

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть  
13.11.2008 г.  
Регистрационный № 112-1108

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП КРОВИ СИСТЕМЫ АВ0 ПРИ  
ПОМОЩИ ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК**

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

Под группами крови АВ0 понимаются различные сочетания антигенных свойств эритроцитов (агглютиногенов) и антител, специфических к ним (агглютининов) и находящихся в плазме крови.

Существуют два групповых агглютиногена – А и В, и два агглютинина –  $\alpha$  и  $\beta$ . В качестве антител агглютинины  $\alpha$  и  $\beta$  обозначаются анти-А и анти-В (а-А, а-В). Различные сочетания этих свойств образуют четыре группы крови  $O_{\alpha\beta}(I)$ ,  $A_{\beta}(II)$ ,  $B_{\alpha}(III)$  и  $AB_0(IV)$ .

Определение групп крови проводят в нативной крови (с консервантом, без консерванта, венозной или капиллярной) методом прямой гемагглютинации на плоскости. Возможны два способа определения группы крови:

1. Определение группы крови при помощи изогемагглютинирующих сывороток. При этом способе в крови устанавливают наличие или отсутствие агглютиногенов и, исходя из этого, делают заключение о групповой принадлежности исследуемой крови.

2. Определение группы крови перекрестным способом, т.е. одновременно при помощи изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов. При этом способе определяют наличие или отсутствие агглютиногенов и, кроме того, при помощи стандартных эритроцитов устанавливают наличие или отсутствие групповых агглютининов.

Во избежание ошибки и непоправимых последствий у больных группу крови определяют в два этапа.

Первый этап – в стационаре (у постели больного), в процедурном кабинете, кабинете трансфузиологической помощи организации здравоохранения с использованием изогемагглютинирующих сывороток двух различных серий каждой группы.

Кровь для исследования берут в количестве 4-5 мл в сухую пробирку и определяют групповую принадлежность во взятой крови.

Результат установленной группы крови немедленно вносится:

на пробирку для лабораторного исследования путем наклеивания марки соответствующей группы крови, на которой указывается номер медицинской карты стационарного больного, фамилия, инициалы больного и дата взятия крови;

в направление для лабораторного исследования в клиническую лабораторию, на котором указывается номер медицинской карты, фамилия, имя, отчество больного, дата;

на лицевую сторону медицинской карты стационарного больного с указанием даты исследования и за подписью лечащего врача.

Второй этап определения группы крови проводится в клинико-диагностической лаборатории организации здравоохранения из доставленной пробирки перекрестным методом, т.е. одновременно при помощи стандартных сывороток и стандартных эритроцитов. Лабораторный анализ, с

указанием групповой принадлежности при совпадении всех паспортных данных, а также результатов определения группы крови сверяется с первоначальными данными и вклеивается в медицинскую карту.

Окончательный результат определения групповой принадлежности записывается на лицевой стороне медицинской карты стационарного больного, с указанием даты и за подписью лечащего врача.

Группу крови доноров и других контингентов здоровых лиц определяют также два раза:

первый раз при первичном обращении донора (здорового лица) при помощи стандартных сывороток двух различных серий каждой группы;

второй раз при апробации крови из флакона-спутника перекрестным способом, т.е. одновременно при помощи стандартных сывороток (также двух различных серий каждой группы) и стандартных эритроцитов. Результат обоих определений записывают на лицевой стороне карты донора с указанием даты и за подписью лиц, определявших группу крови.

При использовании изогемагглютинирующих сывороток с титром не ниже, чем 1:64, разрешается проводить первичное определение группы крови доноров одной серией сыворотки каждой группы. При повторном и перекрестном определении можно использовать также сыворотки одной серии (с титром не ниже, чем 1:64), но отличающиеся от тех серий, которые были применены при первичном определении.

