

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**АЛМАТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ  
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ**

**Методические рекомендации  
по использованию моноклональных антител  
в иммуногематологических исследованиях крови  
доноров и реципиентов**

**АЛМАТЫ 2022**

**УДК 57.083.1 (072)**  
**ББК 52.64я 73**  
**М 54**

**Рецензенты: Заведующий кафедрой клинико-диагностической лаборатории  
кандидат медицинских наук Макашев Ж.К.  
Ассистент кафедры детской хирургии КазНМУ им. С.Д.Асфендиярова  
кандидат медицинских наук Сепбаева А.Д.**

Надиров Ж.К., Бекиров Д.С., Каражигитова З.Б., Аманкулова Ш.К., Митерев Г.Ю., Оловникова Н.И. -  
Методические рекомендации по использованию моноклональных антител в иммуногематологических  
исследованиях доноров и реципиентов - Алматы, 2010 -23 с.

Методические рекомендации содержат сведения об антигенах эритроцитов различных систем,  
методах определения группы крови и резус-принадлежности, предупреждении возможных ошибок  
при исследовании.

Приведен перечень реагентов с полной характеристикой и правилами хранения.

Методические рекомендации предназначены для врачей-лаборантов Центров крови и лечебно-  
профилактических учреждений, студентов высших и средних специальных учебных заведений.

© Надиров Ж.К.  
Бекиров Д.С.  
Каражигитова З.Б.  
Аманкулова Ш.К.  
Оловникова Н.И.  
Митерев Г.Ю.

**Методические рекомендации рассмотрены и утверждены к изданию Центральным  
методическим советом Алматинского Государственного института усовершенствования врачей.  
Протокол № 1 от « 04 » февраля 2022г.**

## **ОГЛАВЛЕНИЕ**

АНТИГЕНЫ ЭРИТРОЦИТОВ	2
СИСТЕМА АВ0	4
ВАРИАНТЫ АНТИГЕНА А И В	6
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ АВ0	8
ПРИЧИНЫ ОШИБОК ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ	10
СИСТЕМА РЕЗУС И ВАРИАНТЫ АНТИГЕНА D	12
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ	13
ДРУГИЕ СИСТЕМЫ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА	18
ВХОДНОЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ	21
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	22

Определение группы крови и резус принадлежности, типирование антигенов эритроцитов человека имеют большое значение при проведении гемотрансфузий для профилактики наиболее опасных для жизни реципиентов посттрансфузионных осложнений гемолитического типа.

### **АНТИГЕНЫ ЭРИТРОЦИТОВ**

Антигены эритроцитов человека являются структурными образованиями, расположенными на внешней поверхности мембраны эритроцитов, обладающими способностью взаимодействовать с соответствующими антителами и образовывать комплекс антиген-антитело. Часть антигена, непосредственно взаимодействующая с антителом, называется антигенной детерминантой. Одна молекула антигена может содержать одну или несколько антигенных детерминант.

По химической природе антигены эритроцитов являются протеинами, гликопротеинами или гликолипидами. Клиническое значение многочисленных антигенов эритроцитов крови человека различно. Оно определяется иммуногенностью антигенов и способностью аллоантител к данным антигенам вызывать разрушение эритроцитов в организме реципиентов. В этой связи первостепенное клиническое значение имеют антигены систем АВО и Резус. Однако другие антигены эритроцитов также могут вызвать иммунизацию реципиента, что в дальнейшем приводит к посттрансфузионным осложнениям. *Поэтому изучение антигенного профиля эритроцитов (фенотипирование) донора и выявление возможной аллосенсибилизации реципиента (скрининг и идентификация антител) имеют первостепенное значение в трансфузиологии.* Согласно Приказу МЗ РК от 22 сентября 2005 года № 464 «О правилах медицинского обследования доноров» определение группы крови и резус принадлежности проводится дважды. Также образцы крови доноров должны типироваться по антигенам Келл, С, Е (приказ ДЗ г. Алматы «О порядке иммуногематологических исследований в медицинских организациях»).

При попадании в организм антигена, отсутствующего у данного индивида, создаются предпосылки для выработки антител и развития аллосенсибилизации. Синтез антител может наблюдаться в ответ на гемотрансфузии или беременность.

Свойство антигенов взаимодействовать со специфическими антителами используется для диагностики антигенов и антител *in vitro* (взаимодействие антигенов и антител вне организма). При этом их взаимодействие проявляется в виде реакции агглютинации эритроцитов антителами и появлении агрегатов эритроцитов.

*Итак, антигены эритроцитов:*

- Являются структурными и функциональными компонентами мембраны эритроцитов;
- Наследуются от родителей и передаются по наследству;
- Обладают иммуногенностью (вызывают выработку антител);
- Взаимодействуют с антителами, образуя комплекс антиген-антитело.

Международное общество переливания крови (ISBT) в 1980 году на конгрессе в Монреале организовало группу из ведущих специалистов в области иммуногематологии по разработке и упорядочению систем антигенов эритроцитов, результаты работы которой позволили ввести следующую систематизацию:

Все антигены эритроцитов принадлежат к одной из трех категорий:

- Системе антигенов эритроцитов
- Коллекции антигенов эритроцитов
- Серии антигенов эритроцитов

**Коллекции** содержат антигены, которые биохимически и серологически связаны на уровне фенотипа, но не отвечают требованиям, предъявляемым к системам

антигенов в отношении общности генов, кодирующих их продукцию. Известно 5 коллекций, содержащих 11 антигенов.

**Серии** антигенов включают антигены, для которых не изучены гены их кодирующие, они представлены двумя группами: антигенами низкой частоты встречаемости и антигенами высокой частоты встречаемости. К редко встречающимся антигенам относят 37 антигенов, распространенность которых в популяции не превышает 1%. Часто встречающиеся антигены насчитывают 14 антигенов, распространенность составляет более 90%.

Новая номенклатура антигенов эритроцитов призвана усовершенствовать, а не отменить существующую терминологию групп крови. Эта работа проводится по настоящее время.

Основным признаком, объединяющим антигены эритроцитов в **систему**, является общность контролирующих их генов. Каждый антиген, принадлежащий к системе группы крови, обозначается шестизначным номером: первые три цифры соответствует номеру системы, вторые три цифры - специфичности антигена внутри системы.

Современная классификация включает следующие **системы группы крови**:

Таблица 1.

Системы групп крови человека				
№ по классификации ISBT	Название системы	Официальная аббревиатура	Характеристика	Хромосомная локализация
001	<u>ABO</u>	ABO	Углевод (терминальные сахара N-цетилгалактозамин и галактоза).	<u>9</u>
002	<u>MNS</u>	MNS	GPA / GPB (гликофорины A и B). Основные антигены M, N, S, s.	<u>4</u>
003	<u>P</u>	P1	Гликолипид.	<u>22</u>
004	<u>Резус</u>	RH	Протеины. Основные антигены C, c, D, E, e (символ "d" свидетельствует об отсутствии D).	<u>1</u>
005	<u>Lutheran</u>	LU	Протеин (относиться к суперсемейству иммуноглобулинов).	<u>19</u>
006	<u>Kell</u>	KEL	Гликопротеин.	<u>7</u>
007	<u>Lewis</u>	LE	Углевод (фукоза).	<u>19</u>
008	<u>Duffy</u>	FY	Протеин (рецептор хемокинов).	<u>1</u>
009	<u>Кидд</u>	JK	Протеин (транспортер мочевины). Основные антигены - Jk <sup>a</sup> и Jk <sup>b</sup> .	<u>1</u>
010	<u>Diego</u>	DI	Гликопротеин (band 3, AE 1) или обмен анионов).	<u>17</u>
011	<u>Yt or Cartwright</u>	YT	Протеин (AChE, ацетилхолинэстераза).	<u>7</u>
012	<u>XG</u>	XG	Гликопротеин.	<u>X</u>

