

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

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

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

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

Государственное учреждение «Республиканский  
научно-практический центр гематологии и  
трансфузиологии»

**АВТОРЫ:**

д.м.н., профессор Потапнев М.П., к.м.н., доцент Свирновская Э.Л.,  
Дворина Е.М., Будько Т.В., Полкова Е.В.

Минск, 2008

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для определения антител  $\alpha$ ,  $\beta$  и иммунных антител анти-А, анти-В требуются:

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

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

### **1. Подготовительная работа**

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

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

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

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

## 2. Техника реакции

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

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

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

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

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

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

---

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

### 3. Трактовка результатов

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

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

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

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

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

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

#### 1. Подготовительная работа

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

#### 2. Техника реакции

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3. Трактовка результатов

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

---

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

Общее заключение делается на основании сопоставления результатов всех исследований:

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

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

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

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

##### **1. Характеристика метода**

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

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

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

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

5%-ый раствор унитиола;

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

### 3. Порядок проведения исследования

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

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

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

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

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

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

### 4. Трактовка результатов

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

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



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

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

## 5. Условия хранения и эксплуатации

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

## V. Определение гемолизинов системы АВ0

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

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

### 2. Подготовительная работа

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

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

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

### 3. Техника реакции

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

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

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

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

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

### 4. Трактовка результатов определения групповых гемолизинов

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

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

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

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

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

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

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

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

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