У больных, реципиентов и при определении группы крови донора из контейнера (бутылки) первичное и все повторные исследования групп крови в стационаре проводятся при помощи изогемагглютинирующих сывороток двух различных серий каждой группы. При определении группы крови в клиничко-диагностической лаборатории перекрестным методом, т.е. одновременно при помощи стандартных сывороток и эритроцитов, разрешается проводить исследование одной серией сыворотки, если титр используемой сыворотки не ниже, чем 1:64.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Изогемагглютинирующие сыворотки групп  $O\alpha\beta(I)$ ,  $A\beta(II)$ ,  $B\alpha(III)$  и  $ABO(IV)$ ;

стандартные эритроциты групп  $O(I)$ ,  $A(II)$ ,  $B(III)$  для перекрестной реакции;\*  
изотонический 0,9%-ый раствор хлорида натрия;

---

\*Стандартные эритроциты изготавливаются учреждениями службы крови в консервированном виде. Можно использовать и нативные свежие стандартные эритроциты, приготовленные малыми дозами в соответствии с действующей инструкцией по их изготовлению

белые фарфоровые или любые другие белые пластинки со смачиваемой поверхностью;

пипетки, маркированные для каждой группы сывороток и эритроцитов;

стеклянные, пластмассовые палочки или другой материал для перемешивания капель крови и сыворотки каждой в отдельности;

песочные часы на 5 минут (таймер со звуковым сигналом);

карандаши по стеклу;

штативы для пробирок;

пробирки 10x100 мм;

специальные штативы для стандартных сывороток и эритроцитов.

## ТЕХНИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК

Определение группы крови производят в помещении с хорошим освещением при температуре  $+15 - +25^{\circ}\text{C}$ .

На пластине для определения группы крови с левой стороны надписывают:  $O_{\alpha\beta}$ (анти A+B), в середине –  $A_{\beta}$ (анти-B) и справа –  $B_{\alpha}$ (анти-A), на верхнем крае – фамилию и инициалы лица, у которого определяют группу крови.

Под соответствующим обозначением группы крови на пластину наносят по одной большой капле (0,1 мл) стандартных сывороток соответствующих групп. Всего получается 6 капель, которые образуют два ряда по 3 капли в следующем порядке слева направо:  $O_{\alpha\beta}$ (анти A+B),  $A_{\beta}$ (анти-B) и  $B_{\alpha}$ (анти-A).

Рядом с каждой каплей сыворотки наносят маленькую каплю (0,01 мл) исследуемой крови, соблюдая соотношение 10:1.

Смешивают каплю сыворотки с каплей крови индивидуальной чистой палочкой.

После размешивания капель пластинку покачивают, затем на 1-2 минуты оставляют в покое и снова периодически покачивают.

Наблюдение за ходом реакции проводят 5 минут. Хотя агглютинация начинается в течение первых 10-30 секунд, наблюдение следует вести и далее – до 5 минут ввиду возможности более поздней агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности антигенов A или B.

Через 3 минуты в капли смеси сыворотки с эритроцитами, в которых наступила агглютинация, добавляют по 1 капле (0,05 мл) изотонического раствора хлорида натрия и продолжают наблюдение при периодическом покачивании пластинки до истечения 5 минут.

## ТРАКТОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ГРУППЫ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК

Реакция гемагглютинации в каждой капле может быть положительной или отрицательной.

При положительной реакции, обычно в течение первых 10-30 секунд от начала перемешивания, в смеси появляются видимые невооруженным глазом мелкие красные комочки (агглютинаты), состоящие из склеенных эритроцитов. Мелкие комочки постепенно сливаются в более крупные, а иногда – в хлопья неправильной формы. При этом сыворотка полностью или почти полностью обесцвечивается. При отрицательной реакции жидкость все время (5 минут) остается равномерно окрашенной в красный цвет и в ней не обнаруживается никаких агглютинатов.

Результаты реакций в каплях с сывороткой одной и той же группы 2-х серий должны совпадать.

Результаты с сыворотками трех групп:  $O_{\alpha\beta}$  (анти-A+B),  $A_{\beta}$  (анти-B) и  $B_{\alpha}$  (анти-A) могут дать четыре различные комбинации положительных и отрицательных реакций (таблица 1):

1. Если сыворотки всех трех групп дали отрицательную реакцию, т.е. все смеси остались равномерно окрашенными в красный цвет без признаков агглютинации, это значит, что кровь не содержит агглютиногенов А и В, т.е. принадлежит к группе  $O(I)$ .

2. Если сыворотки групп  $O_{\alpha\beta}$  (анти-A+B),  $B_{\alpha}$  (анти-A) дали положительную реакцию, а сыворотка группы  $A_{\beta}$  (анти-B) – отрицательную, это значит, что кровь содержит агглютиноген А, т.е. принадлежит к группе  $A(II)$ .