013	<u>Scianna</u>	SC	Гликопротеин.	<u>1</u>
014	<u>Dombrock</u>	DO	Гликопротеин (прикреплен к клеточной мембране с помощью гликозил-фосфадитил-инозитола GPI).	<u>12</u>
015	<u>Colton</u>	CO	Аквапорин 1	<u>7</u>
016	<u>Landsteiner-Wiener</u>	LW	Протеин (относится к суперсемейству иммуноглобулинов).	<u>19</u>
017	<u>Chido/Rodgers</u>	CH/RG	Компоненты системы комплемента C4A и C4B	<u>6</u>
018	<u>Hh</u>	H	Углевод (фукоза).	<u>19</u>
019	<u>Kx</u>	XK	Гликопротеин.	<u>X</u>
020	<u>Gerbich</u>	GE	GPC / GPD (Гликофорины C и D).	<u>2</u>
021	<u>Cromer</u>	CROM	Гликопротеин (DAF или CD55).	<u>1</u>
022	<u>Knops</u>	KN	Гликопротеин (CR1 или CD35).	<u>1</u>
023	<u>Indian</u>	IN	Гликопротеин (CD44).	<u>11</u>
024	<u>Ok</u>	OK	Гликопротеин (CD147).	<u>19</u>
025	<u>Raph</u>	MER2	Трансмембранный гликопротеин.	<u>11</u>
026	<u>JMH</u>	JMH	Протеин (прикреплен к клеточной мембране с помощью GPI).	<u>6</u>
027	Ii	I	Разветвленный (I) / неразветвленный(i) полисахарид.	<u>6</u>
028	Globoside	P	Гликолипид.	<u>3</u>
029	GIL	GIL	Аквапорин 3.	<u>9</u>

Трансфизиологическое значение имеют те антигены, которые обладают высокой иммуногенностью и встречаются у значительной части населения, что создает предпосылки несовместимых трансфузий. Особое место занимает система антигенов АВО, поскольку антитела анти-А и анти-В являются природными и присутствуют в крови без иммунизации. Антитела к антигенам эритроцитов других систем не являются врожденными и вырабатываются вследствие антигенной стимуляции.

### ***СИСТЕМА АВО***

В 1900 году К. Landsteiner открыл систему групп крови АВО, что положило начало развитию методов рутинного типирования крови. Агглютинация, которая происходила только в определенных комбинациях сывороток и эритроцитов, позволила разделить все образцы исследованной крови на 3 группы, которые теперь называются А, В и О.



Предсказанная К. Landsteiner 4-ая группы крови была открыта в 1902 г. его учениками Decastello и Sturli и названа АВ.

Характерной особенностью, отличающей систему антигенов эритроцитов АВО от других систем антигенов, является постоянное присутствие в сыворотках людей (кроме лиц с группой крови АВ) антител, направленных к антигенам А или В (таблица 2).

Правило Ландштейнера: ***В организме человека антиген группы крови (агглютиноген) и антитела к нему (агглютинины) никогда не существуют вместе.***

Группоспецифические антигены А и В генетически обусловлены. Ферменты гликозилтрансферазы А и В формируют соответствующие антигены А и В, используя в качестве субстрата субстанцию Н, которая является их общим предшественником. Гликозилтрансфераза О не активна.

Возможны 6 комбинаций аллельных антигенов ОО, АО, АА, ВО, ВВ, АВ. Фенотипически различают четыре группы крови, т. к. гетерозиготные (АО, ВО) и гомозиготные (АА, ВВ) варианты причисляются к одной группе крови, поскольку не различаются по иммуносерологическим свойствам. Например: генотип АА, АО - фенотип А(II).

**Таблица 2.**

**Основные антигены и антитела,  
определяющие групповую принадлежность крови по системе АВО**

Группа крови	Антигены (агглютиногены)	Антитела (агглютинины)
О (I)	0	$\alpha$ и $\beta$ (анти-А, анти-В)
А(II)	А	$\beta$ (анти-В)
В(III)	В	$\alpha$ (анти-А)
АВ(IV)	А и В	нет

Фенотипически различают четыре группы крови, т. к. гетеро- и гомозиготные варианты причисляются к одной группе крови, поскольку не различаются по иммуносерологическим свойствами.

Группа крови в течение всей жизни не меняется.  
Лица первой группы крови всегда гомозиготны (ОО).  
Лица четвертой группы, содержащие антиген АВ, всегда гетерозиготны.  
Лица второй и третьей группы могут быть как гомозиготны АА и ВВ, так и гетерозиготны — АО и ВО.

### **ВАРИАНТЫ АНТИГЕНА А И В**

При выявлении антигенов системы АВО стандартными сыворотками существуют определенные трудности, связанные с модификациями данных детерминант. Наиболее гетерогенным является антиген А.

В 1911 году установлено, что существует 2 подгруппы А антигена: А1 и А2. Среди европейцев 80% индивидов, принадлежащих к группе крови А, имеют подгруппу А1, остальные 20% принадлежат к А2-подгруппе. Различия между А1 и А2 антигенами являются качественными и количественными. Количественные различия зависят от процентного содержания антигенов Н и А на эритроцитах индивида.

Структура антигенов А1 и А2 также различна. Сыворотка некоторых А2 и А2В лиц может содержать анти-А1 агглютинины, однако никогда анти-А2 агглютинины не встречаются у А1 лиц.

В 1956 году описана А3 подгруппа антигена А. А3 образцы реагируют очень слабо с анти-А антителами. Существует еще несколько подгрупп антигена А: Am, Ax, Aend, Ael. Это очень редкие и слабые варианты данного антигена. Частота встречаемости таких вариантов антигена А в европейской популяции составляет 1:50000 исследований, в других расах чаще.

Эритроциты, несущие слабые варианты антигена А, гораздо активнее агглютинируются анти-Н антителами, чем эритроциты А1 и А2.

При определении группы крови многие эритроциты со слабыми вариантами А антигена первоначально типировались как эритроциты группы 0, но с отсутствием анти-А антител в сыворотке. Повторное исследование, проведенное с высокоактивными анти-А и анти-АВ сыворотками, показало наличие на эритроцитах вариантов антигена А.

При определении группы крови АВО характер агглютинации эритроцитов, содержащих варианты антигена А, зависит от вида и качества используемых реактивов. Панель моноклональных реагентов позволяет не только выявлять слабые разновидности антигена А, но и проводить четкую дифференциацию между А1 и А2.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-А** надежно выявляет антигены А1 и А2, причем в большинстве случаев возможно по силе агглютинации четко различить эти антигены (в образцах АВ(IV) группы А2В агглютинация слабее и часто неполная). Однако для достоверной дифференциации антигенов А1 и А2 рекомендуется использовать препараты **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-А1** или **ЭРИТРОТЕСТ™ Анти-А1 Лектин**, которые позволяют четко различить А1 и А2 подгруппы, так как реагируют только с А1 эритроцитами. Активным компонентом **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-А** являются моноклональные антитела класса IgM, секретируемые мышинными гибридами. Выявляемые антигены: А1, А2, А3.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-А** выпускается в двух вариантах – F и R. Варианты отличаются составом: они содержат моноклональные антитела с одинаковой специфичностью и активностью, но от разных гибридов. Тестирование крови одновременно двумя вариантами (сериями) **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНОВ Анти-А** позволяет получать гарантировано достоверные результаты и избегать параллельного тестирования с изогемагглютинирующими сыворотками.

Форма выпуска: жидкий препарат, готовый к употреблению. Фасовка: пластиковые флаконы-капельницы и стеклянные флаконы емкостью 2, 5 и 10 мл.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-Асл** — реагент, разработанный для определения слабых вариантов А-антигена, активным компонентом которого являются моноклональные антитела класса IgM, секретируемые мышинной гибридомой. Реагент дает одинаковую агглютинацию с А1 и А2 эритроцитами. Более слабая, но четкая агглютинация отмечается с эритроцитами А3, Ax и других слабых вариантов А-антигена. Предназначен для уточнения группы крови в случаях расхождения результатов перекрестного определения групп системы АВО.



**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-А1** — моноклональные антитела, разработанные для дифференциации А1 и более слабых форм антигена А по силе агглютинации. Активным компонентом являются моноклональные антитела класса IgM, секретируемые мышью гибридомой. Реагент вызывает полную агглютинацию эритроцитов А1 и А1 В. С эритроцитами, содержащими А2 или более слабые формы А антигена ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-А1 не реагирует. Реагент предназначен для проведения теста в пробирках.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-А1 Лектин** — реагент, применяемый для дифференциации А1 и более слабых форм А антигена по силе агглютинации, активным компонентом является лектин *Dolichus biflorus*. Реагент вызывает полную агглютинацию эритроцитов А1 и А1В. С эритроцитами, содержащими А2 или более слабые формы А антигена, ЭРИТРО-ТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-А1 не реагирует, но в отдельных случаях может давать неполную мелкозернистую агглютинацию (таблица 3).

**Таблица 3.**

**Специфичность ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНов  
в отношении вариантов антигена А**

ЭРИТРОТЕСТ- ЦОЛИКЛОНЫ	Варианты антигена А			
	А1	А2	А3	Ах
Анти-А	Сильная агглютинация	вариабельная агглютинация в группе А2В	+/-	0
Анти-А1 и Анти- А1 Лектин	Сильная агглютинация	0	0	0
Анти-Асл	Сильная агглютинация	Сильная агглютинация	вариабельная аггл.	слабая аггл.

