

ГЕМАТОЛОГИЯ

Практика № 3. Определение группы крови и резус-фактора.

Определение группы крови и резус фактора регламентируется приказом Министерства здравоохранения РТ № 1557 от 26.07.2016г. «Об утверждении региональных стандартов в трансфузиологии». Настоящий стандарт распространяется на учреждения здравоохранения Республики Татарстан независимо от ведомственной принадлежности.

Антигены групп крови человека - это вещества, несущие признаки генетически чужеродной информации, при попадании в организм вызывающие иммунный ответ (выработку антител). Антигены эритроцитов человека являются структурными образованиями, расположенными на внешней поверхности мембраны эритроцитов, обладающими способностью взаимодействовать с соответствующим АТ, образовывать комплекс АГ-АТ, наследуются от родителей, генотип групп крови в течение жизни не меняется.

Группы крови по системе АВО-антигенный состав крови, определяемый по наличию или отсутствию антигенов А и В на эритроцитах и антител анти-А и анти-В в сыворотке крови человека. Групповые антигены (агглютиногены) А и В - это структурные образования, расположенные на внешней поверхности мембраны эритроцитов, обладающие способностью взаимодействовать с соответствующими антителами и образовывать комплекс антиген-антитело. Естественные анти-А, анти-В антитела (агглютинины) - это иммуноглобулины, которые постоянно находятся в сыворотке крови человека без всякого иммунного стимула. Они являются врожденными (регулярными) и не меняются в течение жизни.

Определение группы крови АВО - это идентификация антигенов и антител с помощью иммунологических стандартов (стандартных изогемагглютинирующих сывороток, или цоликлонов анти-А, анти-В, анти-АВ, стандартных эритроцитов АВО). Перекрестный метод определения группы крови АВО - это метод определения группы крови АВО по одновременному выявлению групповых антигенов А и В и естественных анти-А, анти-В антител, основанный на РПГА. Проводится в клинико-диагностических лабораториях.

Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки - это поликлональные иммунологические стандарты, приготовленные из крови нескольких человек, и содержащие естественные анти-А, анти-В антитела. Предназначены для выявления групповых антигенов А и В. Представляют собой прозрачную жидкость, окрашенную в соответствии с групповой принадлежностью и расфасованную в ампулы или флаконы.

Стандартные эритроциты АВО - это иммунологические стандарты, приготовленные из эритроцитной массы специально отобранных доноров. Предназначены для выявления естественных анти-А, анти-В антител перекрестным методом.

Цоликлоны анти-А, анти-В, анти-АВ - это моноклональные иммунологические стандарты, приготовленные из концентрата асцитной жидкости мышей - носителей анти-А, анти-В гибридом. Предназначены для выявления групповых антигенов А и В. Представляют собой прозрачную жидкость, окрашенную в соответствии с групповой принадлежностью и расфасованную во флаконы.

Номенклатура системы групп крови АВО. В современной классификации принято буквенное обозначение групп крови АВО, которое включает в себя буквенное обозначение антигена (О, А, В или АВ), а также буквенное обозначение антител. По современной классификации антитела обозначают как анти-А и анти-В, (см. таблицу 1).

Таблица 1 - Обозначение групп крови АВО

| Ранее принятое обозначение | Современное обозначение | Международная номенклатура ISBT |
|----------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| O $\alpha\beta$ (I) | O, анти-AB | O |
| A β (II) | A, анти-B | A |
| B α (III) | B, анти-A | B |
| AB0 (IV) | AB0 | AB |

Система Резус - одна из наиболее полиморфных антигенных систем эритроцитов человека. Она включает около 50 серологически различных антигенов, не считая слабых, переходных и парциальных форм. На эритроцитах человека имеются 5 основных антигенов системы Резус (D, C, c, E, e). Наибольшее клиническое значение имеет антиген D. Обладая выраженными иммуногенными свойствами, антиген D в 95% является причиной гемолитической болезни новорожденного, а также причиной тяжелых посттрансфузионных осложнений. Антиген D имеет слабые варианты, объединяемые в группу D. Лица, имеющих антиген D, относят к Rh⁺, не имеющих антиген D относят к Rh⁻.

Перед переливанием крови и ее компонентов определение резус-принадлежности крови реципиента проводится с использованием цоликлона анти-D Супер.

Перед процедурой забора крови на исследование у пациента уточнить его фамилию, имя и отчество. Если состояние реципиента не позволяет провести опрос, идентификация проводится путем сверки данных медицинской документации. Предпочтительнее использовать пробирку вакутейнер, на которую нанести следующую информацию о пациенте: Ф.И.О., дату забора крови, для стационарных больных - номер медицинской карты. Кровь пациента забрать из вены в количестве 3 - 5 мл и переносить в подписанную пробирку. Образцы крови, маркировка которых не соответствует требованиям приказа МЗ РТ запрещается направлять и принимать для исследования в клинко-диагностической лаборатории.

Все манипуляции с кровью необходимо проводить в медицинской одежде с использованием индивидуальных средств защиты (медицинские перчатки, защитные очки или щитки). С любыми образцами крови пациента следует обращаться как с потенциальными переносчиками инфекционных заболеваний.

При направлении на централизованное переопределение в лабораторию образец крови пациента сопровождается направлением. Предтрансфузионный образец крови реципиента хранят при температуре t +2 °C...+8 °C в течение 5 суток.

