

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГРУПП КРОВИ АВО

Утверждены Директором
Гематологического
Научного Центра РАМН
Академиком А.И. Воробьевым
27.04.1999

Кровь каждого человека принадлежит к какой-либо из 4-х групп системы АВО в зависимости от присутствия на эритроцитах антигенов А и В и соответствующих антител анти-А и анти-В в плазме. В группе 0(I) отсутствуют оба антигена, в группе А(II) - на эритроцитах присутствует только антиген А, в группе В(III) - на эритроцитах присутствует только антиген В и в группе АВ(IV) - на эритроцитах одновременно присутствуют оба антигена - А и В. В норме у неиммунизированных людей в плазме имеются естественные антитела к отсутствующему антигену: у лиц группы 0(I) обнаруживаются антитела против обоих антигенов, А и В; у лиц группы А(II) - анти-В антитела; при группе В(III) - антитела анти-А и, наконец, при группе АВ(IV) антитела этой системы в плазме отсутствуют. В связи с тем, что совместимость по системе АВО наиболее важна при осуществлении гемотрансфузий, определение группы крови системы АВО необходимо определять перекрестным методом, т.е. по антигенам эритроцитов и по антителам в плазме (сыворотке). Параллельное исследование антигенов эритроцитов и агглютининов в сыворотке обязательно и у доноров, и у реципиентов. В случае переливания крови по жизненным показаниям можно определять группу реципиента только по антигенам эритроцитов, однако при этом обязательно проводится проба на индивидуальную совместимость сыворотки реципиента с эритроцитами донора. Следует иметь в виду, что существуют разновидности как антигена В, так и, в большей степени, антигена А. Наиболее частыми разновидностями А антигена являются А1 и А2. Антиген А2 встечается примерно у 20% среди людей групп А(II) и АВ(IV). При рутинном типировании нет необходимости в специальном выделении подгрупп А2(II) и А2В(IV), так как обычно у людей с антигеном А2 отсутствуют антитела против антигена А1 и им можно переливать кровь согласно общим правилам. Наличие таких “избыточных” антител выявляется при перекрестном определении группы крови и в пробе на индивидуальную совместимость. Частота встречаемости анти-А1 антител составляет у людей группы А2(II) 1-8% и у людей А2В(IV) - 22-35%. При обнаружении анти-А1 антител у таких лиц полезно подтвердить наличие антигена А2 специальными реагентами (моноклональный реагент против антигена А1 или лектин *Dolichos biflorus*), агглютинирующими только А1 эритроциты. Лицам групп А2(II) и А2В(IV) с анти-А1 антителами можно переливать эритроциты только с антигенами А2 или А2В, соответственно.

Агглютинины анти-А (альфа) и анти-В (бета) определяют в реакции прямой агглютинации стандартных эритроцитов А1 и В с исследуемой сывороткой.

Антигены исследуемых эритроцитов определяют в реакции прямой агглютинации с помощью стандартных реагентов, содержащих полные анти-А и/или анти-В антитела. Этими реагентами могут быть аллоиммунные сыворотки, полученные от иммунных доноров, или моноклональные антитела. Использование изогемагглютинирующих сывороток от неиммунных доноров не рекомендуется в связи с их недостаточной активностью в отношении слабых вариантов антигенов и нестандартностью.

Используемые стандартные реагенты должны быть сертифицированы по международным требованиям. Сертификация стандартов производится референс-лабораторией Гематологического Научного Центра один раз в год для каждого учреждения, изготавливающего типизирующие реагенты. Каждая серия реагента стандартизуется этим учреждением по сертифицированному стандарту. Стандарты должны удовлетворять следующим требованиям: 1). быть специфичными; 2). иметь титр в пробирочном тесте не ниже 1:1024 для реагентов анти-А и анти-В с эритроцитами А1 и В, соответственно; 3). иметь титр в пробирочном тесте не ниже 1:256 для реагента анти-А с эритроцитами А; 4). вызывать четкую агглютинацию на плоскости в течение 2-3 секунд после смешивания реагентов с отмытыми эритроцитами А1 или В и не позднее 5 секунд после смешивания с отмытыми эритроцитами А2.