Таким образом, разработанная панель анти-А реагентов серии ЭРИТРОТЕСТ позволяет очень детально проанализировать варианты антигена А в клинической практике.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-В** надежно выявляет антиген В, включая его слабые варианты. Слабые формы В антигена В3, Вх, Вw, Вm крайне редки среди населения Европы и чаще встречаются среди населения Китая.

Активным компонентом ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНа Анти-В являются моноклональные антитела класса IgM, секретируемые мышью гибридомой.

ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-В выпускается в двух вариантах – F и R. Варианты отличаются составом: они содержат моноклональные антитела с одинаковой специфичностью и активностью, но от разных гибридом. Тестирование крови одновременно двумя вариантами (сериями) ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНов Анти-В позволяет получать гарантировано достоверные результаты и избегать параллельного тестирования с изогемагглютинирующими сыворотками.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-АВ** - реагент, представляющий собой смесь реагентов Анти-А и Анти-В. Может быть использован как дополнительный контроль при АВО-типировании. Активным компонентом являются моноклональные антитела класса IgM, секретируемые тремя мышьяными гибридомами.

Существует редкий фенотип эритроцитов, который наследуется и характеризуется отсутствием антигенов Н и АВО, фенотип Бомбей. В сыворотке таких лиц содержатся анти-Н антитела.

Частота распространения групп крови по данным Городского центра крови г.Алматы за 2008 год показана в таблице 4. Обследованные доноры – жители г.Алматы и Алматинской области.

**Таблица 4.**

**Частота распространения групп крови  
(по данным Городского центра крови г.Алматы,  
Аманкулова Ш.К. 2008г. )**

Группа крови	Частота распространенности проведено исследований - 9929	
	количество	в%
<b>О (I)</b>	3363	33,8
<b>А(II)</b>	3072	30,9
<b>В(III)</b>	2626	26,4
<b>АВ(IV)</b>	867	8,7

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ АВО

Определение группы крови по системе АВО производится:

1) в **реакции прямой агглютинации** со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками, содержащими полные антитела против антигенов А и В, или реагентами на основе моноклональных антител;

2) **перекрестным методом** – параллельное определение анти-А, анти-В антител в исследуемой сыворотке со стандартными эритроцитами А, В, О и антигенов эритроцитов с помощью изогемагглютинирующих сывороток или реагентов с моноклональными антителами.

В Республике Казахстан применяются преимущественно поликлональные (происходящие из различных клонов антителообразующих клеток) реагенты: изогемагглютинирующие сыворотки АВО и универсальный анти-резус реагент.

В связи с низкой активностью, нестандартностью и холодным характером природных антител поликлональные диагностикумы уже давно вышли из употребления во всем мире. Их использование часто приводит к ошибкам в типировании групп крови. Ошибочные определения групп крови АВО по Е.Б. Жибурту за 2000 год приведены в таблице 5.

Таблица 5.

### Ошибочные определения групп крови АВО (Е.Б.Жибурт 2000г.)

Группа крови	Поликлональные антитела (33 154 исследования)		Моноклональные антитела (18 559 исследований)	
	количество	%	количество	%
<b>О(I)</b>	34	0,10	8	0,04
<b>А(II)</b>	17	0,05	9	0,05
<b>В(III)</b>	43	0,13	14	0,07
<b>АВ(IV)</b>	28	0,08	4	0,02
<b>Всего</b>	122	0,38	35	0,01

### *Определение группы крови реакцией прямой агглютинации с использованием Цоликлонов*

Определение проводится в помещении с хорошим освещением на пластине или специальном планшете при температуре +15+25°С. Для исследования используют эритроцитосодержащие препараты: цельная кровь, эритроцитарная масса, отмытые эритроциты, эритроциты в плазме, сыворотке, физиологическом растворе.

Достаточно одной серии каждого реагента, если используется реагент анти-АВ, являющийся дополнительным контролем достоверности определения групп крови АВО реагентами анти-А и анти-В.

*Оснащение:*

- Цоликлоны анти-АВ, анти-А, анти-В;
- раствор натрия хлорида 0,9%;
- пластинки со смачиваемой поверхностью;
- пипетки;
- стеклянные или пластмассовые палочки.

*Порядок проведения исследования:*

1. Промаркировать секции на пластинке или планшете, указав Ф.И.О. исследуемого лица и специфичность реагента.
2. Нанести по одной большой капле (около 0,1 мл) каждого реагента: анти-А, анти-В и анти-АВ.
3. Нанести по 1 маленькой капле (около 0,03 мл) исследуемой крови (эритроцитов) рядом с каждым реагентом.
4. Смешать отдельными чистыми стеклянными палочками каждую каплю крови (эритроцитов) с соответствующим реагентом.
5. Мягко покачивать пластинку. Несмотря на то, что при использовании Цоликлонов четкая агглютинация наступает уже в первые секунды, результаты реакции учитывают через 3 минуты после окончания смешивания, чтобы не пропустить слабые варианты антигенов.
6. Записать результаты реакции немедленно после определения (таблица 6).

Таблица 6.

**Интерпретация результатов реакции агглютинации эритроцитов  
моноклональными антителами**

Результат* реакции с реагентом			Принадлежность исследуемой крови к группе
Анти-А	Анти-В	Анти-АВ	
-	-	-	<b>О</b>
+	-	+	<b>А</b>
-	+	+	<b>В</b>
+	+	+	<b>АВ</b>

\*Знаком плюс обозначено наличие агглютинации, знаком минус – отсутствие

При наличии агглютинации со всеми тремя Цоликлонами анти-А, анти-В анти-АВ необходимо исключить неспецифическую агглютинацию исследуемых эритроцитов. Для контроля смешивают на плоскости одну каплю исследуемой крови или эритроцитов с каплей физиологического раствора натрия хлорида. Заключение о принадлежности исследуемой крови к АВ группе крови делают при отсутствии агглютинации эритроцитов в физиологическом растворе (Рис. 2).

Рисунок 2









**Наличие или отсутствие агглютинации эритроцитов  
при добавлении реагентов**



В случае слабой или поздней (свыше 3 минут) агглютинации с реагентами анти-А, анти-АВ необходимо подтвердить наличие «слабых» вариантов антигена А. Для определения разновидностей антигена А используются дополнительные реагенты: **Цоликлоны Анти-А1 и Анти-А слабый**. Эти реагенты раскапывают на соответственно промаркированный планшет как и при определении группы крови прямой реакцией и интерпретируют результаты через 3 минуты так, как показано в таблице 7.

Таблица 7.

## Результат определения группы крови прямой реакцией

Исследуемая кровь принадлежит к группе	Анти – А1	Анти – А слабый
А (II)		
AB (IV)		
A2 (II)		
A2B (IV)		

**Определение анти-А, анти-В антител в сыворотке  
со стандартными эритроцитами**

*Оснащение:*

- стандартные эритроциты 0, А, В;
- раствор натрия хлорида 0,9%;
- пластинки со смачиваемой поверхностью;
- пипетки;
- стеклянные или пластмассовые палочки.

*Порядок проведения исследования:*

1. Промаркировать лунки на пластинке или планшете, указав Ф.И.О. исследуемого лица и группы стандартных эритроцитов.
2. Раскапать по одной капле (0,01мл) стандартных эритроцитов соответственно маркировке и добавить по 0,1мл исследуемой сыворотки в каждую лунку.
3. Тщательно смешать и выдержать при комнатной температуре в течение 5 минут.
4. Записать результат исследования и сопоставить с результатами определения группы крови по Цоликлонам (таблица 6 и 8).

Таблица 8.

## Интерпретация результатов выявления анти-А, анти-В антител

Результат реакции исследуемой сыворотки с эритроцитами			Сыворотка содержит антитела	Исследуемая кровь принадлежит к группе
А	В	О		
+	+	-	анти-А, анти-В	О
-	+	-	анти-В	А
+	-	-	анти-А	В
-	-	-	нет	AB

**ПРИЧИНЫ ОШИБОК ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ  
ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ**

Ошибки в типировании антигенов эритроцитов системы АВО могут быть обусловлены техническими погрешностями, недостаточно высоким качеством применяемых реактивов и индивидуальными особенностями исследуемой крови.