3. Если сыворотки групп  $O_{\alpha\beta}$  (анти-A+B) и  $A_{\beta}$  (анти-B) дали положительную реакцию, а сыворотка группы  $B_{\alpha}$  (анти-A) – отрицательную, то исследуемая кровь содержит агглютиноген В, т.е. принадлежит к группе  $B(III)$ .

4. Если сыворотки всех трех групп дали положительную реакцию, это указывает на то, что исследуемая кровь содержит оба агглютиногена – А и В, и принадлежит к группе  $AB(IV)$ . Однако в этих случаях для исключения неспецифической агглютинабельности исследуемых эритроцитов необходимо провести дополнительное контрольное исследование со стандартной сывороткой группы  $AB_0(IV)$ . Для этого на пластинку наносят большую каплю (0,1 мл) сыворотки группы  $AB_0(IV)$  (контроль) и к ней добавляют маленькую (0,01 мл) каплю исследуемой крови. Сыворотку и кровь перемешивают, после чего наблюдают за результатом в течение 5 минут при покачивании пластинки. Лишь отсутствие агглютинации в этой капле, при наличии ее в каплях, содержащих стандартные сыворотки

групп  $O_{\alpha\beta}$  (анти-A+B),  $A_{\beta}$ (анти-B) и  $B_{\alpha}$ (анти-A), позволяет считать реакцию специфической и отнести исследуемую кровь к группе AB(IV).

Таблица 1

Оценка результатов определения групп крови при помощи изогемагглютинирующих сывороток двух серий каждой группы

Результат реакции с изогемагглютинирующими сыворотками группы				Исследуемая кровь принадлежит к группе
$O_{\alpha\beta}$ (I) (анти-A+B)	$A_{\beta}$ (II) (анти-B)	$B_{\alpha}$ (III) (анти-A)	AB $_{\alpha}$ (IV) контроль	
-	-	-		$O$ (I)
-	-	-		
+	-	+		A(II)
+	-	+		
+	+	-		B(III)
+	+	-		
+	+	+	-	AB(IV)
+	+	+		

- знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации
- знаком минус (-) обозначено отсутствие агглютинации

### ТЕХНИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ ПЕРЕКРЕСТНЫМ СПОСОБОМ ПРИ ПОМОЩИ ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК И СТАНДАРТНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Определение группы крови перекрестным способом заключается в одновременном определении групповых агглютиногенов в эритроцитах испытуемой крови при помощи стандартных сывороток и групповых агглютининов в сыворотке исследуемой крови при помощи стандартных эритроцитов.

Для определения группы крови перекрестным способом, кроме стандартных сывороток, используют стандартные эритроциты группы  $O$ (I), A(II), B(III).

Кровь для исследования берут из вены или пальца в сухую пробирку. Кровь центрифугируют или оставляют в покое на 20-30 минут для отделения сыворотки (для более быстрого получения сыворотки через 3-5 минут сгусток отделяют от стенок пробирки, обведя его стеклянной палочкой).

Определение производят на белой пластинке, на верхнюю часть которой наносят обозначение слева направо:  $O_{\alpha\beta}$  (анти-A+B),  $A_{\beta}$  (анти-B) и  $B_{\alpha}$  (анти-A). На верхнем крае надписывают фамилию и инициалы лица, у которого определяют группу крови.

Под соответствующими обозначениями групп крови на пластинку наносят по одной большой капле (0,1 мл) стандартных изогемагглютинирующих сывороток. При использовании стандартных сывороток двух различных серий каждой группы всего получается 6 капель, которые образуют два ряда по 3 капли в следующем порядке слева направо:  $O_{\alpha\beta}$  (анти-А+В),  $A_{\beta}$  (анти-В) и  $B_{\alpha}$  (анти-А).

На нижнюю часть пластинки также под соответствующими обозначениями наносят по одной маленькой (0,01 мл) капле стандартных эритроцитов в следующем порядке слева направо:  $O(I)$ ,  $A(II)$ ,  $B(III)$ .

Из пробирки, содержащей кровь больного, пипеткой извлекают сыворотку (осторожно, чтобы не взболтать эритроциты) и накапывают ее по одной большой (0,1 мл) капле на подготовленные стандартные эритроциты. После этого той же пипеткой набирают со дна пробирки эритроциты испытуемой крови и наносят их по маленькой (0,01 мл) капле рядом с каждой каплей подготовленной стандартной сыворотки.