Группа крови у доноров определяется врачом или лаборантом 2 раза: один раз при первичном обращении донора и второй раз при зачислении в доноры. Результаты обоих определений записываются на лицевой стороне донорского журнала с указанием даты и за подписью лиц, определявших группу крови. В дальнейшем группа крови определяется перед каждой кроводачей.

Группа крови у реципиентов определяется сертифицированным врачом-трансфузиологом или специально обученной медсестрой. Результаты определения группы крови записываются в правом верхнем углу лицевого листа истории болезни с указанием даты и за подписью специалиста, производившего определение. Определение группы крови повторяют перед трансфузией.

Определение группы крови АВО перекрестным методом.

I. Определение антигенов А и В эритроцитов иммунными поликлональными сыворотками или моноклональными реагентами.

Типирование крови должно проводиться двумя сериями реагентов анти-А и анти-В, либо одной серией каждого реагента, если используется и реагент анти-АВ, который является дополнительным контролем правильности определения группы крови АВО реагентами анти-А и анти-В.

Определение проводится в помещении с хорошим освещением при температуре 15-25°. Для исследования используют цельную кровь, отмытые эритроциты,

эритроциты в плазме, сыворотке или физиологическом растворе.

1. Отмаркируйте секции на пластинке или планшете, указав название реагента.
2. Нанесите по 1 большой капле (около 0,1 мл) каждого реагента: анти-А, анти-В и анти-АВ.
3. Нанесите по 1 маленькой капле (около 0,03 мл) исследуемой крови (эритроцитов) рядом с каждым реагентом.
4. Смешайте отдельными чистыми стеклянными палочками каждую каплю крови (эритроциты) с соответствующим реагентом.
5. Мягко покачивайте пластинку. Несмотря на то, что при использовании стандартных реагентов четкая агглютинация наступает уже в первые секунды, результаты реакции учитывайте через 3 минуты после окончания смешивания, чтобы не пропустить слабые формы антигенов.
6. Запишите результаты реакции немедленно после определения.

II. Определение агглютининов анти-А и анти-В в сыворотке крови со стандартными эритроцитами.

В качестве стандартных эритроцитов следует использовать эритроциты от доноров групп А1 и В. Эритроциты хранят в холодильнике не более недели. В специальном консерванте срок хранения эритроцитов может быть увеличен. Не допускается использование лизированных эритроцитов. Можно использовать эритроциты от одного заранее типированного донора (для каждой группы), либо смесь эритроцитов от 2-3 доноров (для каждой группы).

1. Приготовьте 5% взвесь в физрастворе однократно отмытых в физрастворе стандартных эритроцитов.
2. Поместите в 2 маркированные пробирки по 2 капли исследуемой сыворотки (плазмы).
3. Добавьте 1 каплю 5% взвеси эритроцитов группы А в пробирку А и каплю эритроцитов группы В в пробирку В, тщательно смешайте и проинкубируйте при комнатной температуре 5 минут.
4. Центрифугируйте пробирки при 2000 об/мин в течение 30 секунд (рекомендуется подобрать оптимальное время и скорость центрифугирования для используемой центрифуги так, чтобы осадок легко отделялся ото дна пробирки).
5. Покачивая пробирку, отслоите ото дна и мягко взболтайте осадок эритроцитов.
6. Определите наличие агглютинатов, просматривая пробирку на свет.
7. Запишите результаты определения.

III. Интерпретация результатов и установление группы крови

Результат реакции эритроцитов с реагентами:			Результат реакции сыворотки со стандартными эритроцитами:		Кровь принадлежит к группе:
анти-А	анти-В	анти-АВ	А1	В	0(I)
			+	+	А(II)
-	-	-	-	+	В(III)

+	-	+	+	-	AB(IV)
-	+	+	-	-	
+	+	+			

*Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации, знаком минус (-) - отсутствие агглютинации.

IV. Расхождение результатов определения группы крови АВО по антигенам эритроцитов и агглютиниnam сыворотки.

Если результаты двух тестов не совпадают при исследовании крови донора, то эта кровь не может быть использована для трансфузии, пока не будут установлены причины расхождения.

Если несовпадение относится к крови реципиента, которому необходимо срочное переливание крови, то ему нужно перелить кровь (эритроциты) группы 0(1), совместимую по резус-фактору.

