

Розділ 7 ТРАНСФУЗІЙНА ІМУНОЛОГІЯ ЕРИТРОЦИТІВ

ЗМІСТ

7.1. Імуногематологічні дослідження донорів крові.....	179
7.2. Консультаційні аналізи для реципієнтів	180
7.2.1. Обстеження у консультаційній лабораторії.....	181
7.3. Основна апаратура, лабораторне устаткування та реактиви	181
7.3.1. Апаратура.....	181
7.3.1.1. Калібрування центрифуг для імуногематологічних аналізів	182
7.3.1.1.1. Калібрування центрифуги для тесту прямої аглютинації	182
7.3.1.1.2. Калібрування центрифуги для антиглобулінових тестів	183
7.3.2. Лабораторне устаткування	183
7.3.3. Реактиви	184
7.3.3.1. 0,15 моль/л розчин NaCl із рН 6,6–7,6	184
7.3.3.2. Розчин низької іонної сили NaCl 0,03 моль/л (розчин LISS)	184
7.3.3.3. Розчин папаїну, активованого цистеїн гідрохлоридом	184
7.3.3.3.1. Склад	184
7.3.3.3.2. Виготовлення папаїнового реактиву	184
7.3.3.4. Розчин папаїну, активованого цистеїн гідрохлоридом з додаванням цистину.....	185
7.3.3.4.1. Склад реактиву	185
7.3.3.4.2. Приготування реактиву.....	185
7.3.3.4.3. Контроль активності папаїнових реактивів	185
7.3.3.5. Розчин EDTA-натрію (EDTA-Na ₂)	186
7.3.3.6. Розчин тромбіну	186
7.3.3.7. Розчин полібрелу.....	186
7.3.3.8. Розчин МЕР для руйнування аутоантитіл на еритроцитах перед використанням їх для аутоадсорбції	186
7.3.3.9. Розчини для диференціації антитіл IgG та IgM.....	186
7.3.3.9.1. Розчин димеркаптоетанолу (2ME).....	186
7.3.3.9.2. Розчин дитіотреїтолу (DTT)	186
7.3.3.10. Розчин хлорохін фосфату	186
7.3.3.11. Розчин кислого гліцину та EDTA.....	187
7.3.3.12. Стандарт анти-D.....	187
7.3.3.13. Розчини для зберігання еритроцитів	187
7.3.3.13.1. Модифікований розчин Альсєвера	187
7.3.3.13.2. Розчин із додаванням сироватки людини.....	187
7.3.3.14. Зберігання еритроцитів у замороженому стані	188
7.3.3.14.1. Зберігання еритроцитів, заморожених із гліцином	188
7.3.3.14.1.1. Склад розчину для заморожування еритроцитів.....	188
7.3.3.14.1.2. Заморожування еритроцитів	188
7.3.3.14.1.3. Розчини для відмивання розморожених еритроцитів	188
7.3.3.14.1.4. Розморожування еритроцитів	188
7.3.3.15. Бактерицидні засоби, що застосовуються для консервації зразків сироваток	189
7.3.3.15.1. Розчин тіомерсалу	189
7.3.3.15.2. Розчин натрію азиду.....	189
7.3.4. Основний набір діагностичних реактивів	189
7.3.4.1. Витяжки з насіння	190
7.3.4.1.1. Основний набір лектинів.....	190
7.3.4.1.2. Виготовлення витяжки з насіння	190
7.4. Принципи взяття крові, її зберігання та підготовки до аналізів.....	190
7.4.1. Взяття крові для імуногематологічних аналізів	190

7.4.2. Взяття крові для генетичних аналізів.....	191
7.4.3. Загальні принципи документації та виконання аналізів	191
7.5. Методики серологічних аналізів	195
7.5.1. Зависі еритроцитів	195
7.5.1.1. Завись еритроцитів у розчині NaCl	195
7.5.1.2. Завись еритроцитів, оброблених папаїном	195
7.5.1.2.1. Приготування еритроцитів, оброблених папаїном.....	195
7.5.2. Ензимні (ферментні) тести.....	195
7.5.2.1. Ензимний тест низької іонної сили (LEN).....	195
7.5.2.2. Пробірковий тест з еритроцитами, обробленими папаїном (двоступеневий папаїновий тест)	196
7.5.3. Полібреновий тест	196
7.5.3.1. Реактиви для полібренового тесту.....	196
7.5.3.1.1. Розчин низької іонної сили (LIM).....	196
7.5.3.1.2. 10% полібрен у буферному розчині NaCl	196
7.5.3.1.3. Розчин для приготування зависі еритроцитів (RS)	196
7.5.3.2. Проведення аналізу	196
7.5.4. Антиглобулінові тести	197
7.5.4.1. Антиглобулінові тести у пробірках	197
7.5.4.1.1. Контроль активності антиглобулінового реактиву.....	197
7.5.4.1.1.1. Сенсibilізація еритроцитів	197
7.5.4.1.1.2. Відмивання еритроцитів	197
7.5.4.1.1.3. Аналіз із антиглобуліновим реактивом	197
7.5.4.1.2. Контроль якості центрифуги для автоматичного відмивання еритроцитів	197
7.5.4.1.3. Прямий антиглобуліновий тест (ПАГТ)	198
7.5.4.1.3.1. Проведення аналізу в пробірках	198
7.5.4.1.4. Непрямий антиглобуліновий тест (НАГТ).....	198
7.5.4.1.4.1. Класичний непрямий антиглобуліновий тест (НАГТ-NaCl).....	198
7.5.4.1.4.2. Непрямий антиглобуліновий тест із застосуванням розчину низької іонної сили (НАГТ-LISS)	199
7.5.4.1.4.2.1. Підготовка еритроцитів	199
7.5.4.1.4.2.2. Проведення тесту НАГТ-LISS	199
7.5.4.1.4.3. Двоступеневий антиглобуліновий тест із застосуванням методики LISS	199
7.5.4.1.4.4. Непрямий антиглобуліновий тест із застосуванням поліетиленгліколю (НАГТ-PEG).....	200
7.5.4.1.4.4.1. Реактиви	200
7.5.4.1.4.4.2. Проведення аналізу	200
7.5.4.1.5. Контроль негативних результатів антиглобулінового тесту.....	200
7.5.4.1.5.1. Принцип методу	200
7.5.4.1.5.2. Підготовка еритроцитів, сенсibilізованих відповідним чином	200
7.5.4.1.5.3. Інтерпретація результату	201
7.5.4.1.5.4. Контроль ймовірності негативного результату антиглобулінового тесту.....	201
7.5.4.1.6. Джерела помилок в антиглобуліновому тесті у пробірках.....	201
7.5.4.1.6.1. Найбільш поширені причини псевдопозитивних результатів	201
7.5.4.1.6.2. Найбільш поширені причини псевдонегативних результатів	201
7.5.5. Визначення титру антитіл у сироватці	202
7.5.5.1. Принцип дослідження	202
7.5.5.2. Метод у пробірках.....	202
7.5.5.3. Метод мікроколонок	202
7.5.6. Виявлення речовини АВН у слині.....	203
7.5.6.1. Підготовка слини до аналізу	203
7.5.6.2. Проведення аналізу	203
7.5.7. Відокремлення двох популяцій еритроцитів	204
7.5.7.1. Приклад двох популяцій еритроцитів груп АВ та А	204
7.5.7.2. Спосіб дій.....	204
7.5.7.3. Вивільнення еритроцитів з аглютинатів, отриманих під час розділення двох популяцій	204
7.5.8. Метод відокремлення перелитих еритроцитів від аутологічних.....	204
7.5.8.1. Спосіб дій.....	204
7.5.9. Адсорбція/елюція антитіл	205

7.5.9.1. Адсорбція антитіл	205
7.5.9.2. Методики елюції антитіл	206
7.5.9.2.1. Тепловий метод	206
7.5.9.2.2. Ефірно-тепловий метод	206
7.5.9.2.3. Метод із застосуванням кислого гліцину та EDTA	206
7.5.10. Виділення аутоантитіл із метою вивільнення антигенових детермінант на еритроцитах	207
7.5.10.1. Метод із застосуванням хлорохін фосфату	207
7.5.10.2. Метод із застосуванням кислого гліцину та EDTA	207
7.5.11. Адсорбція аутоантитіл із сироватки	207
7.5.11.1. Аутоадсорбція	208
7.5.11.1.1. Метод аутоадсорбції зі застосуванням еритроцитів, оброблених кислим гліцином, EDTA та папаїновим реактивом	208
7.5.11.1.1.1. Підготовка еритроцитів до аутоадсорбції	208
7.5.11.1.1.2. Виконання аутоадсорбції	208
7.5.11.1.1.3. Контроль аутоадсорбції	208
7.5.11.1.2. Метод аутоадсорбції із застосуванням еритроцитів, оброблених розчином МЕР	209
7.5.11.1.3. Метод аутоадсорбції у середовищі 20% PEG	209
7.5.11.1.3.1. Проведення адсорбції	209
7.5.11.1.3.2. Контроль результативності аутоадсорбції	209
7.5.11.2. Алоадсорбція	209
7.5.11.2.1. Алоадсорбція аутоантитіл у середовищі 20% PEG	210
7.5.11.2.1.1. Проведення алоадсорбції	210
7.5.11.2.1.2. Контроль результативності алоадсорбції	210
7.5.11.2.2. Алоадсорбція аутоантитіл еритроцитами, обробленими папаїном	210
7.5.11.2.2.1. Проведення алоадсорбції	210
7.5.11.2.2.2. Контроль результативності алоадсорбції	210
7.5.12. Диференціація антитіл IgG та IgM	211
7.5.12.1. Обробка сироватки 2МЕ	211
7.5.12.2. Обробка сироватки DTT	211
7.5.13. Виявлення дефекту в оболонці еритроцитів за допомогою полібрену	211
7.5.13.1. Підготовка еритроцитів	211
7.5.13.2. Проведення аналізу	212
7.5.13.3. Інтерпретація результатів	212
7.5.14. Колонкові (гельові) мікрометоди	212
7.5.15. Автоматизація в імуногематологічних дослідженнях	212
7.5.15.1. Автоматичні лінії	213
7.5.15.2. Напівавтомати	213
7.5.15.3. Випробування автоматичних ліній	213
7.5.15.4. Випробування реактивів, що застосовуються в автоматичних аналізах	213
7.5.15.5. Щоденний контроль автоматичних аналізів	213
7.5.15.6. Архівування операційних даних	213
7.6. Аналізи антигенів і антитіл групових систем еритроцитів у донорів та у пацієнтів	214
7.6.1. Аналіз груп крові за системою АВ0	214
7.6.1.1. Набір діагностичних реактивів і стандартних еритроцитів	214
7.6.1.1.1. Реактиви	214
7.6.1.1.2. Стандартні еритроцити	214
7.6.1.1.3. Контроль комплекту реактивів і стандартних еритроцитів	214
7.6.1.2. Порядок проведення аналізу груп крові АВ0	215
7.6.1.3. Визначення антигену A ₁ на еритроцитах, призначених для аналізу АВ0	215
7.6.1.4. Причини відхилень від класичної схеми оцінки результатів аналізів груп крові АВ0	216
7.6.1.4.1. Технічні помилки	216
7.6.1.4.2. Нетипові властивості аналізованих еритроцитів або сироваток	216
7.6.1.5. Слабкі різновиди антигенів за системою АВ0	216
7.6.1.6. Наявність двох популяцій еритроцитів	217
7.6.1.7. Поляглютинація	218
7.6.1.8. Наявність алогемолізинів	218
7.6.1.9. Значне зниження рівня алоаглютининів АВ0 або їх відсутність	219
7.6.1.9.1. Порядок дій у разі значного зниження рівня алоаглютининів АВ0	219

або їх відсутності	219
7.6.1.10. Рулонізація еритроцитів («монетні» стовпчики)	219
7.6.1.10.1. Порядок дій у разі підозри на рулонізацію	219
7.6.1.11. Наявність неочікуваних алоантитіл	219
7.6.1.11.1. Наявність антитіл анти- A_1	219
7.6.1.11.2. Наявність інших алоантитіл	219
7.6.1.12. Аутоаглютинація	220
7.6.1.12.1. Порядок дій	220
7.6.2. Визначення груп крові за системою АВ0 у новонароджених та немовлят	221
7.6.2.1. Порядок дій	221
7.6.3. Аналіз антигену D	221
7.6.3.1. Визначення антигену D у донорів	221
7.6.3.1.1. Інтерпретація результатів аналізів	222
7.6.3.1.2. Труднощі в інтерпретації результатів аналізів антигену D	222
7.6.3.1.2.1. Слабка аглютинація аналізованих еритроцитів із реактивами анти-D	222
7.6.3.1.2.2. Категорії антигену D (D частковий)	222
7.6.3.2. Визначення антигену D у реципієнтів крові та в жінок до періоду менопаузи	223
7.6.3.2.1. Інтерпретація результатів аналізів	223
7.6.3.2.2. Труднощі в інтерпретації результатів аналізів антигену D	223
7.6.3.2.2.1. Позитивний результат реакції з одним із реактивів анти-D, негативний результат з іншим реактивом анти-D або слабка аглютинація аналізованих еритроцитів з обома реактивами	223
7.6.3.3. Дві популяції еритроцитів унаслідок недавньої трансфузії	223
7.6.4. Визначення антигенів еритроцитів різних групових систем та їх документування	224
7.6.4.1. Визначення фенотипу Rh	224
7.6.4.2. Визначення фенотипів в інших групових системах	225
7.6.4.3. Популяція донорів із визначеними антигенами еритроцитів для потреб гемотерапії	225
7.6.5. Виявлення імунних антитіл	226
7.6.5.1. Виявлення антитіл у реципієнтів крові, вагітних жінок, а також у донорів та реципієнтів кровотворних стовбурових клітин	226
7.6.5.2. Виявлення антитіл у донорів крові	226
7.6.6. Визначення специфічності антитіл	226
7.6.7. Порядок дій з кров'ю донорів, у яких виявлено імунні антитіла	227
7.6.7.1. Кваліфікування плазми з антитілами на виробництво препаратів крові	227
7.7. Проба серологічної сумісності між реципієнтом та донором перед переливанням крові	228
7.7.1. Основні імуногематологічні принципи гемотерапії	228
7.7.2. Відхилення від принципів	228
7.7.2.1. Вибір еритроцитовмісних компонентів групи 0 для переливання пацієнтам з іншою групою	228
7.7.2.2. Вибір еритроцитовмісних компонентів групи А або В для переливання пацієнтам із групою АВ	228
7.7.2.3. Вибір крові для масивних переливань	228
7.7.3. Проба сумісності	229
7.7.3.1. Кров реципієнта	229
7.7.3.2. Кров донора	230
7.7.3.3. Порядок дій, якщо результат аналізу групи крові реципієнта не відповідає даним, зазначеним у направленні	231
7.7.3.4. Порядок дій, якщо результат аналізу групи крові зі зразка, взятого із сегмента дренажної трубки, не відповідає даним на етикетці контейнера	231
7.7.3.5. Виконання проби сумісності у пробірковому тесті	231
7.7.3.6. Інтерпретація результатів проби сумісності	232
7.7.3.7. Формулювання результатів проб сумісності	233
7.7.3.8. Вибір крові для термінової трансфузії в ургентних випадках	234
7.7.4. Аналізи, що робляться перед переливанням крові новонародженим та немовлятам до 4-х місяців	234
7.7.5. Аналізи, що робляться перед аутотрансфузією	236
7.8. Імунологічний аналіз гемолітичних післятрансфузійних реакцій	236
7.8.1. Рання реакція	236