### ***Технические ошибки.***

Наиболее частой причиной технических ошибок являются:

- неправильная маркировка пробирок с кровью, взятой на исследование (перепутывание пробирок от разных индивидов);
- ошибочный порядок нанесения агглютинирующих сывороток и цоликлонов на пластинку;
- неправильная регистрация результатов исследования;
- нарушение техники исследования, в том числе:
  - неправильное соотношение сыворотки и исследуемых эритроцитов;
  - использование сывороток с истекшим сроком годности;
  - сокращение времени наблюдения за реакцией;
  - проведение исследования при температуре окружающей среды выше 25°C, что может приводить к ложноотрицательной реакции.

### ***Ошибки, обусловленные недостаточно высоким качеством реактивов, применяемых для определения групп крови.***

Низкая активность (авидность) антител изогемагглютинирующих сывороток в отношении антигенов может приводить к ложноотрицательному результату при выявлении антигенов и неправильному заключению о групповой принадлежности исследуемой крови. Кроме того, узкий спектр специфичности анти-А антител в некоторых сериях изогемагглютинирующих сыворотках, взаимодействующих не со всеми вариантами антигена А, обуславливает отсутствие агглютинации с некоторыми образцами исследуемых эритроцитов, содержащих антиген А. Требования к качеству типизирующих реактивов изложены в инструкциях по их изготовлению, а также дополнены и рассмотрены ниже.

### ***Ошибки, обусловленные индивидуальными особенностями антигенов эритроцитов АВО:***

- слабые формы антигена А (чаще) или В. Сыворотка содержит экстраагглютинины (например анти-А1 у лиц А2 и А2В) или, наоборот, в ней отсутствуют ожидаемые агглютинины (отсутствие анти-А у лиц Ах). Необходимо провести повторное исследование эритроцитов, используя другие серии реагентов и другую лабораторную посуду. Целесообразно несколько раз отмыть исследуемые эритроциты и увеличить время регистрации реакции до 5 мин. Если при повторном определении результаты не совпали, такая кровь должна быть направлена на исследование в специализированную серологическую лабораторию.

- полиагглютинабельность эритроцитов, когда все АВО реагенты вызывают одинаковую агглютинацию. В этом случае необходимо проверить, происходит ли агглютинация исследуемых эритроцитов в стандартной сыворотке АВ (IV) группы (если типирование осуществлялось иммунными сыворотками) или в физиологическом растворе (если использовали моноклональные реагенты). Обычно полиагглютинацию удается устранить повторным отмыванием эритроцитов.

- образование «монетных столбиков» может быть принято за агглютинацию. В этом случае при добавлении 1-2 капель раствора натрия хлорида 0,9% и покачивании пластинки ложная агглютинация обычно исчезает.

- смешанная агглютинация (кровяная химера), когда часть эритроцитов собраны в агглютинаты, а остальные остаются свободными. Наиболее часто это наблюдается у больных групп А(II), В(III) или АВ(IV) в течение 1-3 месяцев после переливания им больших объемов крови группы 0(1) или после трансплантации иногруппного костного мозга, реже — у разногруппных близнецов. Тщательный анамнез быстро выявляет такую ситуацию.

- сенсibilизированные антителами и/или комплементом эритроциты при гемолитической болезни новорожденных, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях.

Такие эритроциты могут агглютинироваться иммунными сыворотками. Повторите определение с моноклональными реагентами, поставьте прямую пробу Кумбса.

***Ошибки, обусловленные аномальными свойствами исследуемой сыворотки:***

- стандартные эритроциты в присутствии исследуемой сыворотки образуют монетные столбики, что может быть принято за положительный результат. Добавление 1-2 капель раствора натрия хлорида 0,9% в пробирку и мягкое покачивание обычно разрушает монетные столбики, но не истинные агглютинаты. Подтвердите аномальный результат реакции, повторив ее со стандартными эритроцитами группы 0(I).

- в сыворотке отсутствуют анти-А или анти-В антитела, что наблюдается у новорожденных, а также у пациентов с тяжелыми нарушениями иммунной системы. Заключение о группе крови делается по результатам исследования антигенов эритроцитов.

- в сыворотке присутствуют антитела другой специфичности или экстраагглютинины (например анти-А1 у людей со слабым А2 антигеном). При невозможности определить специфичность антител и подобрать типированные эритроциты проба на совместимость является в таких случаях единственным критерием для подбора крови.

### ***СИСТЕМА РЕЗУС***

Система резус - одна из наиболее комплексных систем групп крови, объединяющая более 40 антигенов, которые наследуются и не меняются в течение всей жизни. Антигены системы резус, имеющие наибольшее клиническое значение — D, C, E, c, e.

В 1939 г. Левин и Стэтсон (Levine and Stetson) обнаружили антитела к ранее неизвестному антигену в крови женщины, ребенок которой погиб от гемолитической анемии. В 1940 году Landsteiner и Wiener, иммунизируя кроликов эритроцитами макаки-резус, получили иммунные сыворотки, которые агглютинировали не только эритроциты обезьян макака-резус, но также эритроциты 85 % обследованных жителей Нью-Йорка, относящихся к белой расе. Было показано, что антитела, описанные в этих разных исследованиях, обладают одинаковой специфичностью. Новый антиген позднее был назван Rh(D)-фактор. В том же году Wiener и Peters установили, что анти-RhD антитела появляются в сыворотке некоторых больных, которым ранее переливали АВО-совместимую кровь, и что эти антитела могут служить причиной посттрансфузионных осложнений. Вскоре были открыты еще 4 основные антителы системы резус (C, c, E, e), генетически сцепленные с антигеном D.

Эритроциты всех людей принято разделять по наличию в фенотипе антигена D на резус-положительные D(+) и резус-отрицательные D(-).

При оценке резус-принадлежности доноров к резус-положительным причисляют всех лиц, эритроциты которых содержат хотя бы один из антигенов D C и E. Резус-отрицательными называют только доноров, эритроциты которых не содержат ни одного из данных антигенов, т.е. только доноров с фенотипом ddcsee.

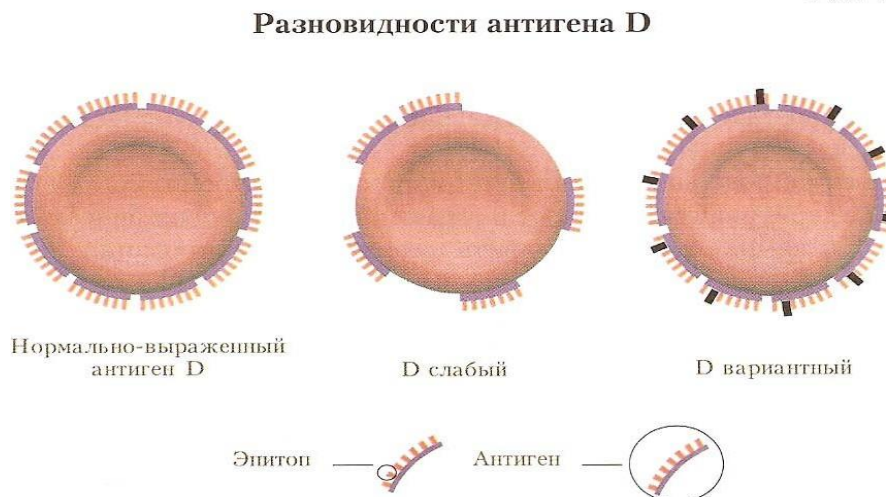
Частота встречаемости резус-положительных лиц различна в разных популяциях и колеблется от 0% среди коренного населения Австралии до 35% у басков. По данным Городского центра крови г.Алматы частота встречаемости резус-отрицательных лиц составляет 7,5%.

### ***ВАРИАНТЫ АНТИГЕНА D***

Характерной чертой антигенов системы резус является полиморфизм, что обуславливает наличие большого количества разновидностей антигенов. Согласно современному представлению, антиген D имеет несколько эпитопов. Чаще всего эритроциты экспрессируют все эпитопы антигена D (нормально выраженный D антиген). Антиген D, генетически утративший часть эпитопов, обозначают термином D вариантный, или частичный (D-partial). Полноценный антиген D, но с пониженной экспрессией, называют D слабый (D weak) (Рис. 3).

Нет четких данных об иммуногенности D вариантного и слабого антигенов. Однако, при наличии анти-D антител к сыворотки больного, реакция на введение эритроцитов с вариантным и слабым антигеном D не менее опасна, чем на обычные резус-положительные эритроциты. Поэтому во избежание посттрансфузионных осложнений и возможной сенсбилизации кровь такого донора считается резус-положительной.

