки.

Результат оценивают по наличию или отсутствию агглютинации, видимой простым глазом на белом фоне пластинки. Наступление агглютинации обозначают на бумаге у каждой пробирки знаком плюс (+) с указанием времени ее появления в минутах и секундах. Отсутствие агглютинации обозначают знаком минус (-).

Наличие агглютинации свидетельствует о присутствии иммунных антител анти-А или анти-В неполной формы, а максимальное разведение, в котором оно наблюдается – об их титре*.

Отрицательный результат во всех пробирках свидетельствует об отсутствии иммунных антител неполной формы в данной порции исследуемой сыворотки.

В том случае, если агглютинация наблюдается во всех пробирках, следует повторить исследование, продолжив разведение сыворотки.

3. Трактовка результатов

В ходе вышеописанного исследования определяют три вида антител: нормальные полные антитела – агглютинины α и β (термолабильные); иммунные полные антитела анти-А и анти-В (термостабильные); иммунные неполные антитела анти-А и анти-В (термостабильные).

*Контроль в отношении возможного ложно-положительного результата за счет активных полных антител не требуется, т.к. в данном случае непрямая проба Кумбса ставится как дополнение только при отрицательном результате реакции в солевой среде

Общее заключение делается на основании сопоставления результатов всех исследований:

наличие иммунных (термостабильных) антител полной или неполной формы свидетельствует об имевшем место поступлении в организм человека антигена, несовместимого по АВ0 системе. Титр полных (термолабильных) антител α и β редко превышает такие показатели, как 1:8 – для иммунных полных антител и 1:32 – для иммунных неполных антител;

высокий титр нормальных полных антител – агглютининов α и β (α выше, чем 1:256 и β выше, чем 1:128 при данном методе исследования) даже при отсутствии иммунных термостабильных антител в момент исследования, отражает состояние повышенной сенсibilизации организма и позволяет сделать предположение о бывшем в предшествующее время поступлении антигена, несовместимого по системе АВ0;

отсутствие иммунных термостабильных антител анти-А и анти-В при титре нормальных антител α не выше, чем 1:256 и β не выше, чем 1:128 (при данном методе исследования) говорит об отсутствии у человека изоиммунизации групповыми факторами системы АВ0 к моменту данного исследования.

IV. Выявление иммунных (IgG) анти-А, анти-В антител с использованием унитиола

1. Характеристика метода

Выявление IgG антител к антигенам эритроцитов системы АВ0 затруднено из-за одновременного присутствия в сыворотке естественных изоагглютининов, относящихся к классу IgM. В данном методе иммунные IgG анти-А, анти-В антитела выявляются после полного разрушения унитиолом естественных IgM антител системы антигенов эритроцитов АВ0.

Для инактивации IgM используют сульфидредуцент, разрушающий дисульфидные связи в молекулах иммуноглобулинов, 5%-ый раствор унитиола (2,3-димеркаптопропансульфонат Na). Выявление IgG анти-А, анти-В затем проводится прямой агглютинацией с эритроцитами А и В при комнатной температуре.

Метод пригоден для дифференциальной диагностики IgG и IgM антител к антигенам эритроцитов любой специфичности в сыворотке крови человека, молоке, а также моноклональных антителах.

2. Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

5%-ый раствор унитиола;

моноклональные антитела анти-D супер IgM;
стандартные эритроциты групп крови А, В, а также эритроциты
0(I) резус-положительной принадлежности;
раствор NaCl 0,9%-ый;
термостат лабораторный на +37°C;
планшеты с белой смачиваемой поверхностью;
пробирки вместимостью 5-10 мл;
пипетки;
штативы;
палочки аппликаторы;
часы (секундомер);
перчатки резиновые хирургические.

3. Порядок проведения исследования

Для приготовления рабочего раствора 2,5%-го унитиола используют 5%-ый раствор унитиола (готовая лекарственная форма), который разводят раствором NaCl 0,9%-ый в соотношении 1:1.

В сухой чистой пробирке смешать равные объемы исследуемой сыворотки и 2,5%-го раствора унитиола – опыт.

Во второй пробирке смешать равные объемы моноклональных антител анти-D супер IgM и 2,5%-го раствора унитиола – контроль.

Все пробирки инкубировать 24 часа при комнатной температуре (не ниже +16°C) или в термостате при +37°C в течение 2 часов. При использовании для разрушения IgM антител 5%-го раствора унитиола инкубацию сывороток в термостате сокращают до 1 часа.

Сыворотки после обработки раствором унитиола исследуют в тесте прямой агглютинации с эритроцитами А и/или В в условиях, аналогичных исследованию естественных изогемагглютининов на плоскости без подогрева или в пробирках с использованием центрифугирования.

Для контроля используют эритроциты группы крови 0(I) резус-положительной принадлежности.

4. Трактовка результатов

Сыворотки, инкубированные с раствором унитиола и сохранившие способность агглютинировать эритроциты групп А и/или В, содержат анти-А или анти-В антитела класса IgG – положительный результат.

Отрицательный результат свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце IgG антител к антигенам эритроцитов, при этом сыворотки утрачивают способность агглютинировать эритроциты групп А и/или В.