Методы определения группы крови по системе АВО

Определение групп крови проводится с помощью соответствующих реагентов. Прежде чем приступить к исследованию, необходимо произвести макроскопическую оценку диагностических стандартов: реактивы должны быть прозрачными, без осадка и других признаков загрязнения; вскрытые ампулы (флаконы) должны быть закрытыми для предотвращения подсыхания содержимого. Проверить срок годности реактивов с даты изготовления, указанной на этикетке, и со дня вскрытия реактива (срок годности флакона (ампулы))

1. Определение основных групп группы крови АВО в лабораториях проводят перекрестным методом при помощи стандартных сывороток АВО и стандартных эритроцитов АВО.

Порядок проведения исследования:

Определение группы крови АВО производят на планшете со смачиваемой поверхностью. Необходимо промаркировать планшет, для чего указать Ф.И.О. пациента, кровь которого исследуют, а также надписать специфичность изогемагглютинирующих сывороток АВО и стандартных эритроцитов АВО в порядке их нанесения. Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки АВО раскапать в два ряда: в первом ряду сыворотки одной серии О (анти-АВ), А (анти-В), В (анти-А), во втором ряду сыворотки другой серии О (анти-АВ), А (анти-В), В (анти-А) по одной большой капле (по 100 мкл) под соответствующими надписями. В третий ряд раскапать по одной маленькой капле (10 мкл) стандартных эритроцитов О, А, В под соответствующими надписями. Из пробирки с исследуемой кровью осторожно взять пипеткой сыворотку крови пациента (100 мкл) и поместить рядом со стандартными эритроцитами АВО, соотношение стандартных эритроцитов и исследуемой сыворотки - 1:10. Этой же пипеткой из пробирки взять исследуемые эритроциты (10 мкл) и поместить рядом со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками АВО, соотношение исследуемых эритроцитов и стандартных сывороток - 1:10 (см. рисунок).

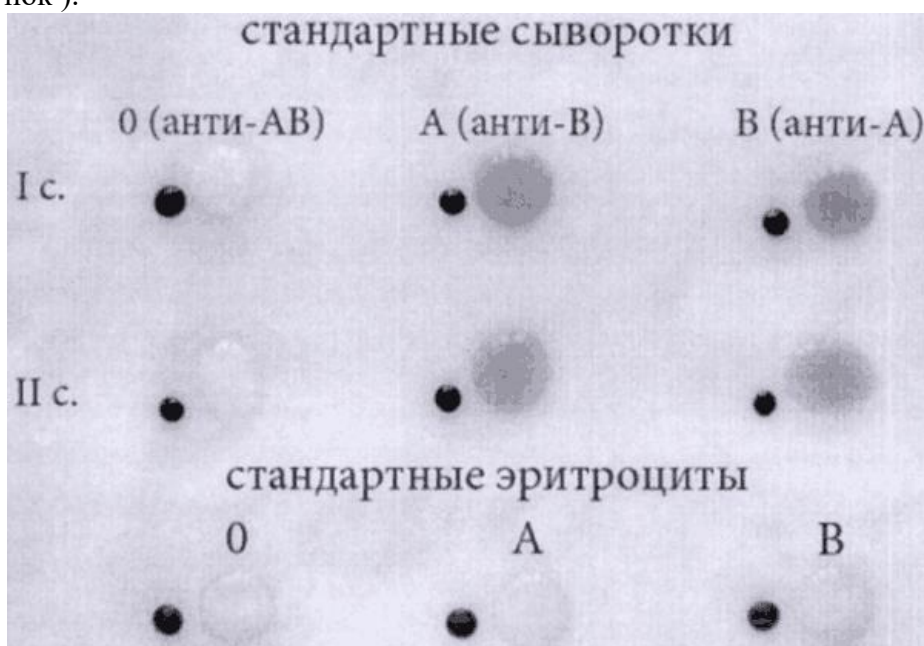


Рисунок Порядок расположения стандартных изогемагглютинирующих сывороток АВО, стандартных эритроцитов АВО и соотношение с исследуемой кровью

Каждую каплю исследуемого материала перемешать стеклянной палочкой с соответствующим диагностическим стандартом. Наблюдать за реакцией 5 минут, при постоянном покачивании планшета. После окончания экспозиции в те капли, где имеется агглютинация, добавить по одной капле (50 мкл) раствора натрия хлорида, 0,9%.

Трактовка результатов реакции.

Положительный результат (+) выражается в агглютинации эритроцитов, агглютинаты видны невооруженным глазом в виде мелких или крупных красных агрегатов. При отрицательном результате (-) капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинации в ней не обнаруживается. Результаты могут быть выражены в 4-х различных комбинациях:

а) Исследуемая кровь принадлежит к группе О, если в реакции со всеми стандартными изогемагглютинирующими сыворотками АВО и стандартными эритроцитами О получены отрицательные результаты, а положительные результаты получены в реакции со стандартными эритроцитами А и В (см. рисунок).



Рисунок . Исследуемая кровь группы O, анти-AB

б) Исследуемая кровь принадлежит к группе A, если в реакциях со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками O (анти-AB), B (анти-A) и со стандартными эритроцитами B получены положительные результаты, а отрицательные результаты получены в реакциях со стандартной изогемагглютинирующей сывороткой A (анти-B) и стандартными эритроцитами O и A (см.рисунок).