Во всех каплях сыворотку перемешивают с эритроцитами сухой палочкой, пластинку покачивают, затем на 1-2 минуты оставляют в покое и снова периодически покачивают. Наблюдение за ходом реакции проводят 5 минут. Агглютинация в каплях со стандартной сывороткой обычно начинается быстро (10-30 секунд). Агглютинация в каплях, в которых сыворотку крови испытывают со стандартными эритроцитами, может наступить поздно (к концу 5-й минуты), в связи с возможностью низкого титра содержащихся в исследуемой сыворотке агглютининов.

Через 3 минуты в те капли, в которых наступила гемагглютинация, добавляют по 1 капле (0,05 мл) изотонического раствора хлорида натрия и продолжают наблюдение при покачивании пластинки до истечения 5 минут.

### **ТРАКТОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ГРУППЫ КРОВИ ПЕРЕКРЕСТНЫМ СПОСОБОМ**

Учет реакции производится путем сопоставления результатов, полученных при помощи стандартных изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов (таблица 2).

Результаты реакций, полученных при помощи стандартных сывороток и стандартных эритроцитов, должны совпадать, т.е. указывать на содержание агглютиногенов и агглютининов, соответствующих одной и той же группе крови.

Таблица 2

Оценка результатов определения групп крови перекрестным методом при помощи изогемагглютинирующих сывороток двух серий каждой группы и стандартных эритроцитов

Результат реакции с изогемагглютинирующими сыворотками группы			Исследуемая кровь принадлежит к группе	
0 $\alpha$ $\beta$ (I) (анти-A+B)	A $\beta$ (II) (анти-B)	B $\alpha$ (III) (анти-A)		
-	-	-		
Стандартные эритроциты				
0(I) -	A(II) +	B(III) +	0 $\alpha$ $\beta$ (I)	
Результат реакции с изогемагглютинирующими сыворотками группы			Исследуемая кровь принадлежит к группе	
0 $\alpha$ $\beta$ (I) (анти-A+B)	A $\beta$ (II) (анти-B)	B $\alpha$ (III) (анти-A)		
+	-	+		
+	-	+		
Стандартные эритроциты			A $\beta$ (II)	
0(I) -	A(II) -	B(III) +		
Результат реакции с изогемагглютинирующими сыворотками группы			Исследуемая кровь принадлежит к группе	
0 $\alpha$ $\beta$ (I) (анти-A+B)	A $\beta$ (II) (анти-B)	B $\alpha$ (III) (анти-A)		
+	+	-		
+	+	-		
Стандартные эритроциты			B $\alpha$ (III)	
0(I) -	A(II) +	B(III) -		
Результат реакции с изогемагглютинирующими сыворотками группы				Исследуемая кровь принадлежит к группе
0 $\alpha$ $\beta$ (I) (анти-A+B)	A $\beta$ (II) (анти-B)	B $\alpha$ (III) (анти-A)	AB $\alpha$ (IV) контроль	
+	+	+	-	
+	+	+		
Стандартные эритроциты				AB $\alpha$ (IV)
0(I) -	A(II) -	B(III) -		



Эти результаты могут быть выражены в четырех различных комбинациях:

1. Отрицательная реакция со стандартными сыворотками указывает на отсутствие групповых агглютиногенов, т.е. на принадлежность исследуемой крови к группе 0(I). При этом сыворотка исследуемой крови (нижний ряд) дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами группы 0(I) и положительную – с эритроцитами групп A(II) и B(III), что указывает на наличие в исследуемой крови агглютининов  $\alpha$  и  $\beta$ , т.е. подтверждает принадлежность исследуемой крови к группе  $0\alpha\beta$ (I).

2. При помощи стандартных сывороток в исследуемой крови устанавливается наличие агглютиногена A. При этом сыворотка исследуемой крови дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами групп 0(I) и A(II), но положительную – с эритроцитами группы B(III). Это указывает на наличие в исследуемой крови агглютинина  $\beta$ , т.е. подтверждает принадлежность испытуемой крови к группе  $A\beta$ (II).

3. При помощи стандартных сывороток в исследуемой крови определяется наличие агглютиногена B. При этом сыворотка исследуемой крови дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами групп 0(I) и B(III), но положительную – с эритроцитами группы A(II). Это указывает на наличие в исследуемой крови агглютинина  $\alpha$ , т.е. подтверждает принадлежность испытуемой крови к группе  $B\alpha$ (III).