Результат в контрольной пробе должен быть всегда отрицательным, что свидетельствует о разрушении антител класса IgM в моноклональных антителах анти-D и эффективности действия унитиола.

Для установления титра IgG антител производят последовательное разведение сывороток, бывших в контакте с унитиолом. За титр принимают величину, обратную наибольшему разведению, в котором отчетливо видна агглютинация со стандартными эритроцитами групп А и/или В. Время наблюдения за реакцией – 5 минут при проведении исследования на плоскости без подогрева.

5. Условия хранения и эксплуатации

Срок хранения вскрытой ампулы 5%-го раствора унитиола не должен превышать 5 дней при хранении в холодильнике ($t +2^{\circ} - +8^{\circ}\text{C}$).

V. Определение гемолизинов системы АВ0

1. Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

стандартные эритроциты группы 0(I), А (II) и В(III);
изотонический раствор NaCl;
пробирки вместимостью 8-10 мл;
маленькие пробирки высотой 4-5 см, диаметром 0,8-1,0 см;
штативы;
термостат $+37^{\circ}\text{C}$;
центрифуга.

2. Подготовительная работа

Стандартные эритроциты групп 0(I), А(II) и В(III), а также эритроциты исследуемого лица дважды отмывают изотоническим раствором NaCl путем центрифугирования и готовят из них 5%-ую взвесь в изотоническом растворе NaCl.

Сыворотку для исследования используют со сроком хранения не более 48 часов при температуре $+4 - +8^{\circ}\text{C}$.

В предварительно пронумерованных 5 пробирках вместимостью 8-10 мл готовят разведения исследуемой сыворотки в изотоническом растворе NaCl, начиная от 1:2 до 1:32, в объемах 2-3 мл.

3. Техника реакции

В штатив устанавливают по 5 маленьких пробирок: три ряда при исследовании сыворотки группы А(II) или В(III) или четыре ряда – при исследовании сыворотки группы 0(I). Пробирки нумеруют одинаково во всех рядах соответственно нумерации пробирок с исходными разведениями сыворотки.

Штатив предварительно накрывают листом бумаги, в котором накалывают отверстия для установки пробирок. На бумаге надписывают фамилию и группу крови лица, чья сыворотка исследуется, группу крови стандартных эритроцитов и степень разведения помещенной в пробирках сыворотки (1:2 – 1:32).

Исследуемую сыворотку из исходных разведений переносят соответственно номерам по 5 капель в маленькие пробирки так, чтобы во всех первых номерах было разведение 1:2, во вторых – 1:4 и т. д. до 1:32.

Затем во все пробирки добавляют по 1 капле 5%-ой взвеси эритроцитов: в первый (контрольный) ряд пробирок вводят эритроциты лица, сыворотка которого исследуется; во второй (также контрольный) ряд – эритроциты группы 0(I); в третий ряд вводят эритроциты противоположной группы, т. е. группы В(III), если исследуется сыворотка группы А(II) или группы А(II), если исследуется сыворотка группы В(III). При исследовании сыворотки группы 0(I) в третий ряд вводят эритроциты группы А(II), а в четвертый ряд – эритроциты группы В(III).

Содержимое пробирок тщательно перемешивают путем встряхивания и штатив помещают в термостат на 45 минут при температуре +37°C, затем пробирки вынимают из термостата и просматривают результат реакции невооруженным глазом в проходящем свете.

4. Трактовка результатов определения групповых гемолизинов

В ходе исследования определяется наличие или отсутствие групповых гемолизинов анти-А и анти-В.

Результаты оценивают по соотношению количества сохранившихся эритроцитов в осадке и степени гемолиза, т.е. интенсивности окрашивания надосадочной жидкости:

если эритроциты полностью сохранились в осадке, а надосадочная жидкость прозрачна и бесцветна, это значит, что групповые гемолизины отсутствуют (обозначают знаком минус (-));

если осадок эритроцитов частично сохранился, а надосадочная жидкость прозрачна и окрашена в красный цвет разной интенсивности

(иногда только небольшим слоем над осадком эритроцитов) – это значит, что в исследуемой сыворотке содержатся групповые гемолизины различной степени активности (обозначают знаками от одного плюса (+) до трех плюсов (+++);

если осадок эритроцитов отсутствует, а вся жидкость окрашена в ярко-красный цвет и прозрачна, это значит, что в исследуемой сыворотке содержатся групповые гемолизины, что оценивается на четыре плюса (++++);

наличие гемолиза эритроцитов свидетельствует о присутствии в исследуемой сыворотке гемолизинов, а максимальное разведение, в котором он наблюдается – об их активности (титре). В том случае, если гемолиз эритроцитов произошел во всех пробирках, исследование следует повторить, продолжив разведение сыворотки, для установления конечного разведения, в котором еще наблюдается гемолиз.

Результаты учитывают как истинные, т.е. относящиеся к гемолизинам анти-А и анти-В, только при отсутствии гемолиза в двух контрольных рядах.

При наличии гемолиза не только с эритроцитами противоположной группы, но и в контрольных рядах – исследование повторяют. При подтверждении результатов реакции следует решать вопрос о природе обнаруженных гемолизинов с учетом характера заболевания и других показателей.