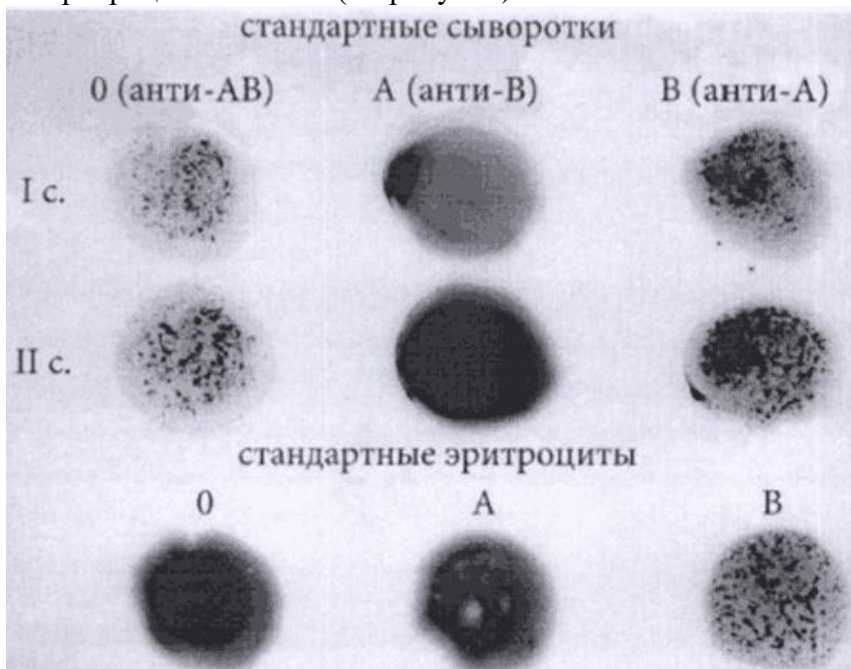


Рисунок . Исследуемая кровь группы A, анти-B

в) Исследуемая кровь принадлежит к группе B, если в реакциях со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками O (анти-AB), A (анти-B) и со стандартными эритроцитами A получены положительные результаты, а отрицательные результаты получены в реакциях со стандартной изогемагглютинирующей сывороткой B (анти-A) и стандартными эритроцитами O и B (см. рисунок).



Рисунок . Исследуемая кровь группы В, анти-А

г) В тех случаях, когда положительный результат получен со всеми стандартными сыворотками, а со всеми стандартными эритроцитами получен отрицательный результат, для исключения неспецифической агглютинации провести дополнительное контрольное исследование со стандартной изогемагглютинирующей сывороткой АВ группы. Для этого на планшет нанести большую каплю (100 мкл) стандартной изогемагглютинирующей сыворотки АВ, рядом маленькую каплю (10 мкл) исследуемых эритроцитов. Капли перемешать стеклянной палочкой. Наблюдать за реакцией 5 минут при покачивании планшета. Исследуемая кровь принадлежит к группе АВ, если со стандартной изогемагглютинирующей сывороткой АВ получен отрицательный результат (см. рисунок).



Рисунок . Исследуемая кровь группы АВ

2. Определение основных групп группы крови АВО перекрестным методом при помощи цоликлонов анти-А, анти-В, анти-АВ и стандартных эритроцитов АВО.

Порядок проведения исследования:

Определение группы крови АВО производить на планшете со смачиваемой поверхностью. Необходимо промаркировать планшет, для чего указать Ф.И.О. пациента, кровь которого исследуют, а также надписать специфичность цоликлонов анти-АВ, анти-В, анти-А и стандартных эритроцитов АВО в порядке их нанесения. Цоликлоны анти-АВ, анти-В, анти-А раскатать в один ряд по одной большой капле (по 100 мкл) под соответствующими надписями. Во второй ряд раскатать по одной маленькой капле (10 - 30 мкл) стандартных эритроцитов О, А, В групп. Из пробирки с исследуемой кровью осторожно взять пипеткой сыворотку крови пациента (100 мкл) и поместить рядом со стандартными эритроцитами АВО, соотношение стандартных эритроцитов и исследуемой сыворотки - 1:10. Этой же пипеткой из пробирки взять исследуемые эритроциты (10 - 30 мкл) и поместить рядом с цоликлонами анти-АВ, анти-В, анти-А, соотношение исследуемых эритроцитов и цоликлонов - 1:10 или 3:10 (см. рисунок).

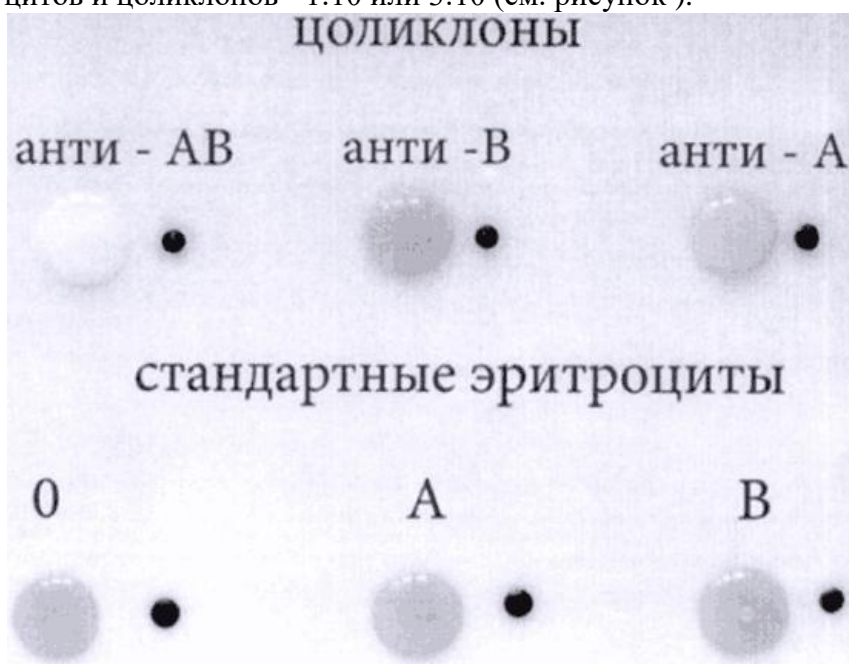


Рисунок. Порядок расположения цоликлонов и стандартных эритроцитов АВО и соотношение с исследуемыми эритроцитами

Каждую каплю исследуемого материала перемешать стеклянной палочкой с соответствующим диагностическим стандартом. Наблюдать за реакцией 3 минуты, при постоянном покачивании планшета. Трактовка результатов реакции. Положительный результат (+) выражается в агглютинации эритроцитов, агглютинаты видны невооруженным глазом в виде мелких или крупных красных агрегатов, быстро сливающихся в крупные хлопья. При отрицательном результате (-) капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинации в ней не обнаруживается. Результаты могут быть выражены в 4-х различных комбинациях.