Рисунок 3



### **МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ**

Резус-принадлежность определяется в реакции агглютинации с помощью моноклональных реагентов или аллоиммунных анти-резус сывороток. Метод определения зависит от класса антител в реагенте: если в нем присутствуют полные антитела (класса IgM), то реагент используется для определения резус фактора методом прямой агглютинации в солевой среде; если в нем содержатся неполные антитела (класса IgG), то он используется в непрямом антиглобулиновом тесте, в реакции агглютинации в присутствии высокомолекулярных усилителей (альбумина, желатина и др.), или с эритроцитами, обработанными протеолитическими ферментами.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНЫ** для определения резус-принадлежности предназначены для типирования крови по всем антигенам системы резус (D, C, c, E, e). Комбинированное использование **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНОВ Анти-D** гарантирует надежное выявление даже самых слабых форм антигена.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-D СУПЕР** содержит полные (IgM) анти-D антитела. Уверенно определяет D антиген в реакции прямой гемагглютинации на плоскости, в пробирочном тесте, в автоматизированных системах и т.д. **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-D СУПЕР** абсолютно специфичен, а содержащиеся в нем антитела имеют высокий титр и avidность (поликлональные сыворотки резус-отрицательных иммунных доноров очень редко содержат антитела такого класса, причем в титрах, существенно более низких по сравнению с **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНОМ Анти-D СУПЕР**). Специальные добавки обеспечивают стерильность препарата, его стабильность и высокую активность в реакции гемагглютинации на плоскости. Отсутствие в составе препарата высокомолекулярных добавок, которые сами по себе могут вызывать неспецифическую агглютинацию эритроцитов, устраняет необходимость проведения контроля с растворителем.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-D** содержит неполные анти-D IgG антитела, которые не способны вызывать прямую агглютинацию резус-положительных эритроцитов, поэтому реагент может быть использован только в непрямом антиглобулиновом тесте (реакции Кумбса), в тестах с белково-коллоидными неспецифическими усилителями (желатином, альбумином, декстраном и др.) или с эритроцитами, обработанными протеолитическими ферментами. Резус-типирование неполными антителами более трудоемко, однако слабые формы D-антигена (D<sub>u</sub>) могут быть определены только антителами IgG-класса. Поэтому **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-D IgG** создан специально для определения всех форм D антигена, включая самые слабые ( в т.ч. DVI).

Как известно, лица с группой крови DVI рассматриваются как резус-положительные, если они являются донорами, и как резус-отрицательные, если они являются реципиентами. Поэтому DVI антиген необходимо определять только у доноров, причем только у тех, которые были определены как резус-отрицательные в прямой агглютинации с ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНОМ Анти-D СУПЕР. Так как типирование доноров осуществляется на станциях переливания крови или в отделениях переливания крови, обладающих всеми возможностями для проведения реакции с неполными антителами, ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-D IgG рекомендуется для использования, главным образом, в этих специализированных подразделениях.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНЫ Анти-С СУПЕР И Анти-Е СУПЕР** содержат полные (IgM) анти-С и анти-Е антитела и выявляют антиген С и антиген Е системы резус, соответственно, в реакции прямой агглютинации на плоскости, в пробирках или в микроплате. Моноклональные антитела, входящие в состав ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНов Анти-С СУПЕР и Анти-Е СУПЕР, обладают высокой авидностью, высоким титром и не дают перекрестных реакций. Специальные добавки обеспечивают стерильность препаратов, их стабильность и повышенную активность в реакции гемагглютинации на плоскости. Реагенты не содержат антител других специфичностей и не требуют проведения контроля растворителя.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-С<sup>w</sup> СУПЕР** содержит полные (IgM) анти-С<sup>w</sup>. Реагент выявляет антиген С<sup>w</sup> системы резус в реакции прямой агглютинации на плоскости, в пробирках или в микроплате. Моноклональные антитела, входящие в состав ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНа Анти-С<sup>w</sup> СУПЕР, обладают высокой авидностью, высоким титром, и не дают перекрестных реакций. Специальные добавки обеспечивают стерильность препаратов, их стабильность и повышенную активность в реакции гемагглютинации на плоскости. Реагент не содержит антител других специфичностей и не требует проведения контроля растворителя.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-СЕ СУПЕР** содержит моноклональные полные (IgM) анти-С и анти-Е антитела и выявляет С и Е антигены системы резус в реакции прямой агглютинации на плоскости. Реагент можно использовать при тестировании D-отрицательной крови доноров для выявления dCe и dcE фенотипов вместо двух Цоликлонов: анти-С Супер и Анти-Е Супер. Использование Цоликлона Анти-СЕ дает возможность более экономичного определения резус-принадлежности донора, когда не требуется подробного исследования резус-фенотипа крови.

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-с СУПЕР и Анти-е СУПЕР** содержат моноклональные полные (IgM) анти-с и анти-е антитела, соответственно. Реагенты позволяют выявлять на эритроцитах антигены системы резус с и е, соответственно, в простых реакциях с нативными эритроцитами: в реакции прямой агглютинации на плоскости или в пробирочном тесте. Моноклональные антитела, входящие в состав препаратов, обладают высокой авидностью и не дают перекрестных реакций.

Независимо от используемого метода определения резус-принадлежности, обязательно проведение следующих контролей:

1. со стандартными резус-положительными эритроцитами;
2. со стандартными резус-отрицательными эритроцитами.

### ***Определение Rh-фактора реакцией прямой агглютинации на плоскости при помощи Цоликлона анти-D Супер***

*Оснащение:*

- Цоликлон Анти-D Супер (моноклональный реагент Цоликлон анти-D Супер предназначен для выявления D антигена системы резус в эритроцитах человека);
- планшеты или пластинки со смачиваемой поверхностью;
- раствор натрия хлорида 0,9%;
- стеклянная палочка.

*Порядок проведения исследования:*

1. Нанести большую каплю (около 0,1 мл.) реагента анти-D Супер на пластинку или планшет.
2. Нанести рядом маленькую каплю (около 0,03 мл.) исследуемой крови (эритроцитов).
3. Тщательно смешать реагент с кровью чистой стеклянной палочкой.
4. Через 10-20 секунд мягко покачать пластинку. Несмотря на то, что четкая агглютинация наступает в первые 30 секунд, результат учитывается через 3 минуты после смешивания.
5. Записать результаты реакции немедленно после определения.



#### *Трактовка результата:*

При наличии агглютинации исследуемая кровь маркируется как резус-положительная. Если агглютинация отсутствует, исследуемая кровь маркируется как резус-отрицательная.

Аналогично проводится типирование по другим антигенам: С, Е, с, е (метод указан в инструкции к реагентам).

При подозрении на наличие D слабого антигена проводится непрямая проба Кумбса с сывороткой анти-D.

### ***Определение резус-принадлежности крови реакцией с применением желатина***

#### *Оснащение:*

- сыворотка анти-D (IgG) с неполными антителами — две серии;
- 10% раствор желатина (предварительно прогретого до разжижения);
- стандартные эритроциты Rh<sup>+</sup> и rh<sup>-</sup> для контроля;
- пробирки объемом 10 мл;
- водяная баня +46—48°C или термостат;
- раствор натрия хлорида 0,9%;
- лупа с 2—4-х кратным увеличением.

#### *Порядок проведения исследования:*

1. Взять три пробирки объемом не менее 10 мл, надписать Ф И. О. исследуемого лица или номер образца крови донора.

2. В пробирку 1 добавить одну каплю сыворотки антирезус одной серии. В пробирку 2 добавить одну каплю сыворотки антирезус второй серии.

3. Пробирка 3 служит контролем специфичности на каждое исследование, и сыворотка антирезус в нее не добавляется.

4. Во все пробирки добавить по одной капле исследуемой крови и по две капли 10% раствора желатина. Содержимое пробирок перемешать встряхиванием. Пробирки поместить в водяную баню (+46—48°C) на 15 минут или в суховоздушный шкаф при той же температуре на 30—45 минут.

5. По истечении времени пробирки достать, в каждую налить по 5—8 мл раствора натрия хлорида 0,9% и перемешать содержимое путем двух-трехкратного перевертывания пробирок.

6. Пробирки просмотреть на свет невооруженным глазом или через лупу.

#### *Трактовка результатов:*

Результат трактуют по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов.

Положительный результат в пробирке различимы агглютинаты в виде красных комочков на прозрачном, почти бесцветном фоне жидкости.

Отрицательный результат в пробирке видна равномерно окрашенная слегка опалесцирующая жидкость.

Результаты исследования разными сериями сыворотки антирезус должны совпадать, и учитываются истинными при отрицательном контроле в пробирке 3.

### ***Техника определения Rh-фактора с помощью стандартного универсального антирезус Rh(D) реагента в пробирке без подогрева***

#### *Оснащение:*

- стандартный универсальный антирезус реагент Rh(D);
- пробирки;
- пипетки;
- изотонический раствор NaCl.