7.8.2. Відстрочена реакція	237
7.9. Імуногематологічні аналізи у діагностиці гемолітичної хвороби плода і новонародженого (ГХПН)	238
7.9.1. Аналізи під час вагітності	238
7.9.1.1. Виявлення антитіл системи Rh та інших групових систем.....	239
7.9.1.2. Ідентифікація алоантитіл.....	239
7.9.1.3. Визначення титру антитіл	239
7.9.1.3.1. Інтерпретація результатів аналізів.....	240
7.9.1.4. Аналізи крові батька дитини.....	240
7.9.1.5. Серологічні аналізи еритроцитів плода	240
7.9.2. Аналізи після пологів	241
7.9.2.1. Кров матері	241
7.9.2.2. Кров новонародженого	241
7.9.2.3. Діагностика ГХПН	241
7.9.2.4. Діагностика ГХПН при АВ0-конфлікті	242
7.9.2.4.1. Пошук антитіл IgG анти-А/анти-В у сироватці матері.....	242
7.9.2.4.2. Аналізи в новонародженого	242
7.9.2.4.3. Елюція антитіл методом Луї	242
7.9.2.5. Діагностика ГХПН у рідкісному серологічному конфлікті	242
7.9.2.5.1. Антитіла до антигенів з низькою частотою поширення.....	243
7.9.2.5.2. Антитіла до поширених антигенів	243
7.9.3. Принципи вибору крові для трансфузії у плід та обмінної трансфузії	243
7.9.3.1. Вибір крові для трансфузії у плід.....	243
7.9.3.2. Вибір крові для обмінної трансфузії.....	243
7.9.3.3. Проба серологічної сумісності	244
7.9.4. Лабораторні аналізи, пов'язані з профілактикою конфлікту за антигеном D системи Rh	244
7.9.4.1. Виявлення еритроцитів плода у кровообігу матері: тест кислотної елюації модифікованим методом Клейхауера-Бетке	245
7.9.4.1.1. Реактиви	245
7.9.4.1.2. Виконання аналізу.....	245
7.9.4.1.3. Інтерпретація результату	246
7.9.4.2. Інші методи виявлення еритроцитів плода у кровообігу матері	246
7.10. Аналізи при аутоімунній гемолітичній анемії (АІГА).....	246
7.10.1. АІГА з аутоантитілами теплового типу.....	246
7.10.2. АІГА з аутоантитілами холододового типу.....	246
7.10.2.1. Диференціація аутоантитіл холододового типу системи I: природні та клінічно важливі.....	246
7.10.2.1.1. Спосіб дій.....	247
7.10.3. Пароксизмальна холодова гемоглобінурія (ПХГ).....	247
7.10.3.1. Підготовка матеріалу до аналізів.....	247
7.10.3.2. Виконання аналізу.....	247
7.10.3.3. Інтерпретація результатів	248
7.11. Імуногематологічні аналізи, пов'язані з пересадкою кровотворних стовбурових клітин	248
7.11.1. Як чинити у випадках несумісності за системою АВ0 між донором та реципієнтом.....	248
7.11.1.1. Висока несумісність за системою АВ0	249
7.11.1.2. Низька несумісність за системою АВ0	249
7.11.1.3. Водночас висока і низька несумісність за системою АВ0	249
7.11.2. Гемолітичні реакції у хворих із пересадженими стовбуровими клітинами	250
7.11.2.1. Гемолітична реакція у випадку високої несумісності	250
7.11.2.2. Гемолітична реакція у випадку низької несумісності.....	250
7.11.2.3. Аутоімунна гемолітична анемія.....	251
7.11.2.4. Виявлення двох популяцій еритроцитів.....	251
7.12. Принципи постійної документації результатів аналізів груп крові (внесення запису до документів, що посвідчують особу, та до книг реєстру медичних послуг)	251
7.12.1. Спосіб ведення постійної документації груп крові.....	252
7.12.2. Картки груп крові.....	254

7.13. Серологічний контроль якості реактивів, узяті крові та її компонентів.....	255
7.13.1. Контроль діагностичних реактивів для аналізів груп крові	255
7.13.1.2. Контроль реактивів для аналізу антигенів системи АВ0	255
7.13.1.3. Контроль реактивів для аналізу антигену D системи Rh	255
7.13.1.4. Контроль реактивів для аналізу інших антигенів системи Rh.....	255
7.13.1.5. Контроль діагностичних реактивів для аналізу антигенів інших групових систем.....	256
7.13.1.6. Контроль полівалентного антиглобулінового реактиву (анти-IgG + анти-C3d)	256
7.13.1.7. Спосіб дій після оцінки фірмових діагностичних реактивів	256
7.13.2. Контроль розчинів, що застосовуються в аналізах	256
7.13.2.1. Розчин NaCl	256
7.13.2.2. Розчин LISS.....	256
7.13.2.3. Папаїновий реактив	256
7.13.3. Серологічний контроль узяті крові	256
7.13.4. Контроль якості у лабораторії трансфузійної імунології.....	258
7.13.4.1. Контроль якості устаткування.....	258
7.13.4.2. Контроль якості реактивів.....	258
7.13.4.3. Контроль якості методики аналізів.....	258
7.13.4.4. Контроль якості праці	258
7.13.4.4.1. Внутрішній контроль	258
7.13.4.4.2. Зовнішній контроль.....	258
7.13.4.4.3. Підготовка контрольного матеріалу	258
7.13.4.4.4. Завдання для контрольованої лабораторії.....	259
7.13.4.4.5. Завдання для закладу служби крові, який здійснює контроль	259
7.14. Принципи імунізації донорів крові	259
7.14.1. Вказівки щодо лікарських висновків про допустимість імунізації з метою одержання медичних імунобіологічних препаратів.....	259
7.14.2. Принципи взяття крові для імунізації.....	259
7.14.3. Спланована імунізація з метою отримання антитіл анти-D	261
7.14.3.1. Схеми внутрішньовенної імунізації	261
7.14.3.1.1. Виклик первинної імунної відповіді	261
7.14.3.1.2. Стимуляція вторинної імунної відповіді.....	262
7.14.3.2. Документація щодо імунізації донорів	263

Відділ трансфузійної імунології еритроцитів виконує такі функції:

1. Імуногематологічні дослідження — визначення груп крові донорів, пацієнтів і вагітних жінок.

2. Обстеження донорів плазми з антитілами анти-Rh₀(D), призначеної для виготовлення імуноглобуліну анти-D, що застосовується для профілактики резус-конфлікту.

3. Професійний контроль трансфузійних імуногематологічних досліджень та результатів аналізів, що виконуються в лабораторіях, підпорядкованих закладу служби крові (ЗСК).

Контроль здійснюється за рахунок:

- підвищення кваліфікації персоналу лабораторії та отримання свідоцтв, що надають право здійснювати відповідні дослідження;
- проведення зовнішнього контролю якості аналізів та перевірок (здійснюється не рідше ніж раз на рік);
- надання цілодобових консультацій щодо обстеження у сфері трансфузійної імунології для всіх лабораторій, підпорядкованих ЗСК, та лікарень на підзвітній території.

Відділ трансфузійної імунології має складатися:

1) з лабораторії визначення груп крові донорів — «апробації донорів»;

2) з консультаційної лабораторії імунології еритроцитів, яка проводить аналізи для реципієнтів і вагітних жінок;

3) з лабораторії обстеження донорів, які проходять імунізацію антигеном D (вона може бути підпорядкована лабораторії груп крові донорів).

Керівником відділу трансфузійної імунології може бути особа, що має диплом з лабораторної діагностики з досвідом роботи у сфері імуногематологічних досліджень щонайменше 3 роки; рекомендовано мати спеціалізацію з питань трансфузійної імунології та медичної лабораторної трансфузіології.

Керівником лабораторії може бути особа, що має диплом з лабораторної діагностики, здатна самостійно виконувати імуногематологічні дослідження з визначення груп крові. До обов'язків керівника входить забезпечення лабораторії необхідним обладнанням, апаратурою; своєчасне забезпечення реактивами, бланками і журналами для реєстрації результатів аналізів; організація роботи персоналу; здійснення контролю за дослідженнями та їх реєстрацією; організація навчання працівників лабораторії, а також працівників територіальних лабораторій трансфузійної імуногематології.

Професійний нагляд за дослідженнями з трансфузійної імунології, які проводяться у ЗСК, здійснює профільний ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України». Заклади служби крові, у свою чергу, здійснюють спеціалізований контроль за дослідженнями, які проводяться у підпорядкованих їм лабораторіях імуногематології.

Якщо ЗСК уклав із лікарнею, в якій міститься територіальне відділення, договір щодо виконання імуногематологічних аналізів, керівник відділу трансфузійної імунології або вповноважена ним особа зобов'язані двічі на рік здійснювати повноцінну інспекцію лабораторії при закладах охорони здоров'я.

ЗСК встановлює вимоги щодо набору реактивів, у тому числі й стандартних еритроцитів, для виконання аналізів у лабораторіях трансфузійної імунології при закладах охорони здоров'я.

Головний лікар закладу служби крові зобов'язаний забезпечувати цілодобову консультацію щодо обстеження у сфері трансфузійної імунології для лікарень на підзвітній території. Такі консультації має надавати спеціаліст відділу трансфузійної імунології з великим практичним досвідом роботи і теоретичною підготовкою.

Під час виконання аналізів обов'язковим є такий принцип: усі визначення в одному зразку крові здійснює одна особа.

7.1. Імуногематологічні дослідження донорів крові

1. Визначення груп крові за системою АВ0 із використанням 2-х наборів моноклональних реактивів анти-А і анти-В, які походять від різних клонів, та стандартних еритроцитів груп 0, А₁ та В. Можливе використання двох серій від одного клону.

2. Визначення антигену D системи Rh за допомогою 2-х моноклональних реактивів анти-D, що походять від різних клонів і дозволяють виявити слабкий різновид антигену D (D^u), його категорію.

3. Визначення антигену К системи Kell у регулярних, кадрових донорів, а також фенотипу Rh у всіх кадрових донорів групи 0, а за можливості — і у донорів інших груп крові.

4. Визначення антигену К у К-позитивних донорів.

5. Визначення важливих для клінічної практики антигенів інших групових систем у регулярних, кадрових донорів, особливо групи 0.

6. Виявлення та ідентифікація імунних антитіл:

– у первинних донорів;

– у всіх кадрових донорів, які пройшли гемотерапію в період між попередньою та наступною донаціями, а також у жінок, що мають в анамнезі вагітність.

УВАГА!

А. При аналізах груп крові за системою АВ0, коли беруться два зразки донорської крові та використовуються 2 набори моноклональних реактивів, якщо лаборант використовує зразки невідмитих еритроцитів, можливий аналіз одного зразка одним набором реактивів, а другого — іншим.

Б. При визначенні груп крові за системою АВ0 в автоматизованих системах, які забезпечують однозначну ідентифікацію обстежуваного зразка, допускається застосовувати один набір моноклональних реактивів анти-А і анти-В — за умови, що в кожному зразку донорської крові визначають антитіла анти-А і анти-В. Детальні правила наведено у п. 7.5.15.

В. Повний аналіз груп крові за системою АВ0, аналіз антигену D системи Rh, як і всіх інших антигенів, виконується двічі на зразках крові, взятих у різний час.

Г. При роботі з автоматизованими системами можливе застосування для визначення алоаглютининів набору еритроцитів А₁ і В, без урахування еритроцитів групи 0.

Ґ. Внесення записів про групу крові за системою АВ0 та Rh у комп'ютерну систему або в картку донора мусить ґрунтуватися на результатах аналізів двох зразків крові: зразка, взятого в лабораторії, та зразка, взятого безпосередньо після донації у відділі заготівлі крові.

Д. Головний лікар ЗСК після погодження з керівником відділу трансфузійної імунології видає розпорядження стосовно того, в яких саме територіальних відділеннях можливо виконувати імуногематологічні дослідження, наведені у підпунктах 3–5; інші ж територіальні відділення, що не мають відповідних умов, від цих обов'язків звільняються.

Е. Специфічність імунних антитіл, яка визначена у територіальних імуногематологічних лабораторіях, має бути встановлена чи підтверджена в лабораторії ЗСК.

Є. Ідентифікація антитіл холододового типу стосується лише випадків, коли їх виявляють під час визначення груп крові за системою АВ0, і коли реакція відбувається у розширеному тепловому діапазоні (від 30 до 37 °С).

Для аналізів груп крові за системами АВ0, Rh, Kell, Duffy та Kidd застосовуються діагностичні реактиви, в тому числі еритроцити з фенотипом СЄ. Для визначення антигенів інших групових систем можливе використання діагностичних реактивів, й зокрема без еритроцитів із фенотипом СЄ.

Для виявлення іррегулярних (імунних) антитіл використовуються стандартні еритроцити з фенотипом СЄ. Ідентифікація виявлених антитіл можлива за допомогою стандартних еритроцитів з фенотипом СЄ.

Рутинні мануальні імуногематологічні методи можливо замінювати колонковими та автоматичними мікрометодами, описаними у п. 7.5.15, а також іншими методами, перевіреними та затвердженими ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України».

7.2. Консультаційні аналізи для реципієнтів

Аналізи виконують у консультаційній лабораторії ЗСК у випадках, коли територіальні імуногематологічні лабораторії закладів охорони здоров'я стикаються із труднощами. У лабораторію слід передати проаналізований зразок крові та свіжовзятий зразок крові разом із результатами попередніх аналізів, а також клінічними даними хворого (Зразок №7.1). Отриманому зразку крові в лабораторії присвоюють порядковий номер і записують його у журналі аналізів. У невідкладних випадках слід записати також годину надходження зразка та годину видачі результату. Біля прізвища хворого слід зазначити клінічні дані, вказані в направленні на аналіз. Протоколи аналізів мають бути розбірливими, повинні закінчуватися формулюванням результату, зрозумілим для замовника (отримувача); формулювання має збігатися з виданим результатом. У журналі аналізів і на бланку з результатом має бути підпис особи, яка здійснювала аналіз, та підпис особи, яка здійснює контроль за аналізами (керівник лабораторії або вповноважена ним особа). Допускається використовувати бланки, які містять відповідні рубрики щодо протоколів у сфері найчастіше виконуваних аналізів; у формулярах також має залишатися місце для результатів додаткових (непередбачених) аналізів. Дані щодо хворих та результатів аналізів слід вводити в комп'ютер. Допускається паралельно вести документацію в алфавітному порядку.

У неробочий час чергові зобов'язані вести в окремому журналі (журнал рапортів) реєстр виконаних дій, щоразу зазначаючи годину надходження зразка й годину видачі результату. Ці відомості мають щоденно перевірятися керівником лабораторії або вповноваженою особою.

Зразок №7.1

НАПРАВЛЕННЯ на консультаційні імуногематологічні аналізи

(печатка закладу)

Дата: _____

До консультаційної лабораторії
закладу служби крові

Прошу виконати аналіз

Прізвище та ім'я хворого _____

Дата народження або ідентифікаційний номер _____

Діагноз _____

Анамнез (вагітності — дати; переливання крові — дати) _____

Результати імуногематологічних аналізів:

Група крові _____

Імунні антитіла _____

Результат проби сумісності _____

Інше _____

Гематологічні дані:

Еритроцити _____ Hb _____ Ht _____

Білірубін _____ Інше _____

(розбірливий підпис та печатка закладу)

7.2.1. Обстеження у консультаційній лабораторії

У консультаційній лабораторії проводяться такі аналізи:

1. Встановлення групи крові за системою АВ0.
2. Діагностика антигену D за системою Rh, включно з його слабкими різновидами та категоріями.
3. Ідентифікація іррегулярних антитіл.
4. Діагностика аутоімунних гемолітичних анемії (АІГА).
5. Підбір крові для хворих у випадках наявності ауто- та алоантитіл, а також після кожного повідомлення про несумісність у перехресній пробі.
6. Імуногематологічний аналіз посттрансфузійних ускладнень.
7. Визначення фенотипу Rh, антигену К або інших антигенів у імунізованих осіб, а також для запобігання алоімунізації хворих, які потребують багаторазової гемотерапії (наприклад, у разі АІГА).
8. Діагностика імуногематологічного конфлікту між матір'ю та плодом, гемолітичної хвороби плода і новонародженого (ГХПН), а також підбір крові для трансфузії плода, обмінної трансфузії, повнювальної трансфузії.
9. Виконання сімейних аналізів у випадках виявлення рідкісних фенотипів та алоантитіл, спрямованих до поширених антигенів.
10. Аналізи реципієнтів і донорів алогенних трансплантацій, особливо стовбурових клітин кровотворної системи.

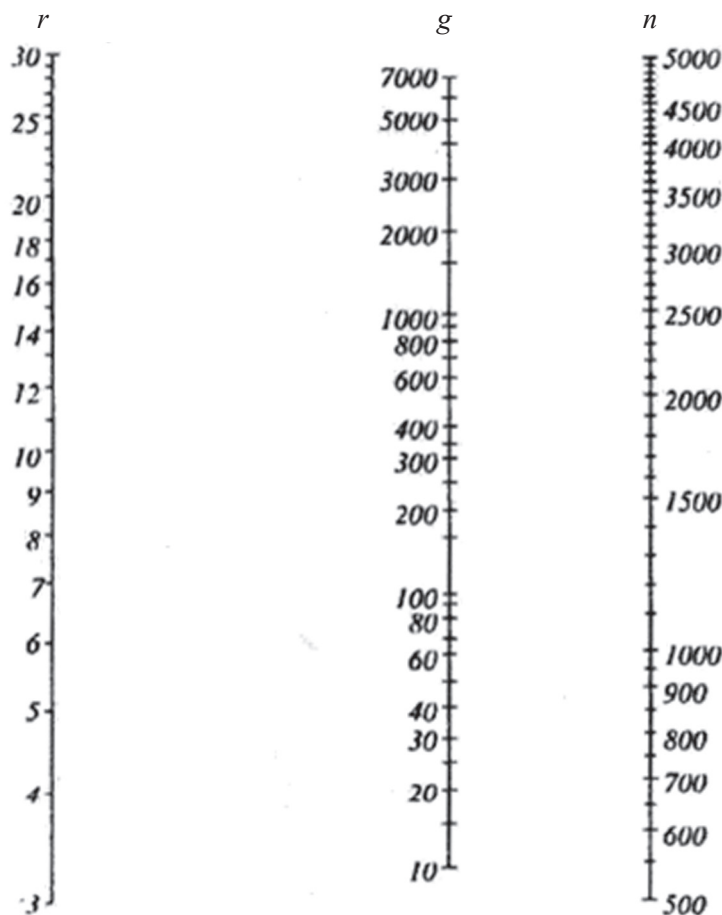
7.3. Основна апаратура, лабораторне устаткування та реактиви

7.3.1. Апаратура

Потрібне таке обладнання:

- холодильник із температурою 2–6 °С;
- морозильна камера з температурою від –20 °С до –80 °С — для зберігання діагностичних сироваток, сироваток хворих, у яких виявлено алоантитіла, а також запасів стандартних еритроцитів та еритроцитів із рідкісними фенотипами;
- термостат;
- повітряний обігрівальний блок із регуляцією температури;
- «водяна баня» із регуляцією температури до 100 °С;
- лабораторна центрифуга з горизонтальним ротором із прискоренням $3850 \times g$ та регуляцією часу центрифугування (рис. 7.1);
- гематокритна центрифуга;
- світловий мікроскоп;
- апаратура для мікроколункових тестів або інших тестів, перевірених та затверджених ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України»;
- автоматизовані лінії для аналізів груп крові.