Основные причины ошибок

1. Технические ошибки: использование загрязненного оборудования; неправильное соотношение сыворотки и клеток; чересчур сильное центрифугирование (ложноположительный результат); недостаточное центрифугирование (ложноотрицательный результат); загрязнение стандартных реагентов реагентами другой группы; проведение реакции при температуре выше 25о (ложноотрицательный результат); неправильная маркировка реагентов, эритроцитов, либо неправильная запись результатов.

2. Ошибки, связанные с аномальными свойствами тестируемых эритроцитов:
- слабые формы антигена А (чаще) или В. Сыворотка может содержать экстра-антитела, а соответствующий антиген на эритроцитах не выявляется.

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 моноклоны). Обычно полиагглютинацию удастся устранить повторным отмыванием эритроцитов.

- образование "монетных столбиков" может быть принято за агглютинацию. В этом случае при добавлении 1-2 капель физраствора и покачивании пластинки

ложная агглютинация обычно исчезает.

- смешанная агглютинация (кроваая химера), когда часть эритроцитов собраны в агглютинаты, а остальные остаются свободными. Наиболее часто это наблюдается у больных групп А, В или АВ в течение 1-3 месяцев после переливания им больших объемов крови группы 0(1) или после трансплантации костного мозга группы 0(1); 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 спонтанно агглютинироваться иммунными сыворотками. Повторите определение с моноклональными реагентами, поставьте прямую пробу Кумбса (см. ниже).

3. Ошибки, связанные с аномальными свойствами исследуемой сыворотки:

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

- 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 избыточные антитела (например анти-А1 у людей со слабым А2 антигеном). Результат пробы на совместимость (см. Методические рекомендации по проведению пробы на индивидуальную совместимость крови донора и реципиента) является в таких случаях единственным критерием для подбора крови.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ

На эритроцитах человека имеются 5 основных антигенов системы резус (D, C, c, E, e), из которых наиболее иммуногенным является антиген D [его полное обозначение - Rh⁰(D)]. Наличие или отсутствие этого антигена определяет резус-принадлежность крови: лица, содержащие D-антиген, принадлежат к группе резус-положительных (среди лиц белой расы их приблизительно 85%); лица, не содержащие D-антигена, относятся к резус-отрицательным (их, соответственно, около 15%).

Иммуногенность других (минорных) антигенов системы резус значительно ниже и убывает в следующем порядке: c>E>C>e. Определение минорных антигенов системы резус как правило производится при индивидуальном подборе крови для многократных трансфузий, в тех случаях, когда в сыворотке

реципиента обнаружены иммунные антитела к антигенам системы резус, а также у женщин детородного возраста.

Антиген D имеет слабые варианты, объединяемые в группу D^u, которая составляет около 1% популяции. Эритроциты D^u слабо или вообще не агглютинируются полными анти-резус антителами в реакции прямой агглютинации. Для их определения следует использовать неполные анти-резус антитела в реакции агглютинации с антиглобулиновым реагентом (непрямая проба Кумбса). Кровь доноров и реципиентов тестируются по-разному на присутствие D^u антигена.

Доноры, содержащие D^u, должны быть отнесены к резус-положительным, так как переливание их крови сенсibilизированным к D-антигену резус-отрицательным реципиентам может вызывать тяжелые трансфузионные реакции. Кровь доноров должна обязательно тестироваться на присутствие D^u и, в случае его обнаружения, быть отнесенной к резус-положительной.

Большинство резус-отрицательных лиц имеет фенотип dсе, однако 2-5% лиц, не несущих на эритроцитах антигена D и резус-отрицательных по определению, имеют фенотип dCeилidсE. Такие эритроциты могут вызывать иммунный ответ при переливании их реципиентам с группой dсе, поэтому рекомендуется проводить тестирование крови резус-отрицательных доноров с анти-С и анти-Е (или анти-СЕ) реагентами.

Тестирование крови реципиентов на D^u в непрямой пробе Кумбса не обязательно.

Определение 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, желатины и др.), или с эритроцитами, обработанными протеолитическими ферментами.