4. При помощи стандартных сывороток в исследуемой крови устанавливается наличие агглютиногенов A и B, а исследование с контрольной сывороткой группы  $AB_0$ (IV) подтверждает специфичность реакции. При этом сыворотка исследуемой крови дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами всех трех групп, что указывает на отсутствие агглютининов в исследуемой крови, т.е. подтверждает принадлежность испытуемой крови к группе  $AB_0$ (IV).

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Отступление от изложенных правил может привести к ошибочному заключению о групповой принадлежности исследуемой крови.

Ошибочное заключение о групповой принадлежности может явиться следствием нарушения:

технических условий проведения реакции;

методических условий проведения реакции;

быть связанной с биологическими особенностями исследуемой крови.

К нарушениям, связанным с техническими сторонами реакции, относятся:

несоблюдение условий взятия крови, доставки проб крови, оформления направления и маркировки пробирки;

перепутывание при вклеивании в медицинскую карту анализов, механические ошибки при переписывании результатов;

ошибочный порядок расположения стандартных сывороток и эритроцитов в штативах и неправильное нанесение их на пластинку;

загрязнение или применение мокрых пипеток, пластинок, палочек, неправильная маркировка пипеток;

использование недоброкачественных стандартов, например, сыворотки с истекшим сроком годности (недостаточно активной), загрязненной, помутневшей или частично высохшей, которая может вызвать неспецифическую реакцию агглютинации.

Для предупреждения возможных ошибок такого свойства необходимо в начале работы тщательно проверить расположение в штативах стандартных реагентов, сывороток, эритроцитов, их качество, групповую принадлежность, номер серии, срок годности. Строго соблюдать правила взятия крови, выписки направления, маркировки и доставки проб крови.

Ко второй возможной группе ошибок относятся несоблюдение методики определения группы крови и, как результат, – неправильная оценка реакции как в целом, так и в каждой отдельной капле, заключающаяся в следующем:

лицо, определяющее группу крови, считает, что агглютинации не произошло, в то время как она фактически должна появиться (ложноотрицательный результат);

лицо, определяющее группу крови, предполагает, что произошла агглютинация, в то время как она фактически отсутствует (ложноположительный результат);

Ложноотрицательный результат реакции проявляется:

при несоблюдении времени, необходимого для проведения реакции (5 минут). В случае если эритроциты исследуемого лица обладают слабой агглютинабельностью, стандартная сыворотка в течение первых минут реакции дает замедленную, нечеткую, слабовыраженную агглютинацию, которая постепенно усиливается только к 5-ой минуте. Наиболее частой ошибкой является невыявление слабой подгруппы  $A_2B(IV)$ , которую ошибочно относят к  $B(III)$ , и подгруппы  $A_2(II)$ , которую ошибочно относят к  $O(I)$  группе;

при неправильном соотношении количества сыворотки и эритроцитов. При избытке крови, если взята слишком густая капля крови и не выдержано соотношение крови и сыворотки 1:10;

при неполном смешивании сыворотки и эритроцитов (плохо размешана капля, не покачивается пластинка);

при нарушении температурного режима реакции (температура ниже  $+15^{\circ}\text{C}$  и температура выше  $+25^{\circ}\text{C}$ ).

Ложноположительный результат реакции наблюдается:

при неспецифической агглютинации, когда эритроциты исследуемой крови складываются в «монетные столбики», которые невооруженным глазом можно принять за агглютинаты;

при феномене ауто- или панагглютинации, когда исследуемые эритроциты агглютинируются стандартными сыворотками всех групп, включая АВ(IV), а также сывороткой исследуемой крови.

при подсыхании капли, когда пластинку со смесью эритроцитов и сыворотки не покачивают или удлиняют время наблюдения сверх 5 минут.

В этих случаях необходимо:

провести повторное исследование испытуемой крови перекрестным методом для установления полной формулы крови по системе АВО, заменив стандартные изогемагглютинирующие сыворотки другими сериями;

для исключения неспецифической агглютинации необходимо добавить 1 каплю (0,05 мл) изотонического раствора хлорида натрия, во все капли, где произошла агглютинация, с последующим покачиванием пластинки;

для исключения феномена ауто- или панагглютинации необходимо отмыть испытуемые эритроциты теплым изотоническим раствором хлорида натрия (температура  $+37^{\circ}\text{C}$ ) путем центрифугирования и повторить реакцию со стандартными сыворотками.