УВАГА! Кожен холодильник, морозильна камера та термостат мають бути оснащені двома незалежними приладами визначення температури. Обов'язковим є триразовий контроль температури впродовж доби, ведення температурних листків або підключення до комп'ютерного моніторингу температури.



r — радіус центрифуги у см
 n — кількість обертів/хв.

Як користуватися номограмою

- Виміряти радіус (r) центрифуги (відстань від осі центрифуги до дна центрифужного стакана для пробірки).
- На осі r позначити виміряний радіус центрифуги.
- На осі g позначити необхідне значення відносної відцентрової сили (g).
- Використовуючи лінійку, провести пряму через дві позначені точки. Місце перетину прямої з віссю n визначає потрібну кількість обертів/хв.

Рис. 7.1. Номограма для визначення відносної відцентрової сили (g)

7.3.1.1. Калібрування центрифуг для імуногематологічних аналізів

Кожна центрифуга має бути відкалібрована для визначення оптимального режиму (кількості обертів і часу центрифугування), щоб забезпечити максимальну інтенсивність аглютинації та уникнути псевдопозитивних результатів. Калібрувальні вимірювання проводять, застосовуючи режим центрифугування при 2000 об./хв. та 2500 об./хв.

7.3.1.1.1. Калібрування центрифуги для тесту прямої аглютинації

1. Підготувати 2–5% завись еритроцитів А і В у розчині NaCl.
2. Виконати аналіз титру сироватки анти-В та обрати розведення, при якому аглютинація еритроцитів В становить 1+.
3. У 5 пробірок додати по краплі еритроцитів А (негативний контроль); у 5 пробірок додати по краплі еритроцитів В (позитивний контроль).
4. В усі пробірки додати по краплі обраного розведеного анти-В.
5. У центрифугі розмістити дві пробірки, що містять зразки негативного і позитивного контролю.
6. Відцентрифугувати (наприклад, протягом 10 сек.) і визначити інтенсивність аглютинації.
7. Повторити процедуру з черговими парами пробірок, центрифугуючи їх протягом різного часу (наприклад, 15, 20, 30 та 45 сек.).

Інтерпретація результатів

Оптимальними є параметри центрифугування (кількість обертів і час центрифугування), при яких:

- осад еритроцитів чіткий і не розшаровується;
- надосад над еритроцитами прозорий;
- осад еритроцитів легко розводиться;
- аглютинація у зразку для позитивного контролю становить 1+;
- аглютинація у зразку для негативного контролю відсутня.

7.3.1.1.2. Калібрування центрифуги для антиглобулінових тестів

1. Сироватку анти-D (неповні антитіла) розводять розчином NaCl до отримання в НАГТ реакції на 1+.
2. Підготувати:
 - а) 3% завись Rh-позитивних еритроцитів у розчині LISS (позитивний контроль);
 - б) 3% завись Rh-негативних еритроцитів у розчині LISS (негативний контроль).
3. Промаркувати 5 пробірок для позитивного контролю та 5 пробірок для негативного контролю.
4. У кожну пробірку додати по 2 краплі розведеної сироватки анти-D.
5. Додати у пробірки, відповідно, по дві краплі Rh₀(D)-позитивних еритроцитів (для позитивного контролю) та по дві краплі Rh₀(D)-негативних еритроцитів (для негативного контролю).
6. Інкубувати всі пробірки в температурі 37 °C протягом 20 хв.
7. Наповнити пробірки розчином NaCl та центрифугувати пробірки попарно (зразки позитивного та негативного контролю) при 2500 об./хв. протягом різного часу (наприклад, 90, 120, 180 сек.).
8. Після центрифугування надосад видалити.
9. Осад еритроцитів відмити 4 рази.

УВАГА! Оптимальним часом центрифугування еритроцитів під час їх відмивання є найкоротший час, при якому:

- після центрифугування надосад має бути прозорий, без домішок еритроцитів;
- після видалення надосаду еритроцити утворюють на дні чіткий осад, який не розливається по стінках;
- осад еритроцитів має легко розводитись у залишках рідини.

10. В обрані пробірки до осаду еритроцитів (після останнього промивання) додати по 2 краплі антиглобулінової сироватки.

11. Центрифугувати протягом 20 сек. (наприклад) та з'ясувати результати.

УВАГА! Оптимальним часом центрифугування еритроцитів з антиглобуліновою сироваткою є такий час, після якого:

- осад еритроцитів буде чітко видимим і не розливатиметься;
- рідина над еритроцитами буде прозорою;
- осад еритроцитів можна буде легко розвести;
- аглютинація у зразку позитивного контролю становитиме 1+;
- аглютинація у зразку негативного контролю не спостерігатиметься.

Якщо вищенаведені умови не виконуються, аналіз еритроцитів з антиглобуліновою сироваткою слід повторити, застосовуючи, відповідно, коротший або довший час центрифугування.

7.3.2. Лабораторне устаткування

Лабораторія повинна бути обладнана таким устаткуванням:

1. Пробірки виключно для одноразового використання:
 - а) для взяття крові — пластикові, розміром близько 100 мм × 15 мм, круглдонні, з конусоподібним дном, або ж спеціальні пластикові пробірки;
 - б) для виконання аналізів — скляні або пластикові, розміром близько 70 мм × 10 мм.
2. Предметні скельця.
3. Одноразові пластини зі штучного матеріалу з плоскими заглибинами або скляні.
4. Пастерівські піпетки — за можливості, одноразового використання.
5. Автоматичні піпетки з одноразовими наконечниками.
6. Лабораторні стакани або контейнери зі штучного матеріалу.
7. Контейнери для скла та використаних лабораторних матеріалів (обладнання).
8. Пластикові камери для розміщення скелець чи пластинок (вистелені всередині пористим штучним матеріалом).
9. Штативи для пробірок — дво- чи багаторядні (металеві або зі штучного матеріалу).

10. Самоклеїні наліпки.
11. Водостійкі маркери.
12. Мірні колби ємністю 1–2 л.

7.3.3. Реактиви

Щоденно перед використанням слід проводити візуальний контроль реактивів. Якщо є помутніння чи наявні дефекти — використання реактиву не можливе.

7.3.3.1. 0,15 моль/л розчин NaCl із рН 6,6–7,6

До 9 г NaCl додати дистильовану воду до 1000 мл. Якщо рН розчину виходить за межі інтервалу 6,6–7,6, то слід довести розчин до зазначеного рН за допомогою фосфатного буфера.

УВАГА! Якщо використовується розчин без додавання фосфатного буфера, контроль рН слід здійснювати щоденно.

При застосуванні буферного розчину слід контролювати кожну нову серію реактиву перед його застосуванням в аналізах.

7.3.3.2. Розчин низької іонної сили NaCl 0,03 моль/л (розчин LISS)

Реактиви:

0,17 моль/л розчин NaCl	180 мл
0,15 моль/л фосфатний буфер рН	6,720 мл
0,3 моль/л натрію гліцин із рН 6,7	800 мл

Приготування розчину гліцинату натрію:

1. 22,5 г глікоколю розвести у 800 мл дистильованої води.
2. Додаючи по краплях 1 моль/л NaOH, довести до рН 6,7.
3. Доповнити дистильованою водою до об'єму 1000 мл.

Приготувавши розчин LISS, треба перевірити рН: він має перебувати в межах 6,5–7,0. Оптимальне значення рН — 6,7.

УВАГА!

- A. Контроль якості розчину LISS полягає у проведенні антиглобулінового тесту з еритроцитами Rh+ та Rh-, завішеними в цьому розчині та сенсibilізованими стандартом анти-D згідно з рекомендацією у п. 6.5.4.1.
- B. Виготовлений розчин LISS стерилізують при температурі 105 °C при 0,2 атм протягом 30 хв., після чого зберігають порціями (50–100 мл) у замороженому стані або при температурі 2–6 °C.

7.3.3.3. Розчин папаїну, активованого цистеїн гідрохлоридом

7.3.3.3.1. Склад

1. Розчин папаїну:

10 г папаїну розвести у 250 мл 0,07 моль/л фосфатного буфера з рН 6,2; ретельно перемішати і залишити до наступного дня в холодильнику при температурі 4 °C.

2. Фосфатний буфер — 0,07 моль, рН — 6,2:

KH_2PO_4 : 9,078 г/л дистильованої води — 8 частин

Na_2HPO_4 : 11,188 г/л дистильованої води — 2 частини

3. Розчин цистеїн гідрохлориду:

4,85 г L-цистеїн гідрохлориду розвести у 25 мл фосфатного буфера, склад якого наведений вище.

7.3.3.3.2. Виготовлення папаїнового реактиву

1. Розчин папаїну відцентрифугувати і перелити в колбу об'ємом 1 л.
2. Додати приготований розчин L-цистеїн гідрохлориду.
3. Доповнити фосфатним буфером до об'єму 1 л.

4. Інкубувати протягом 1 год. на «водяній бані» або в термостаті при температурі 37 °С.
5. Профільтрувати.
6. Проконтролювати активність розчину.
7. Поділити на порції малого об'єму (1–2 мл), використовуючи для цього щільно закриті ампули або скляні трубочки.
8. Зберігати в замороженому стані.

УВАГА!

- А. Папаїновий реактив можна також зберігати при температурі 4 °С протягом 3 місяців.*
Б. Реактив, вилучений з холодильника чи розморожений, може бути використаний для досліджень лише протягом кількох годин.

7.3.3.4. Розчин папаїну, активованого цистеїн гідрохлоридом з додаванням цистину

Цей реактив меншою мірою залежить від температурних коливань.

7.3.3.4.1. Склад реактиву

100 мл фосфатного буфера 0,07 моль/л із рН 6,7;
 0,48 г L-цистеїн гідрохлориду;
 1 г L-цистину;
 1 г папаїну.

7.3.3.4.2. Приготування реактиву

1. 1 г папаїну розвести у 25 мл фосфатного буфера і залишити на 30 хв. при кімнатній температурі.
 2. До 1 г L-цистину додати до 72,5 мл фосфатного буфера і залишити на 30 хв. при кімнатній температурі.
 3. Обидва розчини (1 і 2) центрифугувати протягом 10 хв. при $1370 \times g$.
 4. 0,48 г цистеїн гідрохлориду розвести у 2,5 мл фосфатного буфера.
 5. Надосадову рідину з пробірки з папаїном змішати з розчином цистеїн гідрохлориду (2 + 5).
 6. Надосадову рідину з пробірки з L-цистином змішати з розчином папаїну та цистеїн гідрохлоридом (2 + 5).
 7. Отриману суміш помістити на «водяну баню» при температурі 37 °С на 1 год., потім центрифугувати протягом 10 хв. при $1370 \times g$.
- Зібрати піпеткою надосадовий розчин, розлити у малі контейнери та заморозити.

УВАГА!

- А. Реактив можна зберігати у замороженому стані протягом кількох місяців.*
Б. Реактив не втрачає своєї активності, якщо залишити його на 8 год. при кімнатній температурі (на час роботи) і після цього знову заморозити.

7.3.3.4.3. Контроль активності папаїнових реактивів

1. На 2-х предметних скельцях розмістити з одного боку краплю сироватки анти-D (людської), а з іншого — краплю сироватки групи АВ.
2. До кожної з крапель додати по 1 краплі папаїнового реактиву.
3. До 2-х крапель на одному скельці додати по краплі 10% зависі еритроцитів Rh⁺ у розчині NaCl, а на другому — по краплі 10% зависі еритроцитів Rh⁻.
4. Перемішавши реагенти, помістити скельця у камеру зі зволеним пористим покриттям і залишити при кімнатній температурі на 15 хв.
5. Наявність аглютинації еритроцитів Rh⁺ із сироваткою анти-D за відсутності аглютинації в інших краплях свідчить про активність реактиву та відсутність неспецифічних реакцій.

УВАГА! Для того щоб переконатися у належній активності папаїнового реактиву, слід порівняти титр та інтенсивність аглютинації, виражені в балах (див. п. 7.4.3), діагностичної сироватки анти-D з еритроцитами Rh⁺ у колоїдному та папаїновому тестах. Якщо титр сироватки в папаїновому середовищі перевищує щонайменше 2 розведення, а кількість балів удвічі вища, ніж у колоїдному середовищі, — це вказує на належну активність реактиву.

7.3.3.5. Розчин EDTA-натрію (EDTA-Na₂)

1. 5 г EDTA-Na₂ розвести у 100 мл 0,15 моль/л розчину NaCl.
2. Кров брати у пропорції: 1 частина розчину EDTA-Na₂ та 9 частин крові.
3. Одразу після взяття крові слід ретельно перемішати вміст пробірки.

УВАГА! Замість розчину EDTA-Na₂ часто використовується EDTA-K₂, тому у тексті вживається скорочення EDTA.

7.3.3.6. Розчин тромбіну

1. До маточного розчину тромбіну додати розчину NaCl, щоб отримати концентрацію 50 од/мл.
2. Приготований розчин тромбіну розлити по пробірках малими порціями (6–8 крапель) або скляних трубочках і зберігати у замороженому стані.

Спосіб застосування: до 7–10 мл крові додають 2 краплі розчину тромбіну.

7.3.3.7. Розчин поліброну

Безпосередньо перед аналізом приготувати 1% розчин поліброну в 0,15 моль/л NaCl із рН 7,0.

УВАГА! Реактив поліброну слід зберігати у щільно закритому контейнері — через його сильні гігроскопічні властивості.

7.3.3.8. Розчин МЕР для руйнування аутоантитіл на еритроцитах перед використанням їх для аутоадсорбції

1. Приготувати 0,1 моль/л розчин 2-меркаптоетанолу (2МЕ) у розчині NaCl із рН 7,3–7,4.
2. До 20 крапель розчину 2МЕ додати 5 крапель папаїнового реактиву і 20 крапель 0,15 М розчину NaCl. Вміст ретельно перемішати.

УВАГА! Реактив МЕР готується безпосередньо перед застосуванням.

Спосіб застосування: 2 частини реактиву змішати з 1 частиною осаду еритроцитів із крові, взятої на EDTA-Na₂.

7.3.3.9. Розчини для диференціації антитіл IgG та IgM

7.3.3.9.1. Розчин димеркаптоетанолу (2МЕ)

Приготувати 0,1 моль/л розчин 2МЕ у фосфатному буфері з рН 7,3–7,4.

Спосіб застосування: до 1 частки сироватки додається еквівалентний об'єм реактиву, приготовленого перед використанням.

7.3.3.9.2. Розчин дитіотреїтолу (ДТТ)

Реактиви:

1. Фосфатний буфер із рН 7,3.
2. ДТТ — приготування розчину 0,01 М:
 - а) приготувати наважку 0,154 г ДТТ;
 - б) доповнити фосфатним буфером із рН 7,3 до 100 мл.

7.3.3.10. Розчин хлорохін фосфату

Приготувати 20% розчин фосфату хлорохіну в 0,15 М NaCl і довести до рН 5,1.

УВАГА! Розчин слід зберігати у холодильнику.

7.3.3.11. Розчин кислого гліцину та EDTA

Реактиви:

1. Буфер 0,1 М гліцину-НСІ із рН 1,5 (0,75 г гліцину + 100 мл 0,15 М NaCl) — рН встановити за допомогою концентрованої HCl.
2. 10% EDTA.
3. 1 М TRIS-NaCl (12,1 г TRIS + 5,25 г NaCl + 100 мл дистильованої води).

УВАГА! Вищенаведені реактиви можна зберігати у замороженому стані ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) в об'ємах, що відповідають їх застосуванню, а саме:

- реактив 1 — по 20 крапель;
- реактиви 2 і 3 — по 5 крапель.

7.3.3.12. Стандарт анти-D

Стандарти анти-D мають бути розроблені відповідно до вимог міжнародного стандарту.

1. Містить 0,1 міжнародної одиниці (0,02 мкг) IgG анти-D у 1 мл.
2. Стандарт може бути виготовлений власними силами та перевірений у відповідній лабораторії ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України».
3. Стандарт анти-D обов'язково застосовується для контролю НАГТ (непрямого антиглобулінового тесту) та ензимного (ферментного) тесту LEN.
4. Використання Стандарту анти-D виключає технічні помилки під час виконання аналізів.

7.3.3.13. Розчини для зберігання еритроцитів**7.3.3.13.1. Модифікований розчин Альсєвера**

Склад:

глюкоза	102,5 г
натрію хлорид	23,5 г
натрію цитрат ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$)	40,0 г
лимонна кислота однозаміщена	0,5 г
інозин	20,0 г
хлорамфенікол	1,65 г
неоміцин сульфат	1,0 г
дистильована вода	до 5000 мл

Ретельно перемішати, бажано за допомогою магнітного шейкера. Перевірити рН і довести до 6,81–6,88 за допомогою лимонної кислоти або дикарбонату натрію. Профільтрувати і розлити у стерильні контейнери.