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

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

I. Реакция агглютинации на плоскости с помощью полных анти-DIgM антител.

Определение проводят в помещении с хорошим освещением. Наилучшие результаты тест дает при использовании высокой концентрации эритроцитов и температуре около 37°С, поэтому желательно использовать подогретую пластинку. Для исследования используют цельную кровь, отмытые эритроциты, эритроциты в плазме, сыворотке, консерванте или физиологическом растворе.

- а) Нанесите большую каплю (около 0,1 мл) реагента на пластинку или планшет.
- б) Нанесите рядом маленькую каплю (около 0,03 мл) исследуемой крови (эритроцитов).
- в) Тщательно смешайте реагент с кровью чистой стеклянной палочкой.
- г) Через 10-20 секунд мягко покачайте пластинку. Несмотря на то, что четкая агглютинация наступает в первые 30 секунд, результаты реакции учитывайте через 3 минуты после смешивания.
- д) Запишите результаты реакции немедленно после определения.

При наличии агглютинации исследуемая кровь маркируется как резус-положительная. Если агглютинация очень слабая или отсутствует, у доноров исследование обязательно проводят со вторым реагентом, содержащим IgG (неполные) анти-D антитела (см. пункт III) для уточнения принадлежности такого образца крови к группе D^u. У реципиентов выявление D^u с помощью неполных антител не обязательно. Следует, однако, иметь в виду, что слабая агглютинация на плоскости может наблюдаться с эритроцитами D^uC^e. Такому реципиенту нельзя переливать резус-отрицательную кровь, так как это может привести к сенсibilизации против антигена «с». В этом случае целесообразно проверить наличие C антигена у реципиента.

II. Реакция агглютинации с помощью неполных IgG анти-D антител в присутствии высокомолекулярных добавок.

Реакция проводится либо со специально приготовленным реагентом, уже содержащим усилитель (универсальный реагент с полиглобулином или альбумином для плоскости), либо усилитель добавляют в процессе проведения реакции (реакция конгломинации с желатином в пробирке).

1. Техника постановки реакции агглютинации на плоскости не отличается от описанной в пункте I. Однако универсальные реагенты могут давать ложноположительную реакцию с резус-отрицательными эритроцитами за счет содержащихся в них высокомолекулярных веществ, а также могут вызывать агглютинацию эритроцитов, покрытых антителами другой (не анти-резус) специфичности. Поэтому необходимо проведение параллельных тестов с контрольным раствором используемого усилителя, но без анти-D антител. Если контрольный раствор вызывает агглютинацию эритроцитов, то результаты тестирования не достоверны. Повторите определение с другим реагентом.

2. Реакция конгломинации с применением желатина. Для проведения этого

теста могут быть использованы моноклональные реагенты и стандартные изоиммунные анти-резус сыворотки с неполными антителами. Необходимо проведение контроля с раствором желатина без анти-резус реагента.

- а) Внесите 1 каплю (около 0,05 мл) исследуемой крови или взвеси эритроцитов (примерно 50%) в сыворотке.
- б) Добавьте 2 капли (0,1 мл) 10% раствора желатина, предварительно подогретого до разжижения при 46-48°.
- в) Добавьте 2 капли (0,1 мл) реагента анти-D и смешайте.
- г) Поместите пробирку в водяную баню при температуре 46-48° на 5-10 минут или в суховоздушный термостат при той же температуре на 30 минут.
- д) Долейте в пробирку 5-8 мл физраствора и осторожно 1-2 раза переверните закрытую пробкой пробирку для перемешивания.
- е) Определите наличие агглютинатов, просматривая пробирку на свет невооруженным глазом или через лупу.
- ж) Немедленно запишите результаты определения.

При положительном результате агглютинаты различимы в виде агрегатов разной величины на прозрачном фоне - кровь является резус-положительной. При отрицательном результате в пробирке агрегатов нет, а видна равномерно окрашенная непрозрачная взвесь эритроцитов - кровь является резус-отрицательной. Если наблюдается мелкозернистая вызывающая сомнение агглютинация, то кровь необходимо тестировать в непрямом антиглобулиновом тесте (см. пункт III). Результаты желатиновой пробы являются достоверными только в случае, когда сам желатин сам не вызывает агглютинации исследуемых эритроцитов, а результаты контролей со стандартными эритроцитами соответствуют ожидаемым. В случае неадекватных результатов определение резус-принадлежности следует повторить с использованием другого реагента или другого образца желатина. Если желатин вызывает сам по себе агглютинацию исследуемых эритроцитов, то можно предполагать наличие на них антиэритроцитарных антител анти-резус или иной специфичности (это наблюдается при гемолитической болезни новорожденных, аутоиммунной гемолитической анемии и некоторых инфекционных заболеваниях). В этом случае кровь должна быть направлена на исследование в специальную серологическую лабораторию.