а) Исследуемая кровь принадлежит к группе О, если в реакции со всеми цоликлонами и стандартными эритроцитами О получены отрицательные результаты, а положительные результаты получены в реакции со стандартными эритроцитами А и В (см. рисунок).

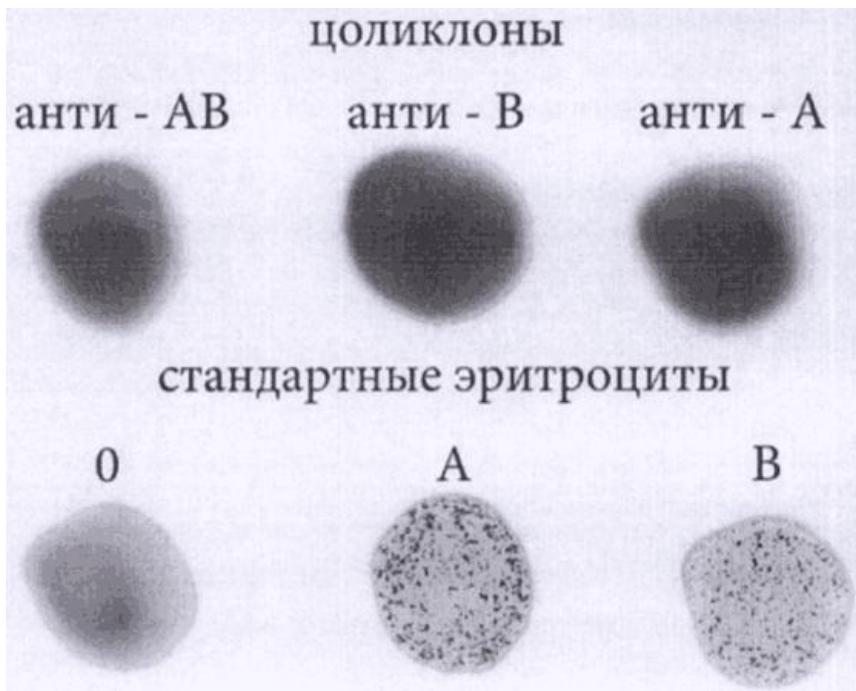


Рисунок . Исследуемая кровь группы О, анти-AB

б) Исследуемая кровь принадлежит к группе А, если в реакции с целиклонами анти-А и анти-AB и со стандартными эритроцитами В получены положительные результаты, а отрицательные результаты получены в реакциях с целиклоном анти-В и стандартными эритроцитами О и А (см. рисунок).



Рисунок . Исследуемая кровь группы А, анти-В

в) Исследуемая кровь принадлежит к группе В, если в реакции с целиклонами анти-В и анти-AB и со стандартными эритроцитами А получены положительные результаты, а отрицательные результаты получены в реакциях с целиклоном анти-А и стандартными эритроцитами О и В (см. рисунок).

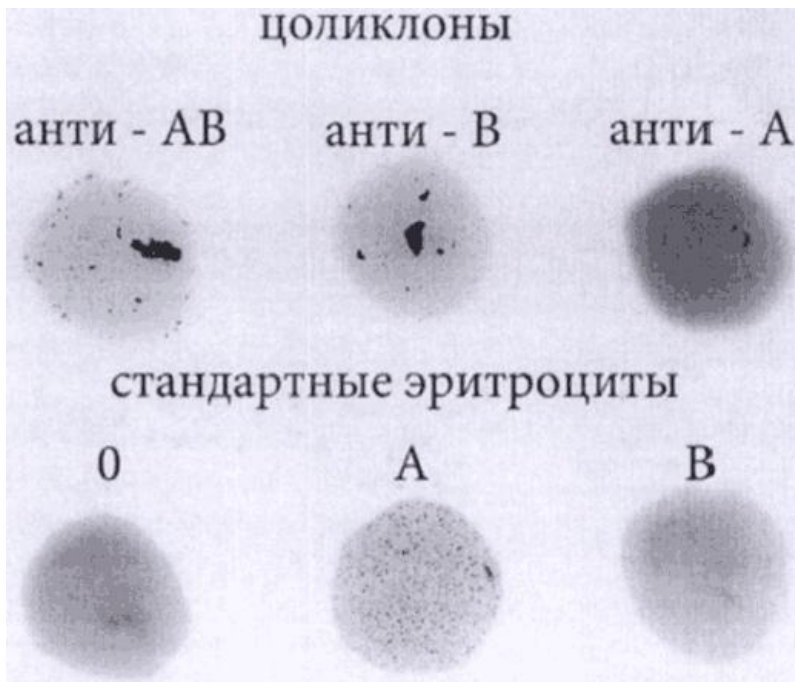


Рисунок . Исследуемая кровь группы В, анти-А

г) В тех случаях, когда положительный результат получен со всеми цоликлонами, а со всеми стандартными эритроцитами получен отрицательный результат, провести дополнительное контрольное исследование с раствором натрия хлорида, 0,9% (для исключения неспецифической агглютинации). Для этого на планшет нанести большую каплю (100 мкл) раствора натрия хлорида, 0,9%, рядом добавить маленькую каплю (10 - 30 мкл) исследуемых эритроцитов. Капли перемешать стеклянной палочкой. Наблюдать за реакцией 5 минут. Исследуемая кровь принадлежит к группе АВ, если с раствором натрия хлорида, 0,9% получен отрицательный результат (см. рисунок).