До осаду відмитих еритроцитів додають 5 частин розчину Альсєвера. У цьому розчині еритроцити можна зберігати протягом 28 днів при температурі 2–6 $^{\circ}\text{C}$.

7.3.3.13.2. Розчин із додаванням сироватки людини

Склад:

EDTA	7,44 г
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	7,16 г
глюкоза	12,50 г
сироватка людини групи крові АВ	200 мл
хлороцид (хлорамфенікол, детреоміцин, хлороміцетин)	1,0 г

Приготування:

1. Відважені 3 перші реактиви висипати у мірну колбу об'ємом 1 л.
2. Додати 50–100 мл дистильованої води.
3. Злегка підігріти до повного розчинення компонентів.
4. Охолодивши розчин, додати сироватку людини та хлороцид.
5. Довести розчин до рН 7,0–7,2 за допомогою 1 N NaOH.

До 1 частини осаду еритроцитів додають 9 частин розчину. Перед застосуванням еритроцити дворазово відмивають розчином NaCl. Вони можуть бути використані для аналізів протягом 3–4 тижнів.

УВАГА! Допускається зберігання еритроцитів у збагачувальних розчинах (SAGM, ADSOL). Строк придатності еритроцитів, що зберігаються таким способом, становить 28 днів. Для продовження цього терміну до 35 днів і більше треба порівняти експресію антигенів у першій та останній дні зберігання.

7.3.3.14. Зберігання еритроцитів у замороженому стані

Еритроцити можна зберігати замороженими, способом, описаним нижче. Можливе також застосування готових реактивів та розчинів відповідно до інструкцій виробників.

7.3.3.14.1. Зберігання еритроцитів, заморожених із гліцерином

7.3.3.14.1.1. Склад розчину для заморожування еритроцитів

Цитрат натрію $\times 2\text{H}_2\text{O}$	30,0 г
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	3,1 г
Na_2HPO_4	2,8 г
Дистильована вода	600 мл

7.3.3.14.1.2. Заморожування еритроцитів

1. Після розведення складників перевірити рН розчину, який має становити 7,0.
2. Додати 400 мл гліцерину і перемішати.
3. Можливе заморожування крові, заготовленої на консерванті (CPD, CPDA), яку зберігали при температурі 4 °C не довше 24 год.
4. Надосад з контейнера видаляють повністю.
5. Повільно, при постійному перемішуванні, додати до еритроцитів еквівалентний об'єм розчину для заморожування.
6. Розлити еритроцити порціями у вузькі пробірки одноразового використання та помістити в морозильну камеру.

Еритроцити, що зберігаються при температурі –20 °C, є придатними до використання протягом 3–6 місяців.

УВАГА! Еритроцити, що зберігаються при температурі –80 °C і нижче, придатні до використання протягом кількох років.

7.3.3.14.1.3. Розчини для відмивання розморожених еритроцитів

Розчин №1

Гліцерин	12 мл
Розчин цитрату натрію 0,19 моль/л	88 мл

Розчин №2

Гліцерин	5 мл
Розчин цитрату натрію 0,19 моль/л	95 мл

Розчин №3

Змішати однакові частини розчину №2 та розчину №4.

Розчин №4

Розчин NaCl 0,17 моль/л.

7.3.3.14.1.4. Розморожування еритроцитів

1. Пробірку із замороженими еритроцитами перенести у кімнатну температуру.
2. Одразу після розморожування додати еквівалентний об'єм розчину №1 та обережно, але ретельно перемішати.

3. Центрифугувати протягом 5 хв. при $600 \times g$.
4. Після видалення надосаду додати розчин №2 в об'ємі, еквівалентному осадку еритроцитів, та відцентрифугувати. Повторювати дії з наступними розчинами для відмивання, додаючи по черзі розчини №3 та №4.
5. Зробити завись еритроцитів у відповідному середовищі.

УВАГА! Зазвичай під час першого, а інколи й другого промивання виявляється частковий гемоліз, який зникає під час наступних відмивань. Якщо спостерігається інтенсивний гемоліз і забарвлення надосаду не зникає впродовж усього циклу відмивання — еритроцити слід відбракувати.

Розморожені еритроцити не можна заморожувати повторно.

7.3.3.15. Бактерицидні засоби, що застосовуються для консервації зразків сироваток

7.3.3.15.1. Розчин тіомерсалу

Тіомерсал	1,0 г
Боракс безводний	1,6 г
(або боракс 10-водний)	3,0 г)

Доповнити дистильованою водою до 100 мл.

До 100 частин сироватки додати 1 частину розчину.

7.3.3.15.2. Розчин натрію азиду

Натрію азид	1,0 г
-------------	-------

Доповнити дистильованою водою до 100 мл.

До 100 частин сироватки додати 1 частину розчину.

УВАГА!

А. Натрію азид є сильною отрутою.

Б. Бактерицидні засоби слід додавати до зразків сироваток, які планується зберігати.

7.3.4. Основний набір діагностичних реактивів

Нижче наведений основний набір діагностичних реактивів, що використовуються в ЗСК. Комплекти для імуногематологічних лабораторій лікарень затверджує ЗСК.

Система АВ0: моноклональні реактиви анти-А і анти-В; лектин анти-А₁.

Система Rh: анти-D, анти-C, анти-C^w, анти-c, анти-E, анти-e.

Система Kell: анти-K, анти-k, анти-Kp^a, анти-Kp^b.

Система Duffy: анти-Fy^a, анти-Fy^b.

Система Kidd: анти-Jk^a, анти-Jk^b.

Система MNS: анти-M, анти-N, анти-S, анти-s.

Система P: анти-P₁, анти-P+P₁+P^k (анти-Tj^a).

Система Lewis: анти-Le^a, анти-Le^b.

Поліспецифічний антиглобуліновий реактив: анти-IgG + анти-C3.

Моноспецифічний антиглобуліновий реактив: анти-IgG, анти-IgM, анти-IgA, анти-C3d.

(Більшість згаданих реактивів містять моноклональні антитіла)

Сироватки групи АВ для виявлення поліаглютинації.

Спеціально підібрані сироватки людини груп крові за системою АВ0 і анти-D за системою Rh — для спеціальних аналізів.

Стандартні еритроцити фенотипу CE:

- для аналізу системи АВ0: еритроцити А₁, В і 0;
- для перевірки активності та специфічності реактиву анти-D системи Rh: еритроцити 0 Rh+ та 0 Rh-;
- для перевірки активності та специфічності реактиву анти-K системи Kell: еритроцити K+ та K-;
- для виявлення імунних антитіл (табл. 7.6. та 7.7).

Стандартні еритроцити для ідентифікації антитіл.

Їх отримують із крові, взятої від спеціально підібраних донорів групи 0. Якщо плазму видаляють, то слід додати збагачувальний розчин (наприклад, SAGM, ADSOL). Рекомендується фільтрація, оскільки лейкоцити можуть послаблювати експресію деяких антигенів на еритроцитах. Поділ еритроцитів на порції здійснюють у закритій системі. Рекомендується робити порції об'ємом близько 1 мл, у сегментах з'єднувальних трубок, при цьому кожен сегмент має бути промаркований, із зазначенням номера донації, терміну придатності та інформації про фенотип. Можливо фенотип зазначати скорочено (наприклад, 0 Rh– K+), але тоді має додатково укладатися список, який містить номери донацій та повні описи фенотипів. Виготовлені таким чином еритроцити можна використовувати протягом 28 днів. Якщо еритроцити від донора уперше входять до складу набору — слід проконтролювати експресію антигенів у перший і останній день зазначеного терміну придатності (табл. 7.7).

7.3.4.1. Витяжки з насіння

Витяжки (екстракти) з деяких видів насіння містять білки, що називаються лектинами, які у певному розведенні специфічним чином реагують із деякими антигенами еритроцитів та спричиняють їх аглютинацію. Лектини застосовують в аналізах антигенів груп крові системи ABO (наприклад, *Dolichos biflorus*, *Ulex europaeus*) та MNS (наприклад, *Vicia graminea*), а також при визначенні явища поліаглютинації.

7.3.4.1.1. Основний набір лектинів

<i>Dolichos biflorus</i>	анти-A ₁ (містить також анти-Tn та анти-Cad)
<i>Ulex europaeus</i>	анти-N
<i>Arachis hypogea</i>	анти-T
<i>Salvia sclarea</i>	анти-Tn
<i>Salvia horminum</i>	анти-Tn + анти-Cad
<i>Vicia graminea</i>	анти-N

7.3.4.1.2. Виготовлення витяжки з насіння

1. Насіння перемолоти в порошок.
2. До 1 г порошку з насіння додати 10 мл розчину NaCl і добре перемішати.
3. Суміш залишити при кімнатній температурі на кілька годин.
4. Центрифугувати протягом 10 хв. зі швидкістю 1370 × g.
5. Перенести супернатант в окрему пробірку та проконтролювати його активність та специфічність з використанням відповідних еритроцитів.
6. Якщо активність відповідає нормі і застережень немає, але спостерігаються явно слабші реакції з еритроцитами, що не містять антигену, який відповідає лектинові, — слід розвести надосад розчином NaCl і повторно проконтролювати активність та специфічність.
7. Активний і специфічний розчин поділити на малі порції та заморозити.

7.4. Принципи взяття крові, її зберігання та підготовки до аналізів

7.4.1. Взяття крові для імуногематологічних аналізів

1. Взяти 5–10 мл венозної крові в одноразову пробірку (пробірки мають бути з постійними етикетками).
2. Одразу після взяття крові на етикетці друкованими літерами зазначити прізвище, ім'я, дату народження (або номер ідентифікаційного коду), а для донорів — номер донації. (Якщо застосовується система штрих-кодів — наклеїти на пробірку відповідний код).
3. Ті самі дані зазначити на додатку, що супроводжує зразок (№7.1, див. п. 7.2), разом з приміткою, які аналізи мають бути виконані.
4. Якщо аналізи:
 - а) мають бути розпочаті в день узяття зразка — пробірку з кров'ю зберігають при температурі 37 °C протягом близько 10–15 хв., після чого центрифугують протягом 5 хв. при 600 × g;

- б) мають проводитися наступного дня — відділити кров від стінок пробірки і помістити в холодильник, при температурі 2–6 °С, а наступного дня відцентрифугувати;
- в) неодмінно мають бути виконані одразу ж після взяття крові, або ж якщо зразок крові належить особі з порушеннями системи згортання — слід додати до крові розчин тромбіну (п. 7.3.3.6).

5. Після центрифугування відокремити сироватку і перенести її в окрему пробірку, а з еритроцитів зробити завись відповідної концентрації і в належному середовищі.

УВАГА! У новонароджених, немовлят і малих дітей беруть менші об'єми крові (спосіб дій — п. 7.3.3.5).

7.4.2. Взяття крові для генетичних аналізів

Перш ніж брати кров, слід визначити кількість лейкоцитів у циркулюючій крові.

1. Взяти близько 1,5 мл крові в одноразову пробірку зі штучного матеріалу, причому в пробірці вже має бути EDTA (як для аналізу морфології крові).
2. Узятую кров передати у відповідну лабораторію (лабораторію молекулярної біології) ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України» у строк, що не перевищує 36 год. від моменту взяття.
3. Якщо кров планується передати в лабораторію пізніше, слід до того часу зберігати її в замороженому стані, при температурі від –20 до –80 °С.

УВАГА! Якщо виявлено, що кількість лейкоцитів нижча від нижньої межі норми, — кров слід узяти щонайменше у дві пробірки.

7.4.3. Загальні принципи документації та виконання аналізів

1. Зареєструвати зразок крові у відповідному Журналі аналізів (Зразок №7.3) за порядковим номером.
2. Якщо зразок крові належить донору — зазначити номер донації або вклеїти етикетку з відповідним номером донації.
3. Пробірку з кров'ю позначити номером її реєстрації та перевірити відповідність номера запису в журналі.
4. Тим самим номером позначити усе скляне лабораторне приладдя (пробірки, пластини, предметні скельця).
5. Вести детальні протоколи всіх виконаних аналізів.
6. Усі результати аналізів на групу крові та проб на сумісність слід визначати та реєструвати в журналі, причому виконувати ці дії мають дві людини. Особа, яка робить аналіз, і особа, яка його перевіряє, мають поставити свої підписи у журналі. Результати, які видаються, мають бути підписані керівником лабораторії або вповноваженою особою (Зразок №7.4).
7. При застосуванні автоматичних систем з однозначною ідентифікацією донора/пацієнта та системи автоматизованого розпізнавання результатів (детальні принципи наведено у п. 7.5.15), допускається здійснення перевірки та запису результату однією особою. Тоді вести записи у журналах необов'язково.
8. Рекомендується вести окремий журнал для записів аналізів контрольних діагностичних реактивів та стандартних еритроцитів (Зразок №7.5), що використовувалися в цей день в усіх лабораторіях.

УВАГА! Не допускається вести додаткову (робочу) нумерацію.

Заклад
Відділення
(печатка)

Дата _____

До лабораторії трансфузійної серології
у _____

**НАПРАВЛЕННЯ
на аналіз групи крові**

Прізвище та ім'я _____

Дата народження або ідентифікаційний код _____

Діагноз _____

Попередні результати аналізів (група крові, імунні антитіла) _____

(розбірливий підпис особи, яка бере кров)

(печатка та підпис лікаря-куратора)

**ЖУРНАЛ АНАЛІЗІВ ГРУП КРОВІ
(для пацієнтів та вагітних жінок)**

Сторінка 1

№ з/п	Дата	Прізвище та ім'я, дата народження або ідентифікаційний код	Відділення			Примітки
			Група крові		Іррегулярні (непостійні) антитіла	
			AB0	Rh		

Сторінка 2

Система AB0				Rh		Антитіла						Підписи	
Монокло- нальні реактиви		Еритроцити		Монокло- нальні реактиви		Ензимний тест			НАГТ (непрямий антиглобулі- новий тест)				Ауто- контроль (якщо результати скринінгу позитивні)
						Стандартні еритроцити							
анти-		0	A1	B	анти-		I	II	III	I	II		III
A	B				D	D							

Зразок №7.4

(печатка лабораторії)

Дата _____

№ аналізу _____

Відділення _____

**РЕЗУЛЬТАТ
аналізу групи крові**

Прізвище та ім'я _____

Дата народження або індивідуальний код _____

Група крові _____

Імунні антитіла _____

Примітки _____

Аналіз виконав:

Перевірив:

(розбірливий підпис)_____
(печатка та підпис)

Зразок №7.5

**ПРОТОКОЛ
контрольних аналізів набору зразків**

Дата _____

Специфічність реактиву

Серія (клон)

Термін придатності

Реакції з еритроцитами

0 A₁ B Rh+ Rh- K+ K-

анти-A _____

анти-B _____

анти-D _____

анти-K _____

Стандарт анти-D _____

СТАНДАРТНІ ЕРИТРОЦИТИ ДЛЯ АНАЛІЗІВ АНТИТІЛ

Дата (від _____ до _____)

№ (донації)

Фенотип*

I _____

II _____

III _____

* Можливе внесення інструкції, надісланої виробником стандартних еритроцитів.

Імуногематологічні аналізи слід виконувати на пластинах зі штучного матеріалу або зі скла, на предметних скельцях, а також в одноразових пробірках. Слід застосовувати також одноразові або автоматичні піпетки. Допускається багаторазово застосовувати і звичайні пастерівські піпетки, але їх перед кожною зміною вмісту треба кілька разів ретельно промити розчином NaCl. У серологічних аналізах основною одиницею вимірювання є крапля, що вільно спадає з піпетки, нахиленої завжди під одним і тим самим кутом. В усіх аналізах, що виконуються на пластинах або скельцях, до 1 краплі реактиву або досліджуваної сироватки додають 1 краплю зависі еритроцитів. Порядок дій загалом ролі не відіграє, однак з точки зору практичної зручності краще спершу розмішувати діагностичні реактиви та аналізовані сироватки. Якщо робити навпаки, то, особливо під час аналізу крові кількох осіб, важко помітити, чи всюди в еритроцити додано реактив або сироватку. Вміст перемішують чистою скляною паличкою. Якщо аналізи виконуються на пластинах зі штучного матеріалу із заглибинами, то мішати реагенти за допомогою скляної палички не потрібно.

Для всіх аналізів, окрім аналізів із застосуванням моноклональних реактивів, результати яких розпізнаються за кілька хвилин, предметні скельця поміщують у вологі камери, які попереджають висихання краплі.

Результати визначають, беручи в руку пластину чи скельце та легко похитуючи їх. Результати аналізів, які виконуються у пробірках, визначають, відцентрифугувавши пробірку та струсивши осад еритроцитів у ній (для цього треба легко вдарити пальцем по пробірці). Висновок про наявність/відсутність аглютинатів роблять за допомогою натурального або штучного освітлення та білого фону.

Сам аналіз завжди має бути доповнений контрольними аналізами. Вони полягають у перевірці специфічності та активності діагностичних реактивів; слід також спостерігати за поведінкою еритроцитів у розчині, в якому вони завішені.

Основною умовою правильного виконання аналізів є чистота пластинок, пробірок та реактивів. Це особливо суттєво для антиглобулінового тесту, для якого потрібні одноразові пробірки. Залишки сироватки людини у не досить ретельно промитому посуді або в розчині NaCl, який служить для промивання еритроцитів та промивання піпетки, призводять до нейтралізації антиглобулінового реактиву. Щоб запобігти забрудненню діагностичних реактивів, кожен з них беруть окремою піпеткою.