Ошибки, связанные с биологическими особенностями исследуемой крови, могут быть обусловлены наличием слабых антигенов –  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $A_2B$ ,  $AB_2$ , экстраагглютининов, панагглютинации, аутоагглютинации, кровяной химеры вследствие гемотрансфузии, ослаблением агглютинабельности эритроцитов при онкопатологии.

В большинстве случаев ошибок при определении групповой принадлежности крови можно избежать путем строгого соблюдения инструкции. При затруднении в определении сложных групп крови образец направляют в региональную ОПК или СПК для исследования специалистом-изосерологом.

## ДОПОЛНЕНИЕ

В настоящее время, наряду с применением изогемагглютинирующих сывороток для определения групп крови системы АВО, полученных от доноров крови, используются моноклональные антитела (монокло-

нальные реагенты ГУ «РНПЦГТ», цоликлоны компаний «Гематолог», «Медиклон» и других производителей) – дополнение 1; идентификационные карты для определения групп крови АВО в гелевом тесте (ID-карты ДиаМед и других производителей) – дополнение 2; метод с использованием специальных карточек с высушенными на них тестовыми реактивами («Biotest» и других производителей) – дополнение 3; микропланшеты Эритайп с нанесенными моноклональными антисыворотками (компания «Biotest AG», Германия и других производителей), карты универсальные серологические (с микроколонками) Сэллбайнд (компания «Sanquin Reagents», Голландия и других производителей).

Постановка реакций гемагглютинации с их использованием должна производиться согласно инструкции производителя.

## Дополнение 1

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП КРОВИ СИСТЕМЫ АВО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ РЕАГЕНТОВ АНТИ-А, АНТИ-В, АНТИ-АВ**

Реагенты анти-А, анти-В, анти-АВ предназначены для определения групп крови человека системы АВО в прямых реакциях гемагглютинации.

Моноклональные анти-А, анти-В, анти-АВ антитела являются продуктом жизнедеятельности специфических мышинных гибридом и принадлежат к иммуноглобулинам класса М.

Определение производится в крови с консервантом, без консерванта, венозной или капиллярной.

На планшет (пластинку) наносят по одной большой капле (0,1 мл) реагенты анти-А, анти-В, анти-АВ под соответствующими надписями.

Рядом с каплями реагентов наносят по одной маленькой капле исследуемой крови (0,01-0,03 мл), затем реагент и кровь смешивают и наблюдают за ходом реакции при легком покачивании пластины или планшета в течение 5 минут. Агглютинация эритроцитов обычно наступает в первые 3-5 секунд, но наблюдение следует вести 5 минут ввиду более позднего появления агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности антигенов А или В.

Результат реакции в каждой капле может быть положительным или отрицательным. Положительный результат выражается в агглютинации эритроцитов. Агглютинаты видны невооруженным глазом в виде мелких красных агрегатов, быстро склеивающихся в крупные хлопья. При отрицательной реакции капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинаты в ней не обнаруживаются.

При положительном результате реакции агглютинации со всеми реагентами необходимо исключить спонтанную неспецифическую агглютинацию исследуемых эритроцитов. Для этого смешивают на плоскости одну каплю физиологического раствора хлорида натрия с одной каплей исследуемых эритроцитов. Заключение о принадлежности исследуемой крови к группе АВ(IV) делают только при отсутствии агглютинации эритроцитов в физиологическом растворе.

Учет результатов реакции агглютинации представлен в таблице 3.

Таблица 3

Интерпретация результатов реакции агглютинации эритроцитов моноклональными антителами

Результат* реакции с реагентом			Группа крови АВ0
Анти-А	Анти-В	Анти-АВ	
-	-	-	0(I)
+	-	+	А(II)
-	+	+	В(III)
+	+	+	АВ(IV)

\* Знаком + обозначено наличие агглютинации, знаком - – ее отсутствие

Примечание:

В большинстве случаев при определении групп крови моноклональными реагентами достаточно вести учет реакции по наличию или отсутствию агглютинации с двумя реагентами: анти-А и анти-В.