Рисунок . Исследуемая кровь группы АВ

Методы определения резус-принадлежности

Резус-принадлежность определяется в реакции агглютинации с помощью моноклональных реагентов в реакции прямой агглютинации на плоскости

Техника определения резус-принадлежности при помощи цоликлона анти-D Супер. Необходимо промаркировать планшет, для чего указать Ф.И.О. пациента, кровь которого исследуют. На планшет нанести одну большую каплю (100 мкл) цоликлона анти-D Супер.

Рядом нанести одну маленькую каплю (10 мкл) исследуемых эритроцитов. Перемешать стеклянной палочкой. Через 10 - 20 секунд пластину мягко покачать. Наблюдать за реакцией три минуты. Через три минуты считать результат реакции. Трактовка результатов производится по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов. Положительный результат (+) выражается в агглютинации эритроцитов, агглютинаты видны невооруженным глазом в виде мелких или крупных агрегатов. Кровь относится к Rh0(D) + (полож.) (см. рисунок).

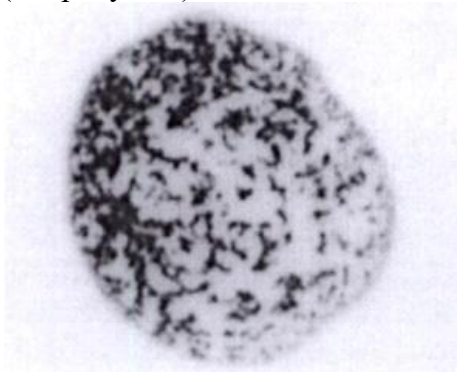


Рисунок Исследуемая кровь Rh0(D)+ (положительная)

При отрицательном результате (-) капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинации в ней не обнаруживается. Кровь Rh0(D) - (отр.) (см. рисунок).

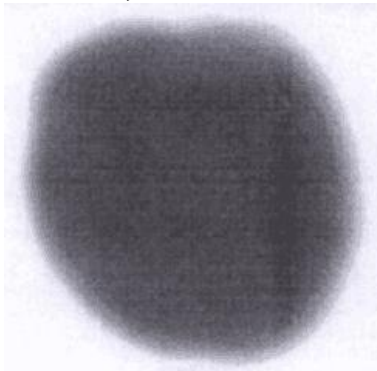


Рисунок. Исследуемая кровь Rh0(D) - (отрицательная)

!!! ЗАДАНИЕ – на ниже представленных рисунках определить группы крови и прислать ответы с указанием номера рисунка и соответствующей ей группы крови в срок до 25.04.2020г. (присланные позже рассматриваться не будут !!!) НА ЭЛ. АДРЕС mirsaitova73@mail.ru