Про кожен проведений аналіз складається протокол, у якому знаком «+» позначають реакцію аглютинації, знаком «-» — відсутність аглютинації. Інтенсивність аглютинації доцільно позначати таким чином:

4+: повна аглютинація у вигляді одного згустка еритроцитів;

3+: кілька великих згустків еритроцитів;

2+: згустки середньої величини, при мікроскопії видно вільні еритроцити;

1+: дрібні аглютинати, в мікроскопії видно численні еритроцити, що не злиплися.

Інтенсивність аглютинації еритроцитів під впливом сироватки та її розчинів можна кількісно виразити в балах, застосовуючи такі значення:

4+ = 12;

3+ = 10;

2+ = 8;

1+ = 5;

залишок = 2.

Зразки крові для аналізів, стандартні еритроцити та моноклональні реактиви слід зберігати в холодильнику при температурі 2–6 °C, а діагностичні сироватки — у морозильній камері. Виймати їх можна лише на час аналізу.

7.5. Методики серологічних аналізів

7.5.1. Зависі еритроцитів

7.5.1.1. Завись еритроцитів у розчині NaCl

1. Зі зразка крові після його повного осадження (якщо його взяли у суху пробірку) відібрати з дна кілька крапель еритроцитів та перенести в окрему пробірку.
2. Наповнити пробірку розчином NaCl та ретельно перемішати вміст.
3. Зачекати випадання на дно пробірки дрібних згустків.
4. Завись еритроцитів без згустків перенести до окремої пробірки.
5. Центрифугувати протягом 3 хв. при $340 \times g$.
6. Повністю видалити надосад.
7. З осаду еритроцитів зробити завись у розчині NaCl:
 - а) 3–4% — для пробіркового тесту (або згідно з рекомендацією виробника реактивів);
 - б) 5–10% — для методики на площині (або згідно з рекомендацією виробника реактивів).

7.5.1.2. Завись еритроцитів, оброблених папаїном

Для кожної серії папаїнового реактиву (п. 7.3.3.3.) має бути встановлений оптимальний час папаїнізації еритроцитів.

7.5.1.2.1. Приготування еритроцитів, оброблених папаїном

1. Розвести 1 частину папаїнового реактиву у 9 частинах розчину NaCl.
2. 4 краплі розведеного реактиву змішати з 1 краплею відмитих, ущільнених еритроцитів.
3. Інкубувати при температурі 37°C протягом часу, встановленого для цієї серії реактиву.
4. Тричі відмити еритроцити великою кількістю розчину NaCl та зробити 3–5% завись у цьому розчині.

УВАГА! Якщо в наборі еритроцитів, обраних для папаїнізації, немає $Rh_0(D)$ -позитивних еритроцитів, то слід їх додати, щоб під час аналізу вони використовувались як позитивний контроль.

7.5.2. Ензимні (ферментні) тести

7.5.2.1. Ензимний тест низької іонної сили (LEN)

Цей тест особливо ефективний для виявлення антитіл системи Rhesus. Тест характеризується високою чутливістю і дозволяє скоротити час аналізу порівняно з тестом із папаїнованими еритроцитами.

1. Двічі відмити еритроцити розчином NaCl та один раз — розчином LISS.
2. Зробити 3–4% завись еритроцитів у розчині LISS.
3. Розвести папаїновий реактив розчином LISS у співвідношенні: 1 крапля реактиву на 2 краплі розчину LISS.
4. До 2-х крапель зависі еритроцитів додати краплю розведеного папаїнового реактиву.
5. Пробірку з цим вмістом помістити на 10 хвилин в термостат або на «водяну баню» з температурою 37°C .
6. Додати 2 краплі аналізованої сироватки, ретельно перемішати і залишити на 3 хвилини при температурі 37°C .
7. Центрифугувати протягом 30–60 сек. при $150\text{--}340 \times g$.
8. Визначити результат, дуже обережно струшуючи пробірку.

УВАГА! Обов'язково виконати водночас контрольні аналізи:

- а) $Rh_0(D)$ -позитивні та $Rh_0(D)$ -негативні еритроцити + Стандарт анти-D;
- б) еритроцити, використані для аналізу, + сироватка групи АВ.

7.5.2.2. Пробірковий тест з еритроцитами, обробленими папаїном (двоступеневий папаїновий тест)

Тест служить передусім для виявлення антитіл системи Rhesus. Чутливість цього тесту можна порівняти з чутливістю тесту LEN.

Для аналізу використовують 3–5% завись папаїнізованих еритроцитів у розчині NaCl, приготованих відповідно до п. 7.5.1.3.1.

1. До 2-х крапель аналізованої сироватки додати 1 краплю еритроцитів.
2. Суміш інкубувати протягом 30 хв. при температурі 37 °С.
3. Центрифугувати протягом 30–60 сек. при 150–340 × g.
4. Результат визначити макроскопічним способом.

УВАГА! *Обов'язково виконати водночас контрольні аналізи:*

- а) позитивний контроль: $Rh_0(D)$ + Стандарт анти-D;
- б) негативний контроль: усі різновиди використаних еритроцитів + сироватка, що не містить антитіл.

7.5.3. Полібреновий тест

Це дуже чутлива методика, що служить для виявлення антитіл класу IgG, окрім антитіл системи Kell. Методика вимагає точності та уважності, а також досвіду в інтерпретації результатів.

7.5.3.1. Реактиви для полібренового тесту

7.5.3.1.1. Розчин низької іонної сили (LIM)

Глюкоза	50 г
EDTA	2 г

Доповнити дистильованою водою до 1 л та довести до рН 6,4 за допомогою 2 М NaOH.

7.5.3.1.2. 10% полібрен у буферному розчині NaCl

Цей маточний розчин слід зберігати у температурі 2–6 °С. Перед початком роботи над аналізами треба приготувати робочий 0,05% розчин, для чого розвести 1 частину 10% полібрену 199 частинами NaCl.

7.5.3.1.3. Розчин для приготування зависі еритроцитів (RS)

Цитрат натрію	3,53 г
Глюкоза	2,0 г

Доповнити дистильованою водою до 100 мл.

7.5.3.2. Проведення аналізу

1. Помістити у пробірку 2 краплі аналізованої сироватки, 1 краплю 3% зависі еритроцитів у розчині NaCl, 0,6 мл реактиву LIM та перемішати.
2. Залишити на хвилину у кімнатній температурі.
3. Додати 2 краплі робочого розчину полібрену.
4. Центрифугувати протягом 30–60 сек. при 150 × g.
5. Видалити надосад.
6. Додати 2 краплі реактиву RS.
7. Обережно перемішати, тримаючи пробірку/штатив із пробірками під кутом 45°. Через 10 сек. агрегати зникнуть, аглютинати залишаться.
8. Визначити результат.
9. Якщо аглютинація не відбулась — тричі промити еритроцити.
10. З метою виявлення антитіл системи Kell додати антиглобулінову сироватку.

УВАГА! *Обов'язково виконати водночас контрольні аналізи:*

- а) $Rh_0(D)$ -позитивні та $Rh_0(D)$ -негативні еритроцити + Стандарт анти-D;
- б) еритроцити, використані в аналізі, + сироватка групи АВ.

7.5.4. Антиглобулінові тести

Антиглобуліновий тест дозволяє виявити неповні антитіла, а також компоненти системи комплементу, пов'язані з еритроцитами. Із цією метою застосовують антиглобулінову сироватку, отриману від піддослідних тварин, імунізованих глобуліном людини, або ж моноклональні антитіла. Внаслідок реакції антитіл, які містяться в антиглобуліновому реактиві, із глобулінами, абсорбованими на поверхні еритроцитів, відбувається їх аглютинація.

У повсякденних аналізах застосовують так званий поліспецифічний антиглобуліновий реактив, який містить антитіла проти імуноглобулінів класу G та проти компонентів системи комплементу.

У спеціалізованих аналізах застосовують реактиви окремої моноспецифічності, спрямовані до окремих класів імуноглобулінів і до деяких компонентів системи комплементу.

7.5.4.1. Антиглобулінові тести у пробірках

Вкрай важливо правильно діяти під час визначення результату кожного антиглобулінового тесту. Енергійно струшувати вміст пробірки неприпустимо: це часто призводить до розбивання аглютинатів, а отже, й одержання псевдонегативного результату.

Під час розпізнавання результатів слід застосовувати одну з двох методик:

– пробірку тримають майже горизонтально і поволі обертають, щоб осад еритроцитів відійшов від дна на певну відстань, не більшу ніж 1 см; можливо також обережно постукають пальцем по стінці пробірки;

– пробірку тримають майже вертикально, погойдують і створюють легку вібрацію, обережно стукаючи пальцем по її стінці.

Розрізняють два різновиди антиглобулінового тесту: прямий (ПАГТ) та непрямий (НАГТ).

Перед виконанням прямого антиглобулінового тесту або водночас із непрямим антиглобуліновим тестом проводять контроль активності антиглобулінового реактиву.

7.5.4.1.1. Контроль активності антиглобулінового реактиву

7.5.4.1.1.1. Сенсibilізація еритроцитів

1. Приготувати 3–4% зависі $Rh_0(D)$ -позитивних та $Rh_0(D)$ -негативних еритроцитів у розчині NaCl.
2. У дві пробірки помістити по 2 краплі цих зависей.
3. Додати по 5 крапель Стандарту анти-D та перемішати, струшуючи пробірки.
4. Перенести пробірки на 60 хв. у термостат (температура має становити 37 °C).

7.5.4.1.1.2. Відмивання еритроцитів

1. Після інкубації 4 рази відмити еритроцити великою кількістю розчину NaCl.
2. Після останнього відмивання та центрифугування одним енергійним рухом видалити надосад і, не змінюючи положення пробірки, видалити його залишок фільтрувальним папером або лігніном, розміщеним на лабораторному столику.

7.5.4.1.1.3. Аналіз із антиглобуліновим реактивом

1. Приготувати антиглобуліновий реактив за наведеними інструкціями.
2. До осаду еритроцитів додати по 2 краплі антиглобулінового реактиву та обережно перемішати.
3. Центрифугувати протягом 45–60 сек. при $150\text{--}340 \times g$.
4. Ресуспендувати осад еритроцитів, погойдуючи пробірку або обережно постукуючи по ній пальцем.
5. Визначити результати. Аглютинація у пробірці, яка містить $Rh_0(D)$ -позитивні еритроцити, та відсутність аглютинації у пробірці з $Rh_0(D)$ -негативними еритроцитами свідчать про активність та специфічність антиглобулінового реактиву, а також про правильне виконання аналізу.

7.5.4.1.2. Контроль якості центрифуги для автоматичного відмивання еритроцитів

Контроль слід здійснювати щонайменше 1 раз на тиждень.

1. Дві частини Стандарту анти-D інкубувати протягом 45 хв. з однією частиною 3% зависі відмитих Rh-позитивних еритроцитів у розчині NaCl. Якщо контроль центрифуги здійснюють в НАГТ-LISS, то слід застосовувати 1 частину Стандарту.

2. У пробірки (не менш ніж 9 шт.) додати 1 частину сенсibiliзованих еритроцитів.
3. У решту пробірок додати 1 частину тих самих еритроцитів, але несенсибилізованих.
4. В усі пробірки додати 2 частини сироватки без антитіл.
5. Увімкнути програму відмивання.
6. В усі пробірки додати 2 частини антиглобулінової сироватки.
7. Відцентрифугувати і визначити результати.
8. Звернути увагу, чи в усіх пробірках із сенсibiliзованими еритроцитами інтенсивність аглютинації однакова. Якщо спостерігаються відмінності — слід звернутися до сервісного центру.

7.5.4.1.3. Прямий антиглобуліновий тест (ПАГТ)

Прямий антиглобуліновий тест призначений для виявлення антитіл, зв'язаних з еритроцитами *in vivo*. Його проводять:

- для новонароджених із підозрою на гемолітичну хворобу (ГХН);
- для хворих із підозрою на аутоімунну гемолітичну анемію (АІГА);
- для реципієнтів крові під час досліджень посттрансфузійних ускладнень.

7.5.4.1.3.1. Проведення аналізу в пробірках

1. Краплю згущених еритроцитів 4-разово відмити великою кількістю розчину NaCl при температурі 4–8 °C та зробити 3–4% завись у цьому розчині або в розчині LISS.
2. Дві краплі зависі перенести в окрему пробірку.
3. Відцентрифугувати і ретельно видалити надосад.
4. Додати 2 краплі антиглобулінового реактиву.
5. Центрифугувати протягом 30–60 сек. при 150–340 × g.
6. Ресуспендувати осад еритроцитів, дуже обережно погойдуючи пробірку і спостерігаючи за наявністю аглютинатів.

Слід також виконати контрольні дії:

1. Дві краплі зависі аналізованих еритроцитів та дві краплі розчину NaCl відцентрифугувати; якщо виявлено аглютинацію — позитивний результат ПАГТ є недостовірним.
2. До осаду Rh-позитивних та Rh-негативних еритроцитів, попередньо інкубованих зі Стандартом анти-D і 4-разово відмитих, додати 2 краплі антиглобулінового реактиву; позитивний результат з Rh-позитивними еритроцитами та негативний з Rh-негативними свідчить про специфічність та активність антиглобулінового реактиву.

УВАГА! У випадку хворих з аутоантитілами холодового типу еритроцити промивають розчином NaCl при температурі 37 °C.

7.5.4.1.4. Непрямий антиглобуліновий тест (НАГТ)

Непрямий антиглобуліновий тест застосовують:

- для виявлення імунних алоантитіл у сироватці крові донорів та реципієнтів;
- вибору крові для переливань;
- виявлення імунних алоантитіл у вагітних жінок;
- аналізу антигену D системи Rh виключно у донорів;
- визначення антигенів на еритроцитах за допомогою реактивів, активних у цьому тесті.

Під час виконання всіх різновидів непрямого антиглобулінового тесту аутоконтроль при скринінгу імунних антитіл і в пробі сумісності можна не проводити. Однак аутоконтроль є обов'язковим:

- під час ідентифікації виявлених антитіл;
- якщо в проведеному тесті з усім набором еритроцитів виходять позитивні результати.

Аутоконтроль дозволяє диференціювати ало- та аутоантитіла.

7.5.4.1.4.1. Класичний непрямий антиглобуліновий тест (НАГТ-NaCl)

1. Приготувати 3–4% завись еритроцитів у розчині NaCl (включно з Rh-позитивними та Rh-негативними еритроцитами для контролю, а також, якщо є потреба, і з аутологічними еритроцитами — для аутоконтролю).

2. До 2 крапель зависі еритроцитів, зокрема й аутологічних, додати 5 крапель відповідної сироватки та перемішати.

3. До Rh-позитивних та Rh-негативних еритроцитів додати по 5 крапель Стандарту анти-D та перемішати.
4. Інкубувати протягом 60 хв. при температурі 37 °С.
5. Після інкубації обережно струсити осад і перевірити однорідність зависі.
6. Завись 4-разово відмити великою кількістю розчину NaCl.
7. Після останнього відмивання ретельно видалити надосад.
8. До осаду еритроцитів додати 2 краплі антиглобулінового реактиву.
9. Центрифугувати протягом 30–60 сек. при 150–340 × g.
10. Ресуспендувати осад еритроцитів, дуже обережно погойдуючи пробірку і спостерігаючи наявність аглютинатів.

***УВАГА!** Якщо після інкубації спостерігається наявність аглютинатів, що свідчить про присутність повних алоантител у сироватці, — надалі тест з цією зависсю еритроцитів проводити не слід.*

Це зауваження стосується всіх різновидів непрямого антиглобулінового тесту.

7.5.4.1.4.2. Непрямий антиглобуліновий тест із застосуванням розчину низької іонної сили (НАГТ-LISS)

Цей тест можна застосовувати замість класичної методики непрямого антиглобулінового тесту. Оскільки чутливість його — висока, а час виконання коротший, його особливо рекомендують для виконання проби на сумісність.

7.5.4.1.4.2.1. Підготовка еритроцитів

1. Відмити еритроцити 2-разово розчином NaCl і 1 раз — розчином LISS.
2. Таким самим способом приготувати Rh₀(D)-позитивні та Rh₀(D)-негативні еритроцити, що мають бути контролем.
3. З осаду еритроцитів зробити 3–4% завись у розчині LISS.

7.5.4.1.4.2.2. Проведення тесту НАГТ-LISS

1. До 2 крапель зависей еритроцитів додати 2 краплі аналізованої сироватки, а до контрольних еритроцитів — по 2 краплі Стандарту анти-D.
2. Суміші інкубувати протягом 20 хв. при температурі 37 °С.
3. Перевірити однорідність зависі.
4. Однорідні зависі 4-разово відмити розчином NaCl.
5. Ретельно видалити надосад, додати до осаду еритроцитів по 2 краплі антиглобулінового реактиву і ретельно перемішати.
6. Центрифугувати протягом 30–60 сек. при 150–340 × g.
7. Ресуспендувати осад еритроцитів, дуже обережно погойдуючи пробірку і спостерігаючи наявність аглютинатів.

7.5.4.1.4.3. Двоступеневий антиглобуліновий тест із застосуванням методики LISS

Це чутливий метод, призначений для виявлення алоантител, які пов'язані з системою комплементу (наприклад, антитіла системи Kidd та Lewis). Метод особливо рекомендують для аналізу сироваток, які зберігалися протягом тривалого часу, а також сироваток хворих, у яких активність компонентів системи комплементу послаблена або втрачена.