Дополнительное введение в реакцию реагента анти-АВ необходимо в диагностических лабораториях при возникновении затруднений при определении групп крови.

При получении сомнительного результата определение группы крови АВ0 проводится с использованием изогемагглютинирующих сывороток от доноров крови или моноклональных антител другого производителя.

Дополнение 2

**ПРИМЕНЕНИЕ ИДЕНТИФИКАЦИОННЫХ КАРТ  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП КРОВИ АВ0 В ГЕЛЕВОМ  
ТЕСТЕ МИКРОМЕТОДОМ (ID-КАРТЫ ДиаМЕД)**

Идентификационные карты ID-ДиаМед фирмы «ДиаМед» (Швейцария) предназначены для одновременного определения группы крови

AB0 и резус-принадлежности в эритроцитах человека. ID-карты ДиаМед можно использовать взамен или параллельно с изогемагглютинирующими сыворотками, моноклональными реагентами анти-А, анти-В, анти-Д.

ID-карты ДиаМед представляют собой пластиковые карточки, в которые встроено по шесть пробирок. В пяти пробирках содержится смесь геля и антисывороток, шестая контрольная пробирка содержит нейтральный гель без антител.

Принцип метода основан на разделении эритроцитов при центрифугировании после реакции гемагглютинации в геле. Образующиеся агглютинаты не проходят через гель из-за большого размера и остаются в верхней части пробирки (положительный результат).

При отсутствии антигена в исследуемом образце эритроциты не образуют агглютинатов с антисывороткой, при центрифугировании легко проходят через гель и оседают на дне пробирки (отрицательный результат).

### **Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники**

ID-центрифуга для центрифугирования карт;  
пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,01; 0,05 и 0,5 мл;  
штатив для пробирок и карт;  
пробирки вместимостью 5 и 10 мл;  
раствор для разведения 1 (модифицированный раствор бромелина);  
раствор для разведения 2 (модифицированный раствор низкой ионной силы – LISS).

### **Технология использования способа**

Для проведения исследования используют консервированную кровь или кровь, взятую без консерванта.

Приготовить взвесь исследуемых эритроцитов в растворе для разведения 1, если используются ID-карты, содержащие антитела сыворотки крови человека, для чего:

выдержать раствор для разведения 1 до достижения комнатной температуры (+18° – +25° С);

в промаркированной пробирке приготовить 5%-ую взвесь типизируемых эритроцитов в растворе для разведения 1, поместив в пробирку 0,5 мл раствора для разведения 1 и 0,05 мл цельной крови или 0,025 мл эритроцитарной массы;

выдержать пробирку при комнатной температуре (+18° – +25° С) в течение 10 минут.

Приготовить взвесь исследуемых эритроцитов в растворе для разведения 2, если используются ID-карты, содержащие моноклональные антитела, для чего:

выдержать раствор для разведения 2 до достижения комнатной температуры (+18° – +25° С);

в промаркированной пробирке приготовить 5%-ую взвесь типизируемых эритроцитов в растворе для разведения 2, поместив в пробирку 0,5 мл раствора для разведения 2 и 0,05 мл цельной крови или 0,025 мл эритроцитарной массы.

С промаркированной ID-карты снять защитную фольгу и внести в каждую пробирку по 0,01 мл исследуемых эритроцитов, приготовленных в растворе для разведения 1, или по 0,0125 мл (12,5 мкл) исследуемых эритроцитов, приготовленных в растворе для разведения 2.

Центрифугировать ID-карты в центрифуге в течение 10 минут.

Оценить результаты исследования (рисунок 1, таблица 4).