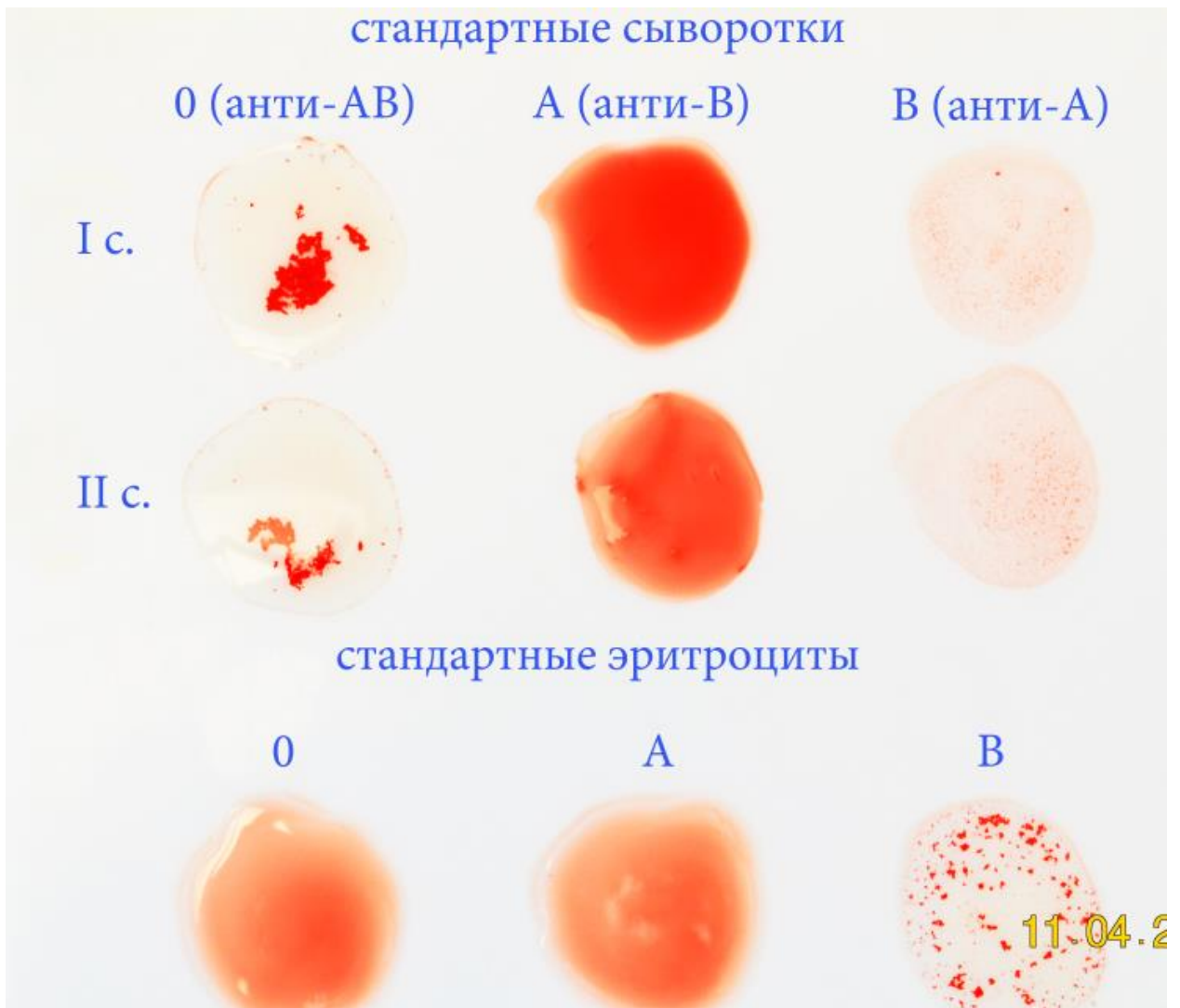


Рисунок 1.

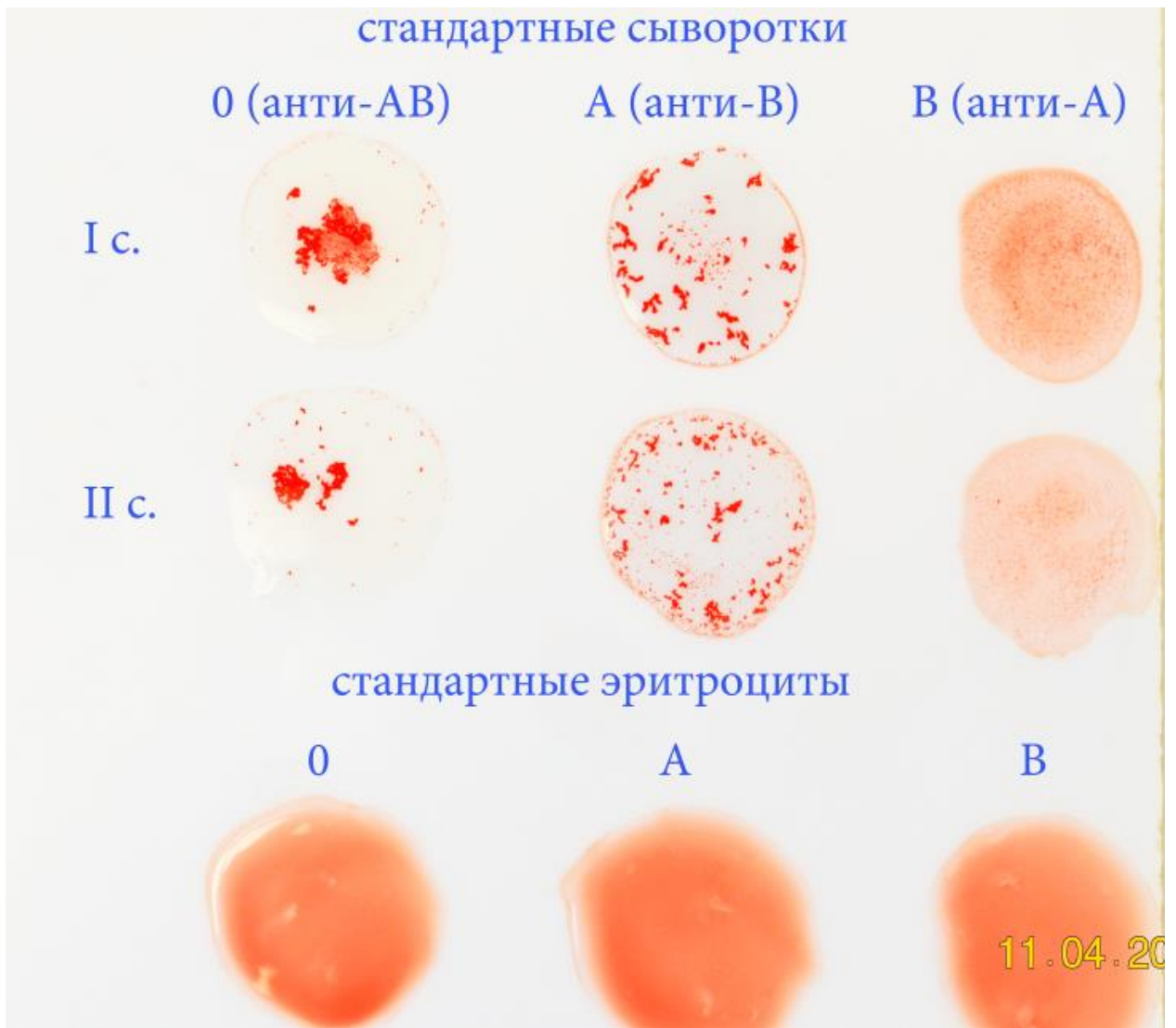


Рисунок 2.