#### *Порядок проведения исследования:*

1. На дно пробирки внести 2 капли (0,1 мл.) стандартного универсального антирезус Rh(D) реагента;

2. Добавить 1 каплю (0,05 мл.) исследуемой крови.

3. Содержимое пробирки перемешать встряхиванием и затем медленно покачивать, наклоняя пробирку почти до горизонтали таким образом, чтобы содержимое растекалось по ее стенкам. Такое размазывание крови по стенкам пробирки делает реакцию более выраженной.

4. Реакцию следует проводить не менее 3-х минут для образования устойчивого комплекса антиген-антитело и четко выраженной агглютинации.

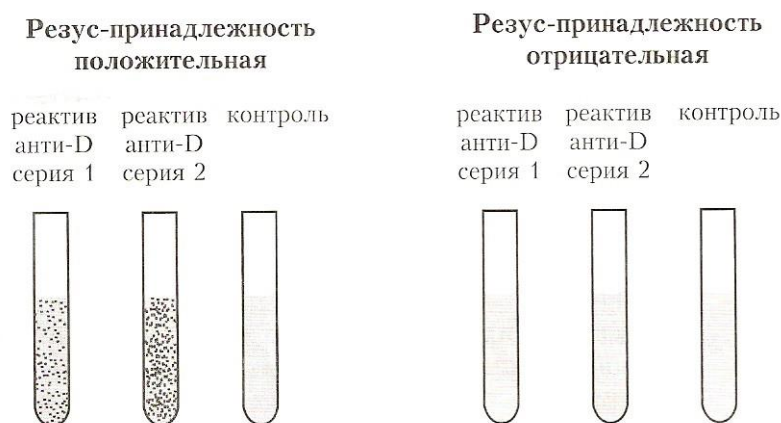
5. Затем в пробирку добавить 5-8 мл. изотонического раствора NaCl и перемешать (не взбалтывая!), путем 2 - 3 кратного перевертывания пробирки.

6. Просматривать в проходящем свете невооруженным глазом и с помощью 2-х кратной лупы.

*Трактовка результата:*

Наличие агглютинации в виде крупных хлопьев из эритроцитов на фоне просветленной жидкости указывает на резус-положительную принадлежность исследуемой крови (Rh +).

Отсутствие агглютинации (в пробирке гомогенно окрашенная жидкость) указывает на резус-отрицательную принадлежность крови (Rh -).



### ***Непрямой антиглобулиновый тест (непрямая проба Кумбса) с помощью неполных анти-D антител***

*Оснащение:*

- пробирки;
- пипетки;
- изотонический раствор NaCl;
- раствор низкой ионной силы (LISS);
- анти-D моноклональный реагент или иммунная анти-D сыворотка;
- антиглобулиновый реагент.

*Порядок проведения исследования:*

1. Приготовьте 2-5% взвесь трижды отмытых в 0,9% растворе натрия хлорида исследуемых эритроцитов. Для этого поместите в пробирку 5 капель (около 0,25 мл) исследуемой крови, трижды отмойте в 5-10 мл 0,9% раствора натрия хлорида, суспендируйте осадок эритроцитов в 2-3 мл 0,9% раствора натрия хлорида или, предпочтительнее, в 2-3 мл раствора низкой ионной силы (LISS), в котором фиксация антител на эритроцитах прочнее и происходит быстрее, чем в физиологическом растворе.

2. Внесите 1 каплю анти-D реагента в чистую маркированную пробирку.

3. Добавьте 1 каплю приготовленной 2-5% взвеси эритроцитов (пункт 1).

4. Инкубируйте смесь при 37° 30-45 минут (если эритроциты в физиологическом растворе) или 10-15 минут (если эритроциты в LISS).

5. Отмойте эритроциты 1 раз (в случае использования моноклонального реагента) или 3 раза (в случае использования иммунной анти-D сыворотки) большим объемом (5-10 мл) 0,9% раствора натрия хлорида.

Однократная отмывка допустима только при использовании моноклональных реагентов. Полностью удалите физиологический раствор.

6. Далее 1 каплю (0,05 мл) взвеси эритроцитов на фарфоровую пластинку, добавляют 1 каплю (0,05 мл) антиглобулиновой сыворотки и перемешивают стеклянной палочкой. Пластинку периодически покачивают в течение 5 минут.

7. Визуально определите наличие агглютинации.

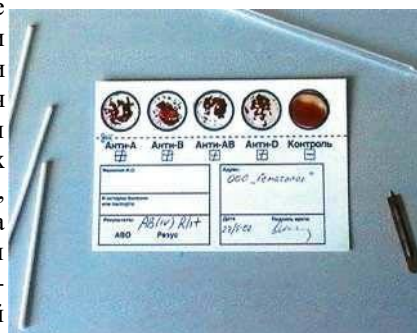
8. Немедленно запишите результаты определения.

*Трактовка результата:*

При отсутствии агглютинации кровь считается резус-отрицательной, при положительной реакции - резус-положительной; подгруппы Du могут вызывать слабую агглютинацию даже в этом высокочувствительном тесте. Прежде чем отнести донора Du к резус-положительным, подтвердите заключение контрольным исследованием антиглобулиновой сыворотки со стандартными резус-отрицательными эритроцитами. Если контрольный тест положителен, интерпретация не является достоверной, и кровь такого донора не должна использоваться для трансфузий до окончательного выяснения его резус-принадлежности.

### НАБОР ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП КРОВИ АВО И РЕЗУС ЭРИТРОТЕСТ™-ГРУППОКАРТ

В последние годы стали доступны специально разработанные карточки с нанесенными на них высушенными группоспецифическими моноклональными антиэритроцитарными антителами. Диагностические карты можно использовать для определения группы крови в практике семейного врача, у постели нетранспортабельных больных, в чрезвычайных и экстремальных ситуациях (боевые действия, конфликты), на транспорте (суда, поезда), в труднодоступных местах. Основным компонентом набора является карточка с 5 лунками, на поверхность которых нанесены сухие моноклональные антитела серии ЦОЛИКЛОН: Анти-А, Анти-В, Анти-АВ и Анти-D Супер, а также контрольный реагент. Такой набор позволяет проводить экспресс-определение групповой принадлежности крови по системе АВО, а также ее резус-принадлежности.



В набор также входят:

- стерильный скарификатор для взятия крови из пальца;
- пластиковая одноразовая пипетка для внесения воды в лунки;
- палочки для перемешивания крови в лунках (5 штук);
- инструкция по применению.

Основными достоинствами Наборов ЭРИТРОТЕСТ™-ГРУППОКАРТ являются:

- Возможность быстрого (3-4 мин) определения групп крови АВО и Резус;
- Возможность тестирования в полевых условиях (при отсутствии стандартных условий для типирования крови);

Полная документированность тестирования: после проведения определения часть карточки с заполненными результатами можно сохранить в истории болезни или других документах.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП КРОВИ

**ЭРИТРОТЕСТ™-АГС (антисыворотка к глобулинам человека)** - препарат, представляющий собой смесь антисыворотки к глобулинам человека и моноклональных анти-С3d антител. Предназначен для проведения пробы на индивидуальную совместимость донора и реципиента, для тестирования сыворотки больного на наличие иммунных антител, для типирования крови с помощью реагентов, содержащих неполные антитела, для проведения прямой пробы Кумбса с целью обнаружения аутоиммунной эритроцитоза. Активными компонентами являются антисыворотка кроликов против иммуноглобулинов G и M человека; моноклональные анти-С3d антитела.

Антисыворотку к глобулинам человека получают из сыворотки животных (кроликов), иммунных против глобулинов человека. ЭРИТРОТЕСТ™-АГС содержит преимущественно антитела к иммуноглобулинам класса G и M человека. В препарат добавлены моноклональные антитела против

C3d компонента комплемента. Неспецифические антиэритроцитарные гетероантитела удалены абсорбцией. В состав реагента входят также стабилизатор и консервант.

Основное назначение препарата - выявление сенсibilизации эритроцитов неполными (неагглютинирующими) антителами класса G с помощью прямой или непрямой пробы Кумбса (антиглобулинового теста). Поэтому реагент стандартизуется по его анти-IgG активности.

Антиглобулиновый тест с использованием антисыворотки к глобулинам человека резко увеличивает как специфичность, так и чувствительность определения антител, в связи с чем пробу на индивидуальную совместимость, исследование сыворотки на наличие иммунных антител, определение слабых форм антигена D (Du) рекомендуется проводить с помощью непрямого антиглобулинового теста. Использование раствора LISS ускоряет фиксацию антител, что значительно сокращает время реакции.