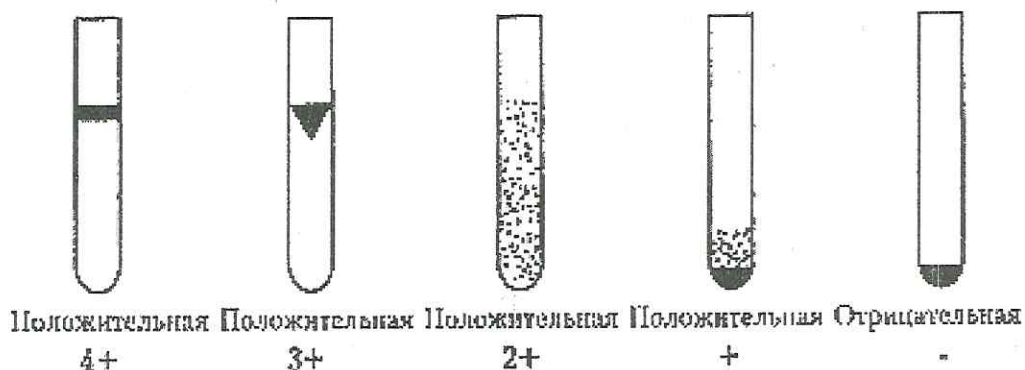


Рисунок 1. Оценка результатов реакции агглютинации в гелевом тесте

Характер агглютинации при выявлении антигенов в гелевом тесте зависит от количества антигенных детерминант, присутствующих на одном эритроците. Образцы эритроцитов с большим количеством антигенных детерминант имеют характер агглютинации 4+, характер агглютинации эритроцитов со слабыми вариантами антигенов соответствует диапазону от 3+ до +.

Таблица 4

Результаты исследования антигенов группы крови АВ0 и резус-принадлежности в ID-карте АВ0/Rh

Выявляемые антигены					Контроль	Заключение об АВ0 и резус-принадлежности исследуемого образца крови
A	B	AB	D	CDE		
+	+	+	+	+	-	AB Rh+
+	+	+	-	-	-	AB Rh-
+	-	+	+	+	-	A Rh+
+	-	+	-	-	-	A Rh-
-	+	+	+	+	-	B Rh+
-	+	+	-	-	-	B Rh-
-	-	-	+	+	-	0 Rh+
-	-	-	-	-	-	0 Rh-

Специфичность исследования подтверждается по отрицательному результату в пробирке с контролем ID-карты. При наличии положительных и слабopоложительных реакций в контроле необходимо повторить исследование с отмытыми эритроцитами и провести дополнительное исследование по выявлению холодowych и тепловых аутоантител. В случае выявления аутоантител типирование антигенов эритроцитов проводят после предварительной аутоадсорбции и элюции аутоантител.

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

### Дополнение 3

#### ПРИМЕНЕНИЕ КАРТОЧЕК С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ АВ0 (СЕРАФОЛ АВ0+D)

Карточки с моноклональными антителами Серафол АВ0+D фирмы «Biotest» используются для определения группы крови непосредственно перед трансфузией крови (тест у постели больного). Тест является подтверждением ранее проведенного определения группы крови по системе АВ0 и D реципиента и гарантирует совместимость группы крови реципиента и крови, предназначенной для переливания.

Тест-карта покрыта высушенными специфическими моноклональными реактивами и предназначена для определения группы крови по системе АВ0 и антигена D системы Резус.



Для проведения исследования можно использовать венозную или капиллярную кровь.

Карточку промаркировать, указав личные данные больного.

Нанести одну каплю физиологического раствора хлорида натрия и одну каплю крови в зоны определения и аутоконтроля (в случае определения венозной крови рекомендуется использовать дозирующую пипетку).

Тщательно смешать кровь с окрашенными высушенными антисыворотками при помощи чистой палочки или обратной стороны пипетки (каждое поле должно быть перемешано до образования гомогенной реакционной массы).

Круговыми движениями карточки в течение 30 секунд добиться перемешивания реакционной смеси и осуществления реакции. Через 60-90 секунд учесть полученный результат (таблица 5) и записать результаты на карту.

Таблица 5

Результаты определения группы крови АВ0 и резус-принадлежности с использованием карты Serafol

Анти-А	Анти-В	Анти-D	Аутоконтроль	Группа крови
+	-	+	-	A Rh+
+	-	-	-	A Rh-
-	+	+	-	B Rh+
-	+	-	-	B Rh-
+	+	+	-	AB Rh+
+	+	-	-	AB Rh-
-	-	+	-	0 Rh+
-	-	-	-	0 Rh-
+	+	+	+	Тест не действителен

- наличие агглютинации – положительная реакция;
- отсутствие агглютинации – отрицательная реакция

Если в поле аутоконтроля имеются признаки агглютинации, результат является недействительным, и тест должен быть повторен.

После определения группы крови карточку оставляют при комнатной температуре (+18° – +22°С) до полного высыхания. После высушивания на карточку наклеивается прозрачная самоклеющаяся пленка, после чего она может быть прикреплена в историю болезни.