1. До обстежуваної сироватки додати 5% розчин EDTA у співвідношенні: 1 крапля розчину на 9 крапель сироватки.
2. До 2 крапель 3–4% зависі еритроцитів у розчині LISS додати 2 краплі сироватки та інкубувати протягом 20 хв. при температурі 37 °С.
3. Перевірити однорідність зависі.
4. Завись 4-разово відмити розчином NaCl.
5. До осаду відмитих еритроцитів додати 4 краплі сироватки (джерело комплементу), яка не містить іррегулярних антител; сироватка має бути виділена зі свіжозаготовленої донорської крові.
6. Суміш інкубувати протягом 20 хв. при температурі 37 °С.
8. Еритроцити 4-разово відмити розчином NaCl.

9. Ретельно видаливши надосад, до осаду еритроцитів додати 2 краплі антиглобулінового реактиву — поліспецифічного або анти-С3.
10. Центрифугувати протягом 30–60 сек. при $150\text{--}340 \times g$.
11. Ресуспендувати осад еритроцитів, дуже обережно погойдуючи пробірку і спостерігаючи наявність аглютинатів.

УВАГА! Одночасно з аналізом слід провести контрольні аналізи. Для позитивного контролю взяти еритроцити $Le(a+)$ або $Jk(a+)$, для негативного — $Le(a-)$ або $Jk(a-)$ та інкубувати їх із сироваткою анти- Le^a або анти- Jk^a .

7.5.4.1.4.4. Непрямий антиглобуліновий тест із застосуванням поліетиленгліколю (НАГТ-PEG)

7.5.4.1.4.4.1. Реактиви

1. Буферний розчин 0,15 М NaCl із рН 7,2.
 2. 20% розчин PEG молекулярної маси 3500–4000 у буферному розчині має зберігатися у температурі $4\text{ }^\circ\text{C}$.
 3. Антиглобуліновий реактив анти-IgG.
- Перед виконанням аналізів потрібну порцію розчину PEG слід підігріти до кімнатної температури.

7.5.4.1.4.4.2. Проведення аналізу

1. Приготувати 4% завись еритроцитів у буферному розчині.
2. Додати до 2 крапель сироватки 1 краплю зависі еритроцитів та 4 краплі розчину PEG.
4. Інкубувати при температурі $37\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 15 хв.
5. Перевірити однорідність зависі.
6. Однорідну завись 4-разово відмити великою кількістю розчину NaCl.
7. Ретельно видаливши надосад, до осаду еритроцитів додати 2 краплі реактиву анти-IgG та перемішати.
8. Центрифугувати протягом 20 сек. при $340 \times g$.
9. Визначити результат, обережно погойдуючи пробірку.

УВАГА! Одночасно з аналізом слід провести контрольні аналізи з Rh-позитивними та Rh-негативними еритроцитами, сенсibilізованими Стандартом анти-D.

7.5.4.1.5. Контроль негативних результатів антиглобулінового тесту

Застосування в антиглобулінових тестах зразків позитивного контролю (у вигляді еритроцитів, сенсibilізованих Стандартом анти-D) не гарантує повного захисту від псевдонегативних результатів, які є наслідком не досить ретельного відмивання еритроцитів. Саме тому в більшості світових лабораторій впроваджено методику, яка має на меті перевірку достовірності кожного негативного результату антиглобулінового тесту. Рекомендується впровадити цю методику і в ЗСК, а поступово — і в лабораторіях імуногематології лікарень. Однак це вимагає спеціальної підготовки персоналу.

7.5.4.1.5.1. Принцип методу

Треба довести, що негативний результат антиглобулінового тесту є правильним, оскільки в суміші з еритроцитами антиглобуліновий реактив лишився невикористаним. Його присутність виявляють шляхом позитивної реакції з еритроцитами, слабо сенсibilізованих антитілами.

7.5.4.1.5.2. Підготовка еритроцитів, сенсibilізованих відповідним чином

1. Зробити у розчині NaCl кілька розведень сироватки, яка містить неповні антитіла анти-D.
2. Узявши D-позитивні еритроцити з гетерозиготною експресією (наприклад, DCsee), проаналізувати кожне розведення в антиглобуліновому тесті.
3. Для подальших дій обрати ті еритроцити, які після сенсibilізації антитілами дали з антиглобуліновим реактивом аглютинацію з інтенсивністю між 2+ та 3+.
4. Приготувати 5% завись 3-разово відмитих несенсibilізованих еритроцитів у розчині NaCl та перенести по 1 частині до 2-х пробірок.

5. В обидві пробірки додати по 2 частини антиглобулінового реактиву, перемішати та відцентрифугувати.

6. В одну пробірку додати 1 частину сироватки (без аглютинуючих іррегулярних антитіл), розведеної 1/1000 розчином NaCl; у другу пробірку — 1 частину розчину NaCl.

7. В обидві пробірки додати 1 частину 3–4% слабосенсибілізованих контрольних еритроцитів у розчині NaCl та відцентрифугувати.

7.5.4.1.5.3. Інтерпретація результату

Відсутність аглютинації у пробірці, яка містить розведену 1:1000 сироватку, та аглютинація (дві популяції еритроцитів) у пробірці, яка містить розчин NaCl, свідчить про правильний вибір розведення сироватки анти-D для сенсibiлізації еритроцитів.

Якщо ж аглютинація спостерігається також у пробірці, до якої додано розведену сироватку, це свідчить про надто сильну сенсibiлізацію еритроцитів. У такому разі всю процедуру слід повторити, обравши для сенсibiлізації інше розведення сироватки.

***УВАГА!** Після встановлення, яке саме розведення сироватки анти-D оптимальне для аглютинації еритроцитів, слід готувати щодня свіжі порції сенсibiлізованих відмитих еритроцитів.*

7.5.4.1.5.4. Контроль ймовірності негативного результату антиглобулінового тесту

Після визначення результатів антиглобулінового тесту в кожну з пробірок, у яких міститься негативний результат, додати 1 частину слабосенсибілізованих еритроцитів, перемішати, відцентрифугувати і перевірити результат.

Наявність аглютинації (дві популяції еритроцитів) в усіх пробірках, у яких антиглобуліновий тест кваліфікували як негативний, свідчить про правильне його виконання.

Відсутність аглютинації свідчить про помилки технічного характеру; у такому разі слід повторити антиглобуліновий тест.

Результат контролю записують у протоколі аналізу.

***УВАГА!** Вищеописаний контроль антиглобулінового тесту застосовують до всіх методик НАГТ, а також до ПАГТ, виконаних методом у пробірках.*

7.5.4.1.6. Джерела помилок в антиглобуліновому тесті у пробірках

7.5.4.1.6.1. Найбільш поширені причини псевдопозитивних результатів

1. Надто швидке або надто тривале центрифугування еритроцитів із антиглобуліновим реактивом.

2. Ігнорування наявності у сироватці повних антитіл, активних при температурі 37 °С.

3. Бактеріальне забруднення еритроцитів або сироваток; брудні пробірки. Для аналізів слід брати виключно одноразові пробірки!

4. Забруднення розчину NaCl іонами важких металів.

У методиці LISS (окрім вищеописаних найпоширеніших джерел помилок) антиглобулінові реактиви, що мають високу активність стосовно компонентів системи комплементу, можуть виявляти ці компоненти, зв'язані аутоантитілами холододового типу на еритроцитах, особливо якщо еритроцити перебувають у вигляді згустка. У таких випадках реакцію ідентичної інтенсивності отримують при проведенні аналізу із аутологічними еритроцитами (аутоконтроль). Тест слід повторити, застосовуючи класичну методику НАГТ або моновалентний антиглобуліновий реактив анти-IgG.

7.5.4.1.6.2. Найбільш поширені причини псевдонегативних результатів

1. Надто повільне або надто короткий час центрифугування еритроцитів з антиглобуліновим реактивом.

2. Нейтралізація антиглобулінового реактиву залишками сироватки людини; причиною може бути недостатньо ретельне відмивання еритроцитів або використання багаторазових пробірок.

3. Застосування для інкубування неправильної пропорції сироватки та еритроцитів. Це особливо стосується методики LISS, при якій надмірна кількість сироватки, що інкубується з еритроцитами, підвищує іонну силу середовища та послаблює ефект реакції, яка відбувається протягом 20 хвилин.

4. Надто короткий або надто довгий час інкубування.
5. Перерви в ході виконання дій на всіх етапах антиглобулінового тесту після фази інкубування еритроцитів із сироваткою; а особливо — перерви під час промивання еритроцитів, що можуть призвести до елюції антитіл, пов'язаних з еритроцитами.

7.5.5. Визначення титру антитіл у сироватці

Титр антитіл — це максимальне розведення сироватки, в якому ще спостерігається серологічна реакція з відповідним антигеном. Титр виражається числом, яке являє собою зворотне число від величини розведення сироватки. Наприклад, якщо максимальне реагуюче розведення становить 1:32, то титр виражається числом 32.

7.5.5.1. Принцип дослідження

1. Розрахувати точний об'єм сироватки, потрібний для виконання аналізу, беручи до уваги кількість узятих зависей еритроцитів, середовище та діапазон температури.
2. У ряд пробірок (за винятком першої) помістити однакові об'єми рідини, яка служить для розведення аналізованої сироватки (наприклад, розчин NaCl, сироватка людини групи крові АВ).
3. Додати в першу і другу пробірку досліджувану сироватку в об'ємі, еквівалентному об'єму використаної рідини.
4. Перемішавши піпеткою, перенести з другої пробірки половину одержаного об'єму у третю пробірку.
5. Ті самі дії повторювати до кінця ряду.

***УВАГА!** Описані дії найкраще виконувати за допомогою автоматичних піпеток. При використанні пастерівських піпеток одиницею вимірювання є крапля, що повільно спадає, — піпетку слід тримати завжди в одному й тому самому положенні, під одним кутом.*

7.5.5.2. Метод у пробірках

1. Підготувати відповідну кількість рядів пробірок. Кількість пробірок у ряду має дорівнювати кількості в ряду початкових (маточних) розведень.
2. Із кожної пробірки ряду розведень, починаючи з останньої, перенести по дві краплі.
3. Додати у весь ряд по краплі потрібної 3–4% зависі еритроцитів.
4. Інкубувати при відповідній температурі протягом визначеного часу; температура і час інкубування залежать від специфічності антитіл.
5. Після центрифугування визначити результати.

***УВАГА!** З метою визначення титру антитіл у сироватці за допомогою НАГТ слід брати такі пропорції сироватки та зависі еритроцитів, як рекомендовано у п. 7.5.4.*

7.5.5.3. Метод мікроколонок

Цей метод рекомендують для визначення титру антитіл анти-А і анти-В класів IgM та IgG у сироватці реципієнта та/або донора кровотворних стовбурових клітин.

Визначення титру антитіл класу IgM на нейтральній карті

1. Зробити ряд розведень аналізованої сироватки у розчині NaCl у геометричній прогресії.
2. Позначити карти порядковими номерами розведень сироватки (2, 4, 8, 16, 32, 64 тощо).
3. В усі мікроколони додати відповідну кількість 0,8% зависі еритроцитів групи А (або В) у розчині LISS, а потім — відповідну кількість розведеної сироватки (згідно з методикою аналізу, рекомендованою виробником реактивів).
4. Карти із сумішшю еритроцитів та розведень сироватки інкубувати протягом 15 хв. при кімнатній температурі (18–22 °С).
5. Відцентрифугувати карти і запротоколювати результати реакцій.

Визначення титру антитіл класу IgG на карті для НАГТ

Аналіз робиться із сироваткою, що була попередньо оброблена реактивами, які знищують антитіла IgM (2 ME або DTT).

1. Зробити ряд розведень сироватки, обробленої DTT або 2 ME, у розчині NaCl у геометричній прогресії.
2. Позначити карту для НАГТ порядковими номерами розведень сироватки (2, 4, 8, 16, 32, 64 тощо).
3. В усі мікроколони додати відповідну кількість 0,8% зависі еритроцитів групи А (або В) у розчині LISS, а потім — відповідну кількість розведеної сироватки (згідно з методикою аналізу, рекомендованою виробником реактивів).
4. Інкубувати 15 хв. при температурі 37 °С.
5. Відцентрифугувати карти і за протоколювати результати реакцій.

7.5.6. Виявлення речовини АВН у слині

Цей аналіз роблять задля ідентифікації різновидів антигенів системи АВ0.

7.5.6.1. Підготовка слини до аналізу

1. Зібрати кілька мілілітрів слини в суху пробірку (у випадку немовлят — слиною змочують фільтрувальний папір або марлю) та помістити у пробірку, яка містить кілька крапель розчину NaCl.
 2. Відцентрифугувати і перевести надосад в окрему пробірку.
 3. Пробірку розташувати на «водяній бані» з киплячою водою і витримати протягом 10 хв.
- Якщо аналіз планується робити не в день отримання слини, зразок слід зберігати у замороженому стані.

7.5.6.2. Проведення аналізу

1. Встановити розведення сироватки, моноклонального реактиву або лектину, що планується використовувати під час аналізу (вони мають бути розведені розчином NaCl, до отримання інтенсивності аглютинації стандартних еритроцитів на 2+). Встановлюючи розведення сироватки анти-А, слід застосовувати еритроцити A_2 ; для сироватки анти-В — еритроцити A_1B ; для лектину Н — еритроцити групи 0.
2. Приготувати кілька розведень аналізованої слини, а також слини секретора і несекретора у розчині NaCl (у пропорції 1:5, 1:20, 1:80 та 1:320), та помістити по 2 краплі у ряд пробірок.
3. У ряди розведень додати ідентичну кількість реактиву анти-А, анти-В або лектину анти-Н у попередньо встановленому розведенні.
4. У додаткову пробірку помістити розведений реактив і додати ідентичну кількість розчину NaCl.
5. Залишити пробірки на 30 хв. при кімнатній температурі.
6. В усі пробірки додати по 2 краплі 3% зависі еритроцитів (тих самих, які були використані для визначення розведення реактиву).
7. Суміші залишити на 15 хв. при кімнатній температурі.
8. Визначити результати мікроскопічним способом.

УВАГА! Інтерпретацію результатів подано у таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Оцінка секреції групової субстанції А

	Сироватка анти-А + Розведення слини				Сироватка анти-А та Розчин NaCl	Стан секреції
	1:5	1:20	1:80	1:320		
Еритроцити A_2	++	++	++	++	++	Несекретор
	–	–	–	+	++	Нормальний секретор
	–	–	+	++	++	Слабкий секретор

7.5.7. Відокремлення двох популяцій еритроцитів

Для розпізнання двох популяцій еритроцитів, що відрізняються антигенами, треба виявити наявність аглютинатів на фоні однорідної зависі еритроцитів після контакту з відповідними антитілами.

7.5.7.1. Приклад двох популяцій еритроцитів груп АВ та А

Анти-А	Анти-В	Анти-А, В
4+	Великі аглютинати на тлі однорідної зависі	4+

У такому разі для поділу 2-х популяцій застосовують реактив анти-В.

7.5.7.2. Спосіб дій

1. Приготувати 25% завись еритроцитів у розчині NaCl.
2. У пробірку розміром 100 × 15 мм помістити 0,5 мл зависі еритроцитів.
3. Додати до неї 4 частини діагностичного реактиву, який у реакції із цими еритроцитами спричиняв їх часткову аглютинацію.
4. Обережно центрифугувати протягом кількох секунд при дуже низьких обертах центрифуги.
5. Зібрати верхній шар еритроцитів (аглютинати осідають на дно) та перенести в окрему пробірку.
6. Наповнити пробірку розчином NaCl.
7. Повторювати дії, описані в підпунктах 4–6, до моменту отримання однорідної зависі еритроцитів (без аглютинатів).
8. До краплі однорідної зависі додати краплю реактиву, що застосовувався для поділу еритроцитів, відцентрифугувати та визначити результат. Відсутність аглютинації свідчить про правильне розділення двох популяцій.

УВАГА! Наявність аглютинатів свідчить про необхідність повторення всієї процедури.

7.5.7.3. Вивільнення еритроцитів з аглютинатів, отриманих під час розділення двох популяцій

За цією методикою антитіла, які механічно вивільняють з аглютинатів, зв'язуються з відповідним для них антигеном, який міститься у груповій субстанції або слині, а еритроцити переходять у завись.

1. Ретельно ізольовані аглютинати відмити розчином NaCl.
2. До 1 частини аглютинатів додати 4 частини слини відповідного секретора, розведеної 1:2 сироваткою групи АВ.
3. Вміст пробірки енергійно струшувати протягом близько 30 хвилин.
4. Еритроцити, звільнені від антитіл, тричі відмити розчином NaCl та мікроскопією проконтролювати однорідність зависі.
5. Виконати фенотипічний аналіз, порівнюючи результати з результатами аналізів неаглютинованої популяції еритроцитів.

УВАГА! Можливе виділення двох популяцій еритроцитів за допомогою діагностичних реактивів інших групових систем, поза рамками системи АВ0, якщо ці реактиви містять повні антитіла, наприклад, анти-М, анти-Р₁.

7.5.8. Метод відокремлення перелитих еритроцитів від аутологічних

Цей метод є придатним лише для тих випадків, коли від останнього переливання минуло понад 3 дні.