ЭРИПРОТЕСТ™-LISS (Low Ionic Strength Solution, раствор низкой ионной силы). В среде с низкой ионной силой фиксация неполных антител человека на эритроцитах происходит быстрее, повышается также прочность комплекса антиген-антитело. Изотонический раствор с низкой ионной силой (LISS) рекомендуется использовать при определении резус-принадлежности крови и совместимости крови донора и реципиента с помощью непрямого антиглобулинового теста (непрямой пробы Кумбса).

### ***ДРУГИЕ СИСТЕМЫ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА***

К наиболее клинически значимым системам антигенов эритроцитов, способных вызвать посттрансфузионное осложнение или гемолитическую болезнь новорожденного (ГБН) относятся: Келл, Даффи, Кидд, Диего.

Антиген **Келл (Kell, K1)** был открыт Кумбсом в 1946 году при исследовании причины гемолитической болезни новорожденного. Частота распространения антигена K1 составляет 7-9%. В настоящее время система насчитывает 24 антигена.

Трансфузионные реакции, вызываемые анти-Келл антителами, могут приводить к смертельному исходу. Антигены этой системы вызывают тяжелые формы ГБН с внутриутробной смертью плода или мертворождением. Келл-положительные компоненты крови для трансфузий в лечебную сеть не выдают и направляют для переработки на препараты крови.

Первое сообщение об антигене **Даффи (Duffy)** относится к 1950 году. Трансфузионные реакции немедленного или отсроченного типа нередко приводят к летальному исходу. Как причина ГБН встречается редко.

Антиген **Кидд (JK, Kidd)** открыт в 1951 году. Антитела к антигенам этой системы вызывают немедленные или отсроченные посттрансфузионные осложнения, сопровождающиеся экстравазкулярным гемолизом. ГБН чаще легкого течения за счет низкой концентрации антител.

Первый образец анти - Di<sup>a</sup> (**Diego**) открыт в 1956 году в Венесуэле при выяснении причин ГБН. Считается маркером монголоидной расы. Антитела вызывают посттрансфузионные гемолитические реакции.

Согласно Приказу Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 29 сентября 2005 года № 492 «Об утверждении Правил хранения, переливания крови и ее компонентов, препаратов крови в организациях здравоохранения»: «26. В целях профилактики посттрансфузионных осложнений, обусловленных антигеном Келл, отделения и Центр крови выдают для переливания в клинику эритроцитную взвесь или массу, не содержащую этого фактора». То есть определение антигена Келл у доноров является обязательным.

### ***Определение наличия антигена Келл в реакции прямой агглютинации на плоскости при помощи Цоликлона Анти-Kell Супер.***

*Оснащение:*

- Цоликлон Анти-Kell Супер;
- планшеты или пластинки со смачиваемой поверхностью;
- раствор натрия хлорида 0,9%;
- стеклянная палочка.

*Порядок проведения исследования:*

1. Нанести каплю (около 0,1 мл.) реагента анти-Kell Супер на пластинку или планшет.
2. Нанести рядом маленькую каплю (около 0,03 мл.) исследуемой крови (эритроцитов).
3. Тщательно смешать реагент с кровью чистой стеклянной палочкой.
4. Через 20 секунд мягко покачать пластинку. Несмотря на то, что четкая агглютинация наступает в первые 30 секунд, результат учитывается через 3 минуты после смешивания.
5. Записать результаты реакции немедленно после определения.

*Трактовка результата:*

При наличии агглютинации на эритроцитах исследуемого присутствует данный антиген. Если агглютинация отсутствует, то результат - отрицательный.

### **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Ke11-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ**

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН Анти-Ke11 СУПЕР** содержит моноклональные полные анти-Kell антитела. Активным компонентом являются моноклональные антитела человека класса IgM, секретируемые гетерогбридомами человек-мышь. Реагент предназначен для тестирования эритроцитов в реакции прямой агглютинации на плоскости. Анти-Kell антитела, входящие в состав препарата, высокоспецифичны и не дают перекрестных реакций.

### **ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Kidd-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ**

**ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНЫ Анти-Jka и Анти-Jkb СУПЕР** содержат моноклональные полные (IgM) анти-Jka и анти-Jkb антитела, соответственно. Активными компонентами ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНов являются моноклональные антитела человека класса IgM, секретируемые гетерогбридомами человек-мышь. Реагенты предназначены для тестирования эритроцитов в реакции прямой агглютинации в пробирках. Анти-Kidd антитела, входящие в состав препаратов, высокоспецифичны и не дают перекрестных реакций.

### **ПРОБЫ НА СОВМЕСТИМОСТЬ**

Согласно Приказу Министерства здравоохранения Республики Казахстан «Об утверждении Правил хранения, переливания крови и ее компонентов, препаратов крови в организациях здравоохранения» от 29 сентября 2005 года № 492: «39. При переливании эритроцитсодержащих компонентов в плановом или экстренном порядке врач, выполняющий трансфузию, независимо от произведенных ранее исследований и имеющихся записей, обязан лично непосредственно перед трансфузией: - перепроверить группу крови у реципиента по системе АВО, сверить полученный результат с данными в истории болезни; - перепроверить группу крови по системе АВО донорского контейнера и сопоставить результат с данными на этикетке контейнера; - сравнить группу крови и резус принадлежность, обозначенные на контейнере, с результатами исследования, ранее внесенными в историю болезни и только что полученными; - провести пробы на индивидуальную совместимость по системам АВО и резус эритроцитов донора и сыворотки реципиента». Пробы на совместимость проводятся с целью предотвращения переливания несовместимых эритроцитов. Пробы на совместимость по АВО и другим групповым системам проводятся отдельно и не могут заменить друг друга, так как антитела разного характера требуют разных методов для своего выявления. Для проб на совместимость используется сыворотка крови реципиента и кровь донора. Сыворотка больного должна быть свежей, полученной в тот же день, когда делается переливание крови или накануне при условии сохранения ее при +4°+6°С. У больного берут 5 мл крови, без стабилизатора в пробирку, на которой подписывают Ф.И.О., группу крови и дату. Если больному переливается кровь (эритроцитная масса) из нескольких контейнеров, пробы на совместимость должны быть сделаны с кровью из каждого контейнера.

### ***Проба на совместимость сыворотки больного с эритроцитами донора.***

Исследование проводится на плоскости в хорошо освещенной комнате при  $t +20^{\circ}\text{C}$ .

- 1) На пластине подписать Ф.И.О. группу крови больного, Ф.И.О. и группу крови донора, и номер контейнера с кровью.
- 2) На пластину накапать 2- 3 капли сыворотки больного и туда же 1 маленькую каплю крови донора (соотношение 1 :10).
- 3) Размешать сухой стеклянной палочкой, пластину слегка покачать. на 1-2 минуты оставить в покое и снова периодически покачивать. одновременно наблюдая за ходом реакции в течение 5 минут.

#### ***Трактовка результата***

Если в смеси сыворотки больного и крови донора наступила агглютинация — это значит что кровь донора несовместима с кровью больного и не должна быть ему перелита.

Если смесь крови донора и сыворотки больного по истечению 5 минут остается гомогенно окрашенной, то это означает, что кровь донора совместима с кровью больного в отношении групп крови системы АВО (точнее, это означает, что в сыворотке нет полных антител против эритроцитов донора).

Согласно Приказу №670 Агентства РК по делам здравоохранения от 30.10.2000г. «Инструкции по иммуносерологии для службы крови»: «После того, как установлена совместимость по группам крови системы АВО, врач должен убедиться, что кровь донора совместима с кровью больного также в отношении резус антигена D, для чего произвести еще одну из проб на совместимость: с применением 10% р-ра желатина; непрямая проба Кумбса.»

### **Непрямая проба Кумбса**

В пробирку вносят одну каплю (0,05 мл) осадка трижды отмытых эритроцитов донора, для чего выдавливают из пипетки небольшую каплю эритроцитов и касаются ею дна пробирки, и добавляют 3 капли сыворотки реципиента. Содержимое пробирки перемешивают встряхиванием, после чего их помещают на 45 минут в термостат при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . По истечении указанного времени эритроциты вновь трижды отмывают и готовят 5 % взвесь в 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида.

Далее 1 каплю взвеси эритроцитов на фарфоровую пластинку, добавляют 1-2 капли антиглобулиновой сыворотки и перемешивают стеклянной палочкой. Пластинку периодически покачивают в течение 1-2 минут. Следить за ходом реакции в течении 20 минут.

Учет результатов проводят невооруженным глазом или через лупу. Агглютинация эритроцитов свидетельствует о том, что кровь реципиента и донора несовместимы, отсутствие агглютинации является показателем совместимости крови донора и реципиента.