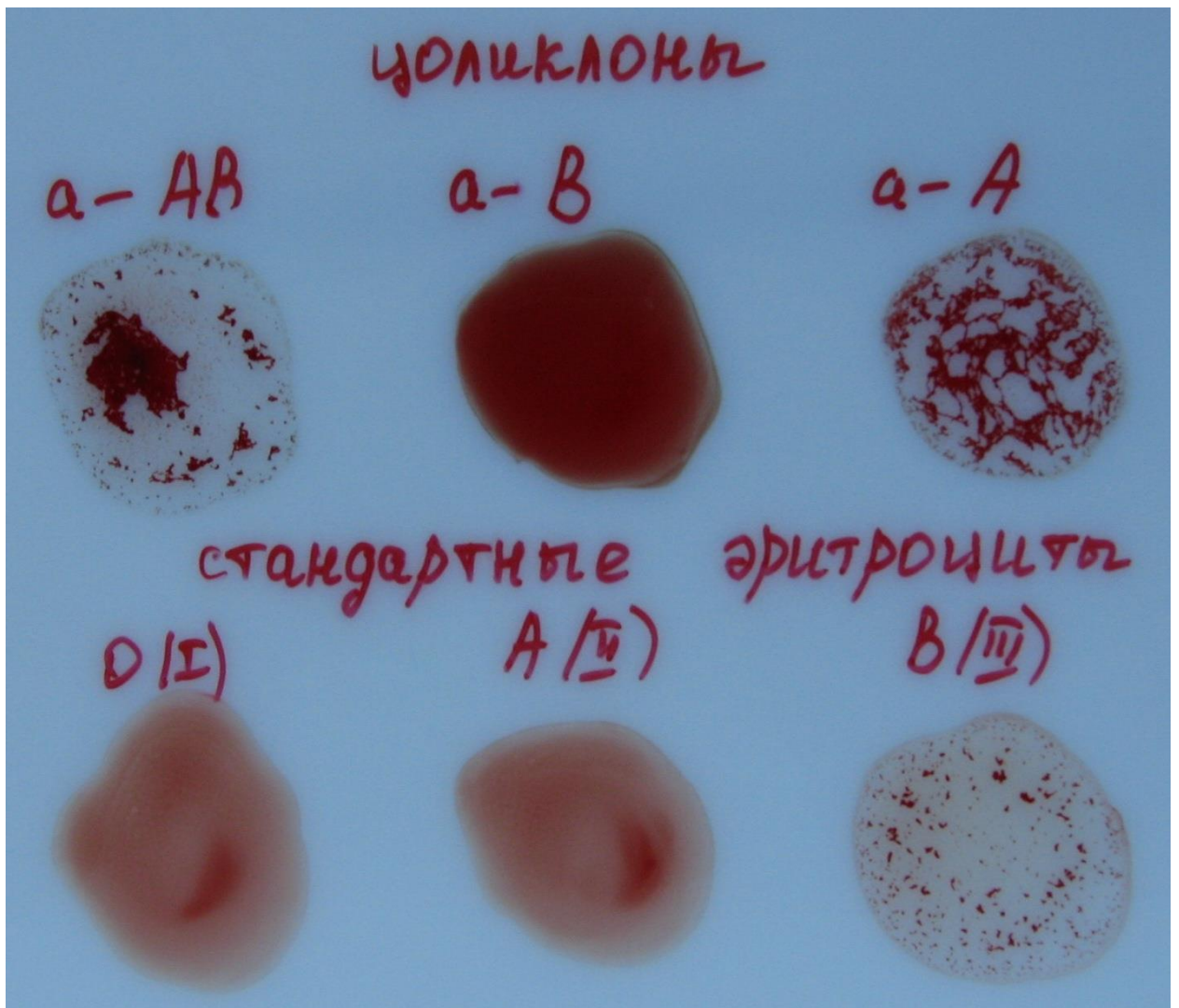


Рисунок 3.

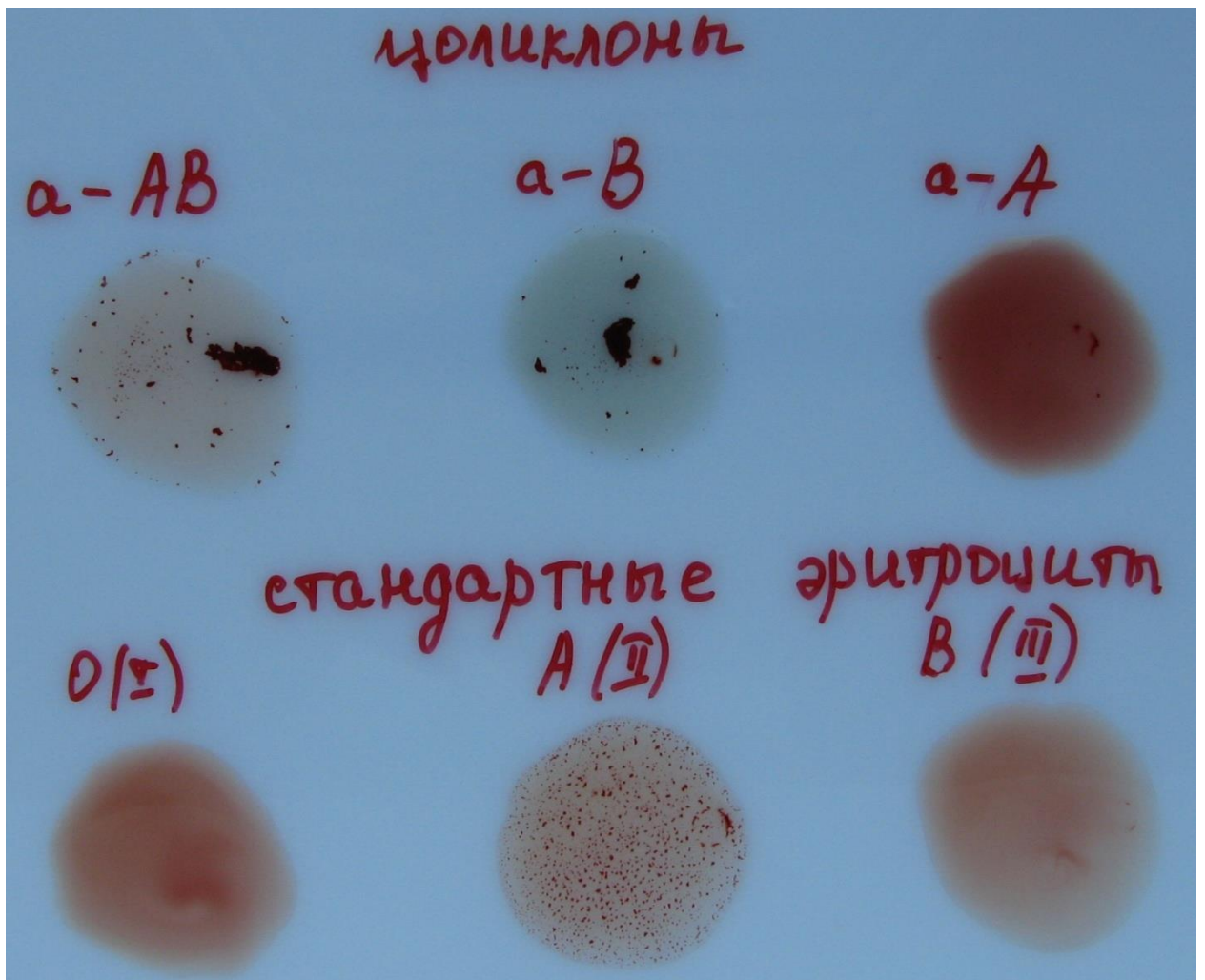


Рисунок 4.

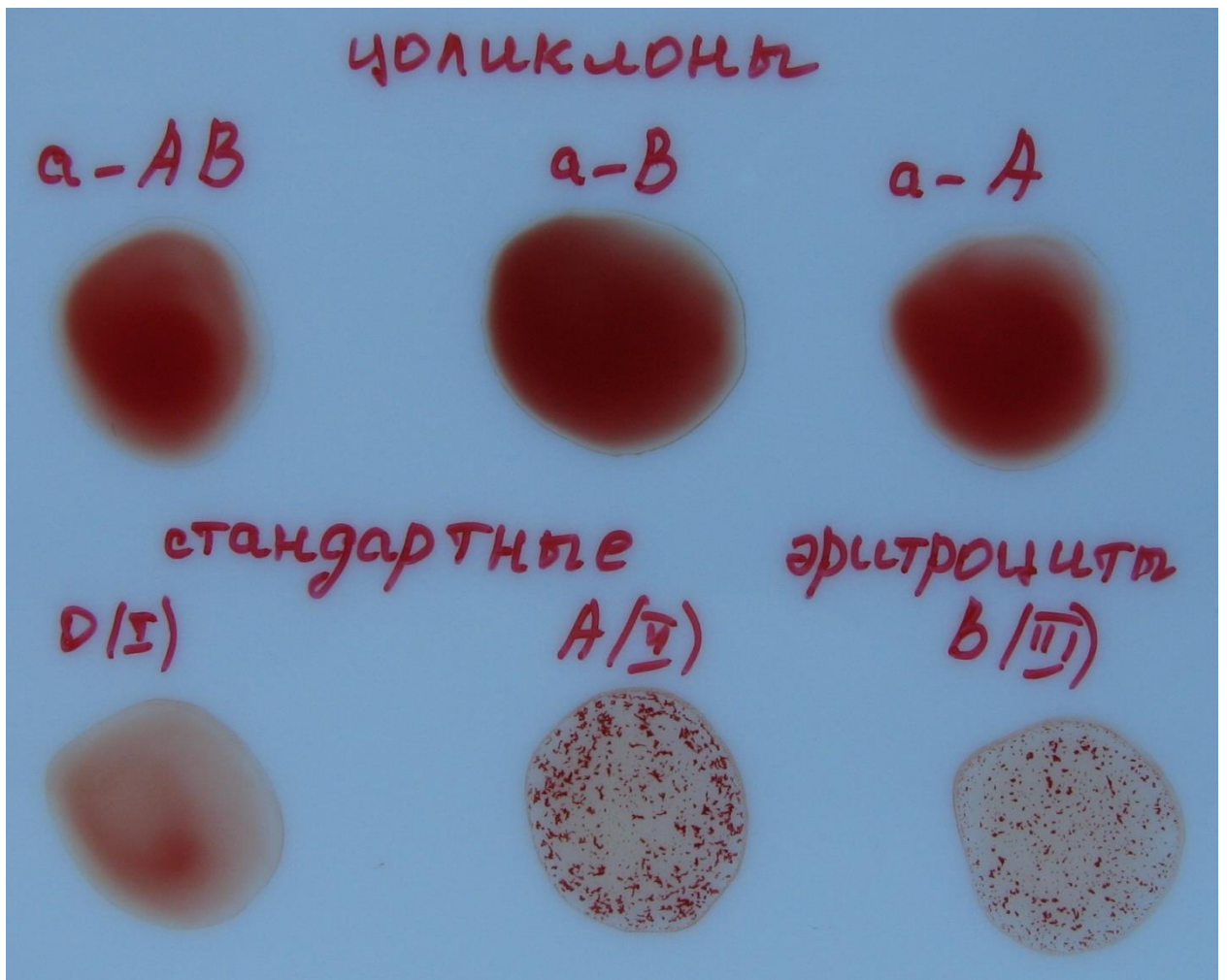


Рисунок 5.