7.5.8.1. Спосіб дій

1. Узяти у хворого (реципієнта) кров на консервант EDTA.
2. Еритроцити тричі відмити розчином NaCl. Під час останнього відмивання слід застосовувати вищі оберти центрифугування — для максимального ущільнення еритроцитів.
3. Ретельно видалити надосад, не порушуючи цілісність білуватого лейкоцитарно-тромбоцитарного шару над еритроцитами.

4. Видалити лейкоцитарно-тромбоцитарний шар, а прилеглий, верхній, шар еритроцитів перенести в окрему пробірку і старанно перемішати.
5. Наповнити еритроцитами 10 гематокритних капілярів, залишаючи незаповненими відрізки завдовжки 2 см, і запаяти капіляри або щільно закрити спеціальним пластичним матеріалом.
6. Помістити капіляри в гематокритну центрифугу і центрифугувати протягом 15 хв.
7. Верхні частини капілярів, в яких містяться еритроцити хворого, відрізати на відстані 3–5 мм нижче від рівня відцентрованої колонки еритроцитів і перенести їх в окрему пробірку, наповнену розчином NaCl.
8. За допомогою пастерівської піпетки звільнити еритроцити, що містяться у відрізнаних фрагментах капілярів, і завись перевести в окрему пробірку.
9. Еритроцити тричі відмити розчином NaCl.
10. Таким самим способом виділити з нижніх частин капілярних трубок суміш перелитих еритроцитів та еритроцитів хворого.
11. Здійснити одночасно фенотипічні аналізи еритроцитів із верхнього та нижнього шарів капілярних трубок; порівняти результати.

УВАГА! Цей метод не є ефективним у випадках уповільненого відновлення еритроцитів у хворого (аплазія кісткового мозку).

7.5.9. Адсорбція/елюція антитіл

Адсорбцію та елюцію здійснюють для:

- ідентифікації наявних у сироватці поліспецифічних алоантитіл; у таких випадках зразки сироватки слід адсорбувати кількома різновидами еритроцитів із підібраними відповідним чином антигенами, а одержані елюати аналізувати набором стандартних еритроцитів;
- підтвердження виявлених різновидів антигенів, насамперед А, В та D; у таких випадках діагностичні реактиви слід адсорбувати досліджуваними еритроцитами, а елюати аналізувати за допомогою стандартних еритроцитів, що містять відповідний антиген.

Елюцію антитіл здійснюють також із метою встановлення специфічності антитіл, пов'язаних із еритроцитами *in vivo*, а саме:

- а) при гемолітичних післятрансфузійних реакціях;
- б) для хворих з аутоімунною гемолітичною анемією;
- в) для новонароджених із гемолітичною хворобою.

У випадках б) та в) елюат може бути використаний для підбору крові для переливання.

УВАГА! Застосовуючи у методах адсорбції/елюції антитіл розчин кислого гліцину та EDTA, можливе використання фірмових реактивів та, відповідно, порядок дій згідно з рекомендаціями виробника.

7.5.9.1. Адсорбція антитіл

Принципи проведення адсорбції:

1. Еритроцити 4-разово відмити розчином NaCl.
2. До осаду еритроцитів додати досліджувану сироватку або реактив, що містить антитіла (у співвідношенні: 1 частина еритроцитів до 2 частин сироватки або реактиву).
3. Суміш інкубувати протягом 1–2 год. при температурі, яка є оптимальною для реакції наявних антитіл, час від часу струшуючи вміст пробірки.
4. Відцентрифугувати при тій же температурі.
5. Відділити сироватку та помістити в окрему пробірку — для проведення порівняльного аналізу вмісту антитіл до і після адсорбції еритроцитами.
6. З еритроцитів, використаних для адсорбції, виготовити елюат і проаналізувати його специфічність.

УВАГА! Якщо антитіла, що містяться у сироватці, виявляють слабку активність, то слід збільшити частину сироватки по відношенню до еритроцитів, використаних для адсорбції (наприклад, 4 частини сироватки та 1 частину еритроцитів).

7.5.9.2. Методики елюції антитіл

Загальні принципи:

Еритроцити, сенсibilізовані антитілами, відмити щонайменше 4 рази великою кількістю розчину NaCl. Для еритроцитів, сенсibilізованих антитілами холодого типу, застосовують розчин NaCl, охолоджений до температури 0 °С. Еритроцити, сенсibilізовані антитілами теплового типу, відмивають розчином NaCl кімнатної температури. Центрифужні стакани заповнюють водою, температура якої ідентична температурі використаного розчину NaCl. Якщо елюції передуватиме адсорбція антитіл, то необхідно зберегти надосад після останнього відмивання еритроцитів та проаналізувати його одночасно з елюатом. Це робиться для контролю правильності відмивання еритроцитів. Елюати, незалежно від методу їх виготовлення, слід аналізувати одразу після виготовлення або ж зберігати в замороженому стані до моменту аналізу.

7.5.9.2.1. Тепловий метод

Цей метод застосовують головним чином для елюції антитіл класу IgM системи АВ0.

1. Осад відмитих еритроцитів розподілити по кількох пробірках, у кількості не більше 10 крапель.
2. Додати еквівалентний об'єм розчину NaCl, а для неповних антитіл — сироватку групи АВ.
3. Помістити пробірки у водяний термостат при температурі 56 °С на 10–15 хв. (не довше), постійно але обережно струшуючи їхній вміст.
4. Центрифугувати при температурі 56 °С протягом 1–3 хв.
5. Одразу після центрифугування відокремити надосад від осаду еритроцитів.

УВАГА!

- А. Якщо еритроцити були сенсibilізовані слабоактивними антитілами — можливе додавання меншої кількості розчину NaCl або сироватки групи АВ (наприклад, 1/2 об'єму).*
- Б. Отриманий елюат має червоне забарвлення у зв'язку з неминучим гемолізом, що ускладнює його аналіз колонковим мікрометодом.*

7.5.9.2.2. Ефірно-тепловий метод

Цей метод використовують головним чином для елюції антитіл класу IgG. Завдяки цьому методу отримують елюат, збагачений антитілами, вивільненими зі строми еритроцитів.

1. До осаду відмитих еритроцитів додати 1 частину розчину NaCl та 1,5 частини етилового ефіру. Пробірку щільно закоркувати.
2. Енергійно струшуюти вміст пробірки протягом 2–5 хв.
3. Центрифугувати протягом 10 хвилин при $610 \times g$, для розподілення суміші на 3 шари.
4. Після центрифугування верхній, ефірний, шар видалити.
5. Пробірку, що містить середній шар зі строми еритроцитів, а також нижній шар — антитіла, — помістити для випаровування ефіру приблизно на 5 хв. на «водяну баню» при температурі 56 °С, і постійно перемішувати склянню паличкою до повного випаровування залишків ефірного шару.
6. Після випаровування ефіру пробірку центрифугувати при температурі 56 °С протягом 5 хв. при $610 \times g$. Одразу відокремити надосад від осаду, не зачіпаючи шар строми еритроцитів.

7.5.9.2.3. Метод із застосуванням кислото гліцину та EDTA

Цей метод використовують для елюції антитіл класу IgG. Перевагою методу є одержання безбарвного елюату, придатного і для аналізів колонковим мікрометодом.

1. Еритроцити, сенсibilізовані антитілами, відмити 6 разів розчином NaCl.
2. До 10 крапель осаду еритроцитів додати заздалегідь підготовані реактиви: 20 крапель буфера 0,1 моль/л гліцину та 5 крапель 10% EDTA-Na₂.
3. Ретельно перемішавши, залишити при кімнатній температурі на 2 хв.
4. Додати 3 краплі 1 моль/л TRIS-NaCl, перемішати і центрифугувати протягом 1 хв. при $600 \times g$.
5. Прозорий надосад/елюат перенести в окрему пробірку.
6. За допомогою лакмусового паперу перевірити рН елюату і довести його за допомогою TRIS-NaCl до 7,0–7,4.

7.5.10. Виділення аутоантитіл із метою вивільнення антигенових детермінант на еритроцитах

Вилучення аутоантитіл із метою визначення фенотипу еритроцитів є необхідним, якщо в аналізах застосовуються сироватки людини. Однак, використовуючи моноклональні реактиви, можна визначити фенотип і без вилучення аутоантитіл. Виняток становлять аутоантитіла з високою специфічністю, які зустрічаються дуже рідко. У такому випадку звільнення еритроцитів від аутоантитіл стає необхідністю.

7.5.10.1. Метод із застосуванням хлорохін фосфату

Хлорохін повністю вилучає з поверхні еритроцитів антитіла класу IgG, залишаючи компоненти C3 системи комплементу, абсорбованого *in vivo*. Цей реактив не знищує антигенів систем ABO, MNS, Ii, Kell, Duffy, Kidd, Gerbich, а також LW, однак ослаблює експресію антигенів системи Rh. Під впливом хлорохіну руйнуються антигени системи Lewis.

1. Із крові, узятої на EDTA, приготувати осад еритроцитів, попередньо відмитих 4 рази розчином NaCl.
2. До 4 частин розчину хлорохін фосфату (п. 7.3.3.11) додати 1 частину осаду еритроцитів.
3. Суміш інкубувати при температурі 37 °C протягом 30–60 хв., при цьому кілька разів струсити вміст пробірки.
4. Еритроцити 4-разово відмити розчином NaCl.
5. Перевірити ефективність дії хлорохіну за допомогою ПАГТ.

УВАГА! Негативний результат ПАГТ дозволяє виконувати фенотипічні аналізи.

7.5.10.2. Метод із застосуванням кислого гліцину та EDTA

Кисле середовище спричиняє повне відокремлення молекул IgG від поверхні еритроцитів. Цей швидкий і дуже зручний метод успішно замінює методику з використанням реактиву MЕР, яка застосовувалася вище. Метод із кислим гліцином та EDTA не впливає на зміну експресії антигенів різних групових систем, за винятком антигенів системи Kell, експресія яких значно послаблюється. Антигени цієї системи, однак, можна виявити, застосовуючи мікроколонковий метод із гелем.

1. Одну краплю густих еритроцитів 3-разово відмити розчином NaCl.
2. До 20 крапель розчину кислого гліцину додати 5 крапель EDTA.
3. Двадцять п'ять (25) крапель цієї суміші додати до осаду еритроцитів і залишити при кімнатній температурі на 1–2 хв.
4. Додати 3 краплі 1 моль/л TRIS-NaCl і відцентрифугувати.
5. Лакмусовим папером перевірити рН надосаду і довести його до 7,0–7,4 за допомогою TRIS-NaCl; при цьому після додавання кожної краплі перемішувати вміст пробірки; центрифугувати її та перевіряти рН.
6. Видалити надосад і 4-разово відмити еритроцити розчином NaCl.
7. Провести ПАГТ.

УВАГА! Негативний результат ПАГТ свідчить про повне звільнення еритроцитів від антитіл та вказує, що еритроцити придатні для фенотипічних аналізів. Якщо ж результат ПАГТ позитивний — еритроцити треба ще раз обробити сумішшю кислого гліцину та EDTA і повторити всю процедуру.

7.5.11. Адсорбція аутоантитіл із сироватки

Адсорбцію аутоантитіл проводять для хворих з АІГА для з'ясування наявності у сироватці, окрім аутоантитіл, імунних алоантитіл, виявлення яких є дуже важливим, зокрема, при підборі крові для переливання. Для адсорбції аутоантитіл можливе застосування аутологічних еритроцитів (аутоадсорбція) або правильно підібраних алогенних еритроцитів (алоадсорбція, яку називають також диференційною адсорбцією). Застосування аутоадсорбції чи алоадсорбції залежить від наявності переливання крові цьому хворому у 3-місячний період до теперішнього аналізу. Якщо

таке переливання мало місце, аутоадсорбція може виявитися неефективною, оскільки еритроцити хворого являють собою в такому разі суміш власних та перелитих еритроцитів, які *in vitro* можуть адсорбувати алоантитіла. Отже, для адсорбування аутоантитіл слід тоді застосувати алоадсорбцію.

7.5.11.1. Аутоадсорбція

Аутоадсорбцію найчастіше проводять за допомогою аутологічних еритроцитів, звільнених від аутоантитіл. Якщо аутоантитіла дають сильнішу реакцію в ензимному тесті, ніж в антиглобуліновому, — для аутоадсорбції беруть еритроцити, оброблені кислим гліцином та EDTA, а потім — папаїновим реактивом, або ж еритроцити, оброблені реактивом МЕР. Якщо аутоантитіла дають сильнішу реакцію в антиглобуліновому тесті, ніж в ензимному, аутоадсорбцію проводять за допомогою еритроцитів, оброблених розчином хлорохін фосфату, або еритроцитів у середовищі PEG.

7.5.11.1.1. Метод аутоадсорбції зі застосуванням еритроцитів, оброблених кислим гліцином, EDTA та папаїновим реактивом

7.5.11.1.1.1. Підготовка еритроцитів до аутоадсорбції

1. Еритроцити 3-разово відмити розчином NaCl.
2. У двох пробірках розмістити по 10 крапель осаду еритроцитів.
3. До 40 крапель розчину кислого гліцину додати 10 крапель EDTA.
4. В обидві пробірки додати по 25 крапель приготованого реактиву.
5. Пробірки залишити при кімнатній температурі на 1 хв. (не довше ніж на 1,5 хв.).
6. Додати по 3 краплі TRIS-NaCl — для нейтралізації суміші.
7. Пробірки відцентрифугувати і перевірити рН супернатанту; рН треба довести до 7,4 за допомогою покрапельного додавання TRIS-NaCl.
8. Еритроцити 3-разово відмити розчином NaCl.
9. Розвести папаїновий реактив у співвідношенні: 1 частина реактиву на 9 частин розчину NaCl.
10. До осаду відмитих еритроцитів у пробірках додати по 20 крапель розведеного папаїнового реактиву.
11. Інкубувати протягом 10–15 хв. при температурі 37 °С.
12. Еритроцити 4-разово відмити розчином NaCl.

УВАГА! Осад еритроцитів в одній пробірці використовується для проведення однієї аутоадсорбції. Другу пробірку слід залишити на цей час у холодильнику (температура 2–6 °С) і використати еритроцити для контролю сироватки після аутоадсорбції; якщо ж одноразова аутоадсорбція виявилася неефективною — ці еритроцити слід узяти для проведення наступної адсорбції.

7.5.11.1.1.2. Виконання аутоадсорбції

1. До осаду еритроцитів додати 10 крапель аналізованої сироватки та перемішати.
2. Пробірку із цим вмістом витримати 10 хв. при температурі 37 °С і час від часу струшувати для полегшення контакту аутоантитіл з антигенними детермінантами на еритроцитах.
3. Відцентрифугувати і перевести надосад в окрему пробірку.

7.5.11.1.1.3. Контроль аутоадсорбції

Сироватку, з якою здійснювали аутоадсорбції, слід проконтролювати за допомогою еритроцитів, узятих з осаду, що залишився у другій пробірці; при цьому слід застосувати методику безпосередньої аглютинації у розчині NaCl або колонковий мікрометод. Відсутність аглютинації свідчить про те, що аутоадсорбція проведена правильно. Наявність аглютинації вказує на необхідність проведення повторної аутоадсорбції.

УВАГА! Якщо із сироватки треба усунути аутоантитіла до антигенів, які руйнує папаїновий реактив, етап папаїнування еритроцитів перед аутоадсорбцією слід пропустити. У цьому випадку можна подовжити час інкубування сироватки з еритроцитами.

7.5.11.1.2. Метод аутоадсорбції із застосуванням еритроцитів, оброблених розчином МЕР

1. Приготувати близько 2 мл осаду еритроцитів хворого.
2. Додати 2 частини реактиву МЕР (п. 7.3.3.8) та інкубувати при температурі 37 °С протягом 20 хв.
3. Еритроцити відмити 4-рази великою кількістю розчину NaCl.
4. Перевірити за допомогою антиглобулінового тесту виділення аутоантитіл.
5. Якщо результат антиглобулінового тесту позитивний — провести ще раз інкубацію еритроцитів із реактивом МЕР.
6. До частини осаду еритроцитів, звільнених від аутоантитіл (наприклад, до 20 крапель), додати еквівалентний об'єм аутологічної сироватки та інкубувати протягом 60 хвилин при температурі 37 °С.
7. Відцентрифугувати та перевести надосад (сироватку) еритроцитів в окрему пробірку.
8. Проконтролювати результат аутоадсорбції за допомогою антиглобулінового тесту, додаючи до адсорбованої сироватки аутологічні еритроцити, попередньо оброблені реактивом МЕР.

УВАГА!

- А. Негативний результат антиглобулінового тесту з аутологічними еритроцитами, позбавленими аутоантитіл, вказує, що у сироватці можливе визначення алоантитіл.*
- Б. Позитивний результат антиглобулінового тесту свідчить про необхідність проведення повторної аутоадсорбції.*
- В. Реактив МЕР руйнує детермінанти антигенів систем Kell, MNS та Gerbich, послаблює експресію антигенів LW та Duffy, посилює експресію антигенів систем Rh, Kidd, P, Ii та Lewis.*

7.5.11.1.3. Метод аутоадсорбції у середовищі 20% PEG

Окрім вищеописаних методів, можливе застосування принципу адсорбції аутоантитіл нативними еритроцитами (які не піддавались елюції аутоантитіл та дії ензимів) із додаванням 20% PEG, який посилює реакцію антитіло–антиген. Цей метод рекомендують особливо у випадках, коли активність аутоантитіл у сироватці вища в антиглобулінових тестах, ніж в ензимних.