### **Проба на совместимость с применением 10 % раствора желатина**

В пробирку вносят 1 небольшую каплю эритроцитов донора, для чего выдавливают из пипетки небольшую каплю эритроцитов и касаются ею дна пробирки, добавляют 2 капли желатина и 2 капли сыворотки реципиента. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием, после чего их помещают в водяную баню на 15 минут или термостат на 30 мин (в горизонтальном положении) при температуре от  $+46$  до  $48^{\circ}\text{C}$

По истечении указанного времени в пробирки добавляют 5-8 мл физиологического раствора и перемешивают содержимое путем 1-2-кратного переворачивания пробирок.

Результат учитывают, просматривая пробирки в проходящем свете невооруженным глазом или через лупу. Агглютинация эритроцитов свидетельствует о том, что кровь реципиента и донора несовместимы, отсутствие агглютинации является показателем совместимости крови донора и реципиента.

**Следует помнить, что проба на совместимость не дает информации о специфичности иммунных антител у больного в случае их обнаружения. Специфичность**

**аллоиммунных антител может быть установлена только в специальном исследовании с панелью типированных эритроцитов.**

### ***ВХОДНОЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ***

Согласно Приказа Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 491 «Об утверждении Перечня требований по безопасности и качеству крови и ее компонентов, препаратов крови, консервирующих средств и Правил осуществления контроля безопасности и качества крови, ее компонентов и препаратов», от 29 сентября 2005 года, все реагенты, используемые в производстве компонентов крови должны быть зарегистрированы в Фармакологическом Комитете и проходить входной контроль качества.

Для приобретения материалов и реагентов необходимо иметь инструкции по их применению. Производители должны предоставлять сертификаты соответствия для каждой единицы оборудования, материалов и реагентов, используемых при заборе, производстве и контроле крови, ее компонентов и препаратов. Продукция поставщика должна быть принята на склад после проверки сопроводительной документации. До получения результатов входного контроля материалы должны размещаться отдельно от проверенной продукции (карантин). Входной контроль является неотъемлемой частью процесса изготовления компонентов крови, он проводится для предотвращения использования в производстве материалов, не отвечающих установленным требованиям, и сокращения непроизводительных расходов.

Испытания материалов проводят соответствующие лаборатории (по принадлежности вида деятельности): лаборатории скрининга инфекций, иммунологическая, бактериологическая, отдел технического контроля и другие. При положительных результатах входного контроля материалы должны быть соответствующим образом промаркированы и переведены из карантина в активный запас. Если при входном контроле выявлено несоответствие материала требованиям нормативной документации, необходимо оформить отзыв о качестве материала с указанием причины несоответствия для предъявления предприятию-изготовителю (рекламационный акт). Материалы промаркировать и хранить в специально отведенном месте. Не допускается совместное хранение материалов, имеющих разный статус входного контроля.

Входной контроль качества моноклональных антител производится методом, указанным на аналитическом паспорте препарата (например: непрямая проба Кумбса), и титр активности, объем реагента во флаконе также должен соответствовать этому документу.

## Список использованной литературы

1. Инструкции по иммуносерологии для Службы крови. - Агентство РК по делам здравоохранения г. Алматы. – 2000 г.
2. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 22 сентября 2005 года №464 «Об утверждении Правил медицинского обследования донора».
3. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 29 сентября 2005 года №492 «Об утверждении Правил хранения, переливания крови и ее компонентов, препаратов крови в организациях здравоохранения».
4. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 29 сентября 2005 года №491 «Об утверждении Перечня требований по безопасности и качеству крови и ее компонентов, препаратов крови, консервирующих средств и Правил осуществления контроля безопасности и качества крови, ее компонентов и препаратов».
5. Под редакцией М.А. Умновой Групповые системы крови человека и гемотрансфузионные осложнения г. Москва, Медицина, 1989 г.
6. Барышев Б.А. Организационные принципы переливания крови - г. Санкт-Петербург. – 2000 г.
7. Минеева Н.В. Антигены эритроцитов. Методы определения группы крови и резус принадлежности - г. Санкт-Петербург. – 1999 г.
8. Минеева Н.В. Группы крови человека. Основы иммуногематологии. - г. Санкт-Петербург. – 2004 г.
9. Руководство по организации Службы крови. Под редакцией Гиббс В., Бриттен А. – 1995 г.
10. Дашкова Н.Г., Рагимов А.А., Асоскова Т.К. Трансфузионная иммунология — как система иммунологической и инфекционной безопасности трансфузионной терапии. - “Новое в трансфузиологии”, 2001. - с. 378.
11. Рагимов А.А., Дашкова Н.Г. Основы трансфузионной иммунологии- г.Москва. – 2004г.
12. Оловникова Н.И., Николаева Т.Л. Антигены эритроцитов человека. Гематология и трансфузиология (обзор). 2001, Т 46, № 5, стр 37-45.
13. Н.И.Оловникова, Е.В.Белкина, Л.Н.Леменева, Г.Ю.Митерев и др. Моноклональные антитела в гематологической практике: диагностикумы и лекарства. Гематол. и трансфузиол., 2008, т 53, №5, стр 32-35.



## Уважаемые коллеги!!!

«Научно - производственное объединение» «Гематолог» основано Гематологическим Научным Центром РАМН и рядом ведущих научно-исследовательских и медицинских учреждений России.

Компания «Гематолог» разрабатывает и производит современные реагенты для типирования крови – моноклональные антитела, получаемые методами молекулярной и клеточной биотехнологии, для трансфузиологической, лечебной и судебно-медицинской практики.

Моноклональные антитела к эритроцитарным антигенам - диагностикумы для типирования групп крови, традиционно называются «**Эритрогест Цоликлонами**».

Компания «Гематолог», обладает эксклюзивными авторскими правами на эталонные клеточные линии, секретирующие моноклональные антитела - активные вещества для Эритрогест-Цоликлонов.

Реагенты под товарным знаком **ЭРИТРОГЕСТ™** выпускаются разных серий( F и R) и включают моноклональные антитела от различных гибридных линий, что значительно повышает надежность и достоверность тестирования крови по системе АВО.

В соответствии с Постановлением правительства РК от 21.12.07 № 1251 « Об утверждении программы о мерах по совершенствованию службы крови в РК на 2008-2010гг.» «...Пункт №9 .....обеспечение подразделений служб крови моноклональными реагентами для проведения иммуногематологических исследований крови.....» в Республике Казахстан зарегистрирована, разрешена к применению и успешно применяется следующая продукция производства «Гематолог», РФ.

**1. Эритрогест™-Цоликлон Анти-А, Эритрогест™-Цоликлон Анти-В, Эритрогест™-Цоликлон Анти-АВ** (антитела диагностические моноклональные для определения группы крови человека по системе АВО, жидкость по 5мл №10, 10мл №10 во флаконах), регистрационное удостоверение –РК-ЛС-5-№009770;

**2. Эритрогест™-Цоликлон Анти-D Супер** (антитела диагностические моноклональные для определения резус-принадлежности крови человека, жидкость по 5мл №20 во флаконах), регистрационное удостоверение –РК ЛС-5-№009771;

**3. Эритрогест™-Цоликлон Анти-Е Супер, Анти-е Супер, Анти-с Супер, Анти-Келл Супер** (набор реагентов диагностических для типирования крови человека по системам Резус и Келл, жидкость по 5мл №10 во флаконах), регистрационное удостоверение –РК ЛС-5-№009772;

Использование «**Эритрогест Цоликлонов**» в трансфузиологической, лечебной и судебно-медицинской практике дает следующие преимущества:

простота исполнения, экономичность, стандартность, отсутствие посторонних антител, отсутствие патогенных для человека вирусов, отказ от иммунизации доноров, возможность проводить определение всех антигенов одновременно одним методом, отсутствие ограничений по количеству реагентов, возможность массового и методически простого фенотипирования крови и многое другое, что подробно описано в настоящих методических рекомендациях.

**Компания «AG Medical Company» является авторизованным представителем НПО «Гематолог» на территории Республики Казахстан** (государственная лицензия на фармацевтическую деятельность №ОР64604967Р).

Залогом доверия к нам наших коллег является высокое качество предоставляемых услуг, постоянная информационная, методическая, консультационная поддержка на любом этапе сотрудничества.

**«AG Med Com»**

050008, Республика Казахстан

г.Алматы, ул. Абая 62А

тел: 8(727) 250-17-88, 250-10-49

факс: 250-10-21

e-mail: [gemotech@action.kz](mailto:gemotech@action.kz)