III. Непрямой антиглобулиновый тест (непрямая проба Кумбса) с помощью неполных анти-D антител.

- а) Приготовьте 2-5% взвесь трижды отмытых в физиологическом растворе исследуемых эритроцитов. Для этого поместите в пробирку 5 капель (около 0,25 мл) исследуемой крови, трижды отмойте в 5-10 мл физиологического раствора; суспендируйте осадок эритроцитов в 2-3 мл физиологического раствора 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.

- б) Внесите 1 каплю анти-D реагента в чистую маркированную пробирку.
- в) Добавьте 1 каплю 2-5% взвеси эритроцитов (пункт "а").
- г) Инкубируйте смесь при 37° 30-45 минут (если эритроциты в физиологическом растворе) или 10-15 минут (если эритроциты в LISS).
- д) Отмойте эритроциты 1 раз (в случае использования моноклонального реагента) или 3 раза (в случае использования иммунной анти-D сыворотки) большим объемом (5-10 мл) физиологического раствора. Однократная отмывка допустима только при использовании моноклональных реагентов. Полностью удалите физиологический раствор.
- е) Добавьте к осадку 1 каплю антиглобулинового реагента и тщательно смешайте.
- ж) Центрифугируйте 15-20 секунд при 900-1000g (примерно 2000-3000 об/мин).
- з) Мягко ресуспендируйте осадок и визуально определите наличие агглютинации.
- и) Немедленно запишите результаты определения.

При отсутствии агглютинации кровь считается резус-отрицательной, при положительной реакции - резус-положительной; подгруппы D^u могут вызывать слабую агглютинацию даже в этом высокочувствительном тесте. Прежде чем отнести донора D^u 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.

IV. Агглютинация эритроцитов, обработанных протеолитическими ферментами, с помощью неполных анти-D антител.

Неполные антитела способны вызывать прямую агглютинацию в солевой среде эритроцитов, обработанных бромелином, папаином, трипсином и др. протеазами. Этот метод высокочувствителен и надежен при выявлении слабых форм D антигена. Он используется главным образом при автоматическом определении групп крови в системах типа Группоматик, в которых обеспечивается стандартность обработки эритроцитов ферментами и специально подбирается нужное разведение реагента, так как для этого теста характерен феномен прозоны (ингибирование агглютинации избытком антител). При ручном определении групп крови метод может быть использован в специализированных серологических лабораториях в различных модификациях, что не дает возможности его полного описания в этих Методических рекомендациях.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРОБЫ НА ИНДИВИДУАЛЬНУЮ СОВМЕСТИМОСТЬ КРОВИ ДОНОРА И РЕЦИПИЕНТА

Целью пробы на индивидуальную совместимость является предотвращение трансфузий эритроцитов, несовместимых с сывороткой больного. Тестирование сыворотки реципиента с эритроцитами предполагаемого донора - наиболее надежный способ выявления антител, способных вызвать повреждение перелитых эритроцитов, посттрансфузионные реакции, в том числе и гемолитические. Проведение такой пробы позволяет: 1) подтвердить АВО совместимость донора и реципиента; 2) выявить наличие антител в сыворотке реципиента, направленных против антигенов эритроцитов донора.

Техника проведения пробы на индивидуальную совместимость.

Во всех случаях, кроме срочных трансфузий, проба проводится в два этапа: первый - без использования антиглобулинового реагента, второй - с антиглобулиновым реагентом или с использованием желатина. В случае использования желатина метод менее чувствителен. В случаях срочных трансфузий двухэтапное определение рекомендуется проводить с раствором низкой ионной силы (LISS).

Первый этап

1. Поместите 2 капли сыворотки реципиента в маркированную пробирку.
2. Добавьте 1 каплю 5% суспензии трижды отмытых эритроцитов донора в физиологическом растворе или в растворе низкой ионной силы LISS (фиксация антител происходит лучше в среде с низкой ионной силой, поэтому предпочтительнее взвесить эритроциты в растворе LISS, обычно поставляемом изготовителем вместе с антиглобулиновым реагентом).
3. Немедленно центрифугируйте при 2000 об/мин в течение 15-20 секунд.
4. Просмотрите супернатант на наличие гемолиза. Мягко покачивая пробирку, отделите клеточный осадок от дна пробирки и определите наличие агглютинатов. Наличие гемолиза и/или агглютинатов на этой стадии могут означать: а) несовместимость по системе АВО; б) присутствие в сыворотке реципиента полных антител не АВО специфичности, активных при комнатной температуре (анти-S, анти-P1, анти-M и др).

Второй этап с антиглобулиновым реагентом

5. Если гемолиз отсутствовал, а после встряхивания пробирки эритроциты образовали гомогенную суспензию, инкубируйте пробирку 30-45 минут (при

использовании LISS время инкубации составляет 10-15 минут) при 37оС.

6. Центрифугируйте пробирку, как в пункте 3, и просмотрите супернатант на наличие гемолиза и агглютинатов. Наличие гемолиза и/или агглютинатов (после встряхивания пробирки) говорит о присутствии у реципиента полных тепловых антител против эритроцитов донора.

7. Если гемолиз и агглютинация отсутствуют, отмойте эритроциты 3-4 раза большим объемом (не менее 5 мл) физраствора (недостаточное отмывание может привести к инаktivации антиглобулинового реагента остатком сыворотки и ложноотрицательному результату); удалите полностью физраствор после последнего отмывания.

8. Добавьте 1-2 капли антиглобулиновой сыворотки и тщательно смешайте.

9. Центрифугируйте пробирку, как в пункте 3, мягко разбейте осадок и просмотрите пробирку на наличие агглютинатов.

Качество антиглобулинового реагента гарантируется изготовителем. Не используйте реагент с истекшим сроком годности или после повторного замораживания-оттаивания. Полезно в качестве контроля (если у вас возникли сомнения в качестве реагента) провести антиглобулиновый тест со стандартными резус-положительными и резус-отрицательными эритроцитами (см. Методические указания по определению резус-принадлежности крови).

Второй этап при использовании желатина

5. Если гемолиз отсутствовал, а после встряхивания пробирки эритроциты образовали гомогенную суспензию, добавьте 2 капли 10% раствора желатина, подогретого до разжижения, и тщательно смешайте.

6. Инкубируйте пробирку при 46-48о 10 мин на водяной бане или 30 мин в суховоздушном термостате.

7. Добавьте 5-8 мл физиологического раствора и 1-2 раза осторожно переверните закрытую пробирку для перемешивания.

8. Определите наличие агглютинации, просматривая пробирку на свет невооруженным глазом или через лупу.

Не используйте желатин, если он не застывает в холодильнике, мутный или образует хлопья. Не замораживайте желатин. Раствор желатина не должен вызывать неспецифическую агглютинацию, поэтому каждая серия желатина должна быть проверена в контроле с несенсибилизированными эритроцитами.

При необходимости срочной трансфузии можно ограничиться только стадиями 1-4 пробы на совместимость. В этом случае допускается также проведение теста на индивидуальную совместимость на плоскости, путем смешивания 1 капли

сыворотки реципиента с каплей эритроцитов донора (соотношение сыворотки и крови должна быть около 5:1). В такой постановке проба на индивидуальную совместимость сводится фактически к выявлению совместимости только по системе АВО.

Донор считается совместимым, если ни на одной стадии пробы на индивидуальную совместимость не наблюдается ни гемолиза, ни агглютинации. Наличие их свидетельствует о присутствии в сыворотке реципиента антител к эритроцитам предполагаемого донора. Таким реципиентам необходимо переливать эритроциты, не содержащие антигенов, против которых направлены антитела. Следует помнить, что проба на индивидуальную совместимость не дает информации о специфичности антител в сыворотке реципиента. Установить их специфичность можно только в исследованиях с панелью типированных эритроцитов.