7.5.11.1.3.1. Проведення адсорбції

1. Приготувати близько 2 мл ущільнених, попередньо 3-разово відмитих еритроцитів хворого.
2. Змішати рівні частини (наприклад, по 25 крапель) еритроцитів, сироватки та PEG.
3. Суміш інкубувати протягом 15 хв. при температурі 37 °С.
4. Відцентрифугувати і перевести надосад, що містить сироватку та PEG, в окрему пробірку.

7.5.11.1.3.2. Контроль результативності аутоадсорбції

Для цієї мети слід узяти еритроцити хворого, звільнені від аутоантитіл за допомогою методу з кислим гліцином (п. 7.5.10.2). Аналіз слід провести в межах антиглобулінового тесту, беручи такі пропорції: 4 краплі сироватки (в якій уже є PEG) та 1 крапля 3–5% аутологічних еритроцитів, з яких вилучено аутоантитіла.

1. Інкубувати протягом 15 хв. при температурі 37 °С.
2. Відмити еритроцити 4 рази.
3. Проаналізувати їх з антиглобуліновою сироваткою анти-IgG.

Негативний результат свідчить, що аутоантитіла адсорбовано. Позитивний результат вказує на необхідність проведення повторної аутоадсорбції. Чергову аутоадсорбцію проводять, змішуючи той самий об'єм сироватки з новою порцією аутологічних еритроцитів, уже не додаючи PEG. Вільну від аутоантитіл сироватку аналізують зі стандартними еритроцитами з метою виявлення алоантитіл. Аналіз слід зробити в межах антиглобулінового тесту: 4 краплі сироватки (в якій уже є PEG) та 1 крапля 3–5% зависі стандартних еритроцитів. Наступні етапи — як описано вище, починаючи з підпункту 1.

7.5.11.2. Алоадсорбція

Для проведення цього типу адсорбції слід обирати стандартні еритроцити так, щоб вони диференціювалися між собою визначеними фенотипами. Доречною буде інформація фенотипу еритроцитів хворого за системами Rh, Kidd, антигенів K, M та S, а також, якщо це можливо, антигенів Duffy

та s, оскільки це дозволяє брати меншу кількість різновидів стандартних еритроцитів для адсорбції. Найчастіше алоадсорбцію проводять із 2–3 різновидами гомозиготних еритроцитів за кожною з-поміж названих систем. Адсорбцію проводять окремо з кожним різновидом еритроцитів.

Приклад підбору комплекту еритроцитів для адсорбції для пацієнта з фенотипом DCCee K-:

- 1) DCCee kk MM ss Jk(a-b+) Fy(a+b-);
- 2) DCCee kk NN SS Jk(a+b-) Fy(a-b+).

Якщо активність аутоантитіл в ензимному тесті вища, ніж в антиглобуліновому, алоадсорбцію проводять з еритроцитами, обробленими папаїном. Якщо ж аутоантитіла виявляють вищу активність в антиглобуліновому тесті, ніж в ензимному, — алоадсорбцію проводять у середовищі PEG.

7.5.11.2.1. Алоадсорбція аутоантитіл у середовищі 20% PEG

7.5.11.2.1.1. Проведення алоадсорбції

1. Приготувати приблизно по 2 мл ущільнених еритроцитів, призначених для адсорбції, попередньо відмитих у розчині NaCl.
2. В окремих пробірках змішати однакові частини: сироватки, ущільнених еритроцитів одного різновиду та 20% PEG.
3. Суміш інкубувати протягом 15 хв. при температурі 37 °С.
4. Відцентрифугувати і перевести супернатанти, що містять сироватку та PEG, в окремі пробірки.

7.5.11.2.1.2. Контроль результативності алоадсорбції

Для цього слід узяти еритроцити хворого, з яких вилучено антитіла за допомогою кислого гліцину (п. 7.5.10.2). Аналіз слід провести в межах антиглобулінового тесту, беручи такі пропорції: 4 краплі сироватки (в якій уже є PEG) та 1 крапля 3–5% зависі аутологічних еритроцитів, з яких вилучено аутоантитіла.

1. Інкубувати протягом 15 хв. при температурі 37 °С.
2. Відмити еритроцити 4 рази.
3. Проаналізувати їх з антиглобуліновою сироваткою анти-IgG.

Негативний результат свідчить, що аутоантитіла адсорбовано. Позитивний результат вказує на необхідність проведення повторної алоадсорбції. Чергову алоадсорбцію проводять, змішуючи той самий об'єм сироватки з новою порцією еритроцитів (кожного різновиду окремо), вже не додаючи PEG. Вільну від аутоантитіл сироватку аналізують зі стандартними еритроцитами з метою виявлення алоантитіл. Аналіз слід зробити в межах антиглобулінового тесту: 4 краплі сироватки (в якій уже є PEG) та 1 крапля 3–5% зависі зразкових еритроцитів у NaCl. Наступні етапи — як описано вище, починаючи з підпункту 1.

7.5.11.2.2. Алоадсорбція аутоантитіл еритроцитами, обробленими папаїном

7.5.11.2.2.1. Проведення алоадсорбції

1. Приготувати близько 2 мл ущільнених еритроцитів, призначених для адсорбції, попередньо відмитих у розчині NaCl.
2. Еритроцити папаїнізувати (згідно з п. 7.5.1.3.1).
3. В окремих пробірках змішати однакові об'єми сироватки та густих еритроцитів, оброблених папаїном одного різновиду.
4. Суміш інкубувати протягом 30 хв. при температурі 37 °С.
5. Відцентрифугувати та перевести сироватку в окремі пробірки.

7.5.11.2.2.2. Контроль результативності алоадсорбції

Для цього слід узяти еритроцити хворого, з яких вилучено антитіла за допомогою кислого гліцину (п. 7.5.11.2); ці еритроцити мають бути один раз відмиті розчином LISS.

Аналіз слід робити в межах антиглобулінового тесту LISS: 2 краплі сироватки та 2 краплі 2–3% зависі аутологічних еритроцитів у розчині LISS.

1. Інкубувати протягом 20 хв. при температурі 37 °С.
2. Відмити 4 рази.
3. Проаналізувати з багатоспецифічною антиглобуліновою сироваткою.

Негативний результат свідчить, що аутоантитіла адсорбовано. Позитивний результат вказує на необхідність проведення повторної алоадсорбції. Чергову алоадсорбцію проводять, змішуючи той самий об'єм сироватки з новою порцією еритроцитів, оброблених папаїном (кожного різновиду окремо). Вільну від аутоантитіл сироватку аналізують зі стандартними еритроцитами з метою виявлення алоантитіл.

УВАГА! Дуже важливо правильно проаналізувати результати реакції сироватки після алоадсорбції зі стандартними еритроцитами. Слід усвідомлювати, що алогенні еритроцити адсорбують не тільки аутоантитіла із сироватки хворого, але можуть також адсорбувати й алоантитіла. Тому реакції сироватки після адсорбції одним різновидом еритроцитів можуть відрізнятися від реакцій сироватки, адсорбованої еритроцитами іншого фенотипу.

7.5.12. Диференціація антитіл IgG та IgM

Цей метод застосовується, коли необхідно встановити, чи є в аналізованій сироватці, окрім аглютининів IgM, також неповні антитіла IgG тієї самої специфічності.

Обробка сироватки 2ME та DTT спричиняє розпад і втрату серологічної активності антитіл класу IgM.

7.5.12.1. Обробка сироватки 2ME

1. Додати до аналізованої сироватки такий самий об'єм 0,1 моль/л 2ME у фосфатному буфері з рН 7,4.

2. Суміш витримати 2 год. при температурі 37 °С.

3. Здійснити аналізи зі стандартними еритроцитами в межах тестів, у яких виявлялися антитіла.

Позитивний результат свідчить про наявність антитіл IgG, негативний вказує на присутність антитіл IgM.

7.5.12.2. Обробка сироватки DTT

Проведення аналізу:

1. У пробірку помістити однаковий об'єм (наприклад, 1 мл) аналізованої сироватки та 0,01M DTT.

2. Суміш інкубувати при температурі 37 °С протягом 2 год.

3. Провести аналізи сироватки, обробленої DTT, зі стандартними еритроцитами в межах тестів, у яких виявлялися антитіла, тобто в тесті з NaCl, а також в НАГТ.

7.5.13. Виявлення дефекту в оболонці еритроцитів за допомогою поліброну

Цей метод дозволяє виявити дефект, пов'язаний з дефіцитом сіалової кислоти, що перевищує 5–7% нормального значення. Нормальні еритроцити, що мають негативний заряд, піддаються агрегації в середовищі позитивно зарядженого високомолекулярного полімеру. Завішені в цьому середовищі еритроцити, негативний заряд яких набагато зменшується (через дефіцит сіалової кислоти), взаємно відштовхуються і не зліплюються.

7.5.13.1. Підготовка еритроцитів

1. Обробити папаїном правильно підібрані контрольні еритроцити, застосовуючи цього разу дещо довший (приблизно на 5 хв.) час контакту з ензимом, порівняно з часом, який береться при підготовці еритроцитів для аналізу антитіл.

2. Приготувати 25% зависі контрольних еритроцитів — звичайних та папаїнованих, а також аналізованих еритроцитів у розчині NaCl, буферованому до рН 7,0.

7.5.13.2. Проведення аналізу

1. У 3 пробірки помістити по 1 мл 1% розчину поліброну і в кожну з них додати по 5 крапель відповідної зависі еритроцитів; ретельно перемішати.
2. Одразу ж перевести вміст пробірок у 3 піпетки ємністю 1 мл або у трубки Вестергрена і встановити їх у вертикальному положенні.
3. Через 5 хв. визначити результат уперше, а через 20 хв. — удруге.

7.5.13.3. Інтерпретація результатів

Слід порівняти, як поводяться аналізовані еритроцити та еритроцити контрольні. Якщо аналізовані еритроцити поводяться так само, як і звичайні контрольні (тобто спадають донизу), то нема підстав для висновку про дефіцит сіалової кислоти, що перевищував би 5–7%. На дефіцит сіалової кислоти вказує результат, при якому аналізовані еритроцити залишаються у зависі, так само як папаїнізовані контрольні еритроцити.

7.5.14. Колонкові (гельові) мікрометоди

Переваги колонкових тестів:

- приходять на заміну тестам, які вимагають скелець та пробірок;
- прості, безпечні та зручні у застосуванні;
- дозволяють економити діагностичні реактиви;
- дозволяють швидко здійснити велику кількість аналізів на малому об'ємі крові;
- дуже чутливі й роблять можливим виявлення навіть дуже слабких антитіл;
- виключають багато неспецифічних реакцій, наприклад, рулонізацію («монетні» стовпчики);
- в антиглобуліновому тесті не вимагають етапу відмивання еритроцитів, що дозволяє уникнути найбільш поширеної помилки.

УВАГА!

- А. Застосування гелів або скляних кульок, які заповнюють мікропробірки, дозволяє ретельно ізолювати еритроцити від оточуючого середовища. Такі наповнювачі затримують сироватку разом із надлишком невикористаних у реакції антитіл та інших глобулінів, що має особливо важливе значення в антиглобуліновому тесті.*
- Б. Застосування колонкових тестів у передтрансфузійних аналізах значно прискорює підбір крові для хворого та збільшує безпеку трансфузії.*
- В. Завдяки великій чутливості тестів зростає і вірогідність виявлення антитіл холододового типу, несуттєвих із клінічної точки зору. У таких випадках упродовж усього аналізу слід підтримувати температуру 37 °С.*

7.5.15. Автоматизація в імуногематологічних дослідженнях

Автоматичні лінії служать для повсякденних аналізів груп крові, визначення фенотипів еритроцитів та виявлення імунних алоантитіл. Вони мають знайти застосування у всіх ЗСК, зокрема при обстеженні донорів. Завдяки відповідному устаткуванню та функціям ці апарати роблять неможливою заміну одного зразка крові іншим та зменшують ризик помилок. Імуногематологічні реакції можна безпосередньо визначати та порівнювати з даними на моніторі або у роздруківці результатів. Роздруківки проведених аналізів разом із їх результатами мають зберігатися у швидкозшивачах; отже, відпадає потреба в журналах результатів обстежень, які містять протоколи аналізів, написані вручну. Крім того, апаратура надає можливість архівування всіх протоколів серологічних реакцій та результатів разом із номерами пластинок чи карток, а також назвами застосованих методик, завдяки чому результати в разі потреби можна легко відновити. Додаткова перевага — дуже економне використання діагностичних реактивів.

Виробник автоматичних і напівавтоматичних ліній має забезпечити можливість безпосередньої передачі результатів донорських аналізів у єдину комп'ютерну базу.

В аналізах груп крові реципієнтів не можна відмовлятися від візуального контролю, якщо автоматичний датчик не реєструє і не інтерпретує двох популяцій еритроцитів.

7.5.15.1. Автоматичні лінії

Автоматичні лінії самостійно проводять усю процедуру аналізу — від узяття матеріалу з досліджуваного зразка до видачі результату. Автоматична лінія виконує такі завдання:

- ідентифікацію досліджуваного зразка;
- ідентифікацію реактивів, а також підтримання реактивів у стані, готовому до вживання;
- приготування відповідних зависей еритроцитів;
- нанесення аналізованого матеріалу та реактивів на мікропластини, їх поміщення у мікропробірки тощо;
- проведення аналізу згідно з установленим алгоритмом, включно з моніторингом головних етапів процесу: дозування досліджуваних зразків та реактивів, час і температура інкубації, час і швидкість центрифугування, визначення результату та його інтерпретація, забезпечення безперервності процесу.

7.5.15.2. Напівавтомати

Напівавтомати — це системи, в яких окремі дії виконує оператор, наприклад:

- готує реактиви, стандартні еритроцити, мікропластини або карти з мікропробірками та реєструє їх дані (різновиди та номери серій, фенотип тощо);
- здійснює моніторинг етапів процесу, наприклад, час і температуру інкубації;
- стежить за безперервністю процесу.

7.5.15.3. Випробування автоматичних ліній

Перед допущенням до використання автоматичні та напівавтоматичні лінії мають бути випробувані. Ця процедура полягає у паралельному проведенні аналізів мануальним та автоматичними методами; можливе випробування за результатами автоматичного методу, який застосовувався у закладі раніше протягом тривалого часу та дозволяє оцінити правильність функціонування нової апаратури.

Випробування апаратури слід проводити після кожної несправності і після кожного технічного контролю.

Раз на тиждень слід здійснювати калібрування автоматичного датчика, діючи згідно з інструкцією виробника.

7.5.15.4. Випробування реактивів, що застосовуються в автоматичних аналізах

Кожну нову серію діагностичних реактивів та розчинників (ділюєнтів) слід випробовувати, проводячи одночасно аналізи щонайменше 5 зразків крові з новою серією реактивів та серією, яка застосовувалась раніше.

7.5.15.5. Щоденний контроль автоматичних аналізів

Контроль полягає у перевірці активності та специфічності реактивів, які були використані у цей конкретний день. Найчастіше для контролю груп крові АВ0 та антигену D застосовують еритроцити груп АВ Rh+ та 0 Rh-. Якщо реактиви зафіксовані на мікропластинах — контрольні аналізи стосуються кожної нової серії. Під час контролю достовірності антиглобулінового тесту при аналізі імунних антитіл слід застосовувати Стандарт анти-D. Інтенсивність реакції зі Стандартом не повинна перевищувати ++. Якщо інтенсивність вища, Стандарт треба відповідною мірою розвести.

Друк результатів контрольних аналізів має супроводжуватися приміткою (штампом): «Комплект пройшов контроль(дата), визнається придатним до аналізів», а також підписом та печаткою особи, яка проводила контрольні аналізи.

7.5.15.6. Архівування операційних даних

Архівування стосується таких даних:

- дата аналізу;
- особа, що призначає проведення аналізу;
- особа, що обслуговує апаратуру;
- особа, що відповідає за остаточний результат;
- інформація щодо реактивів: різновиди та номери серій;

- інформація щодо аналізів активності кожного реактиву;
- зауваження щодо можливого ручного коригування результатів;
- остаточні результати аналізу;
- порядок дій в разі сигналу про помилки, що повідомляє використана автоматична система.

УВАГА! В автоматичних аналізах можна не проводити ензимний тест при скринінгу імунних антитіл у хворих та у вагітних жінок.

7.6. Аналізи антигенів і антитіл групових систем еритроцитів у донорів та у пацієнтів

Перед початком аналізів реактиви та стандартні еритроцити слід довести до кімнатної температури.

7.6.1. Аналіз груп крові за системою АВ0

Групу крові за системою АВ0 визначають на підставі наявності або відсутності аглютинації еритроцитів, аналізованих із діагностичними реактивами, а також наявності або відсутності аглютинації стандартних еритроцитів А₁ та В з аналізованою (досліджуваною) сироваткою. Стандартні еритроцити групи 0 являють собою контрольний зразок, а їх аглютинація після контакту з аналізованою сироваткою свідчить про наявність іррегулярних антитіл. Якщо аналізовані еритроцити не реагують з діагностичними реактивами — виявлення у сироватці антитіл анти-Н за допомогою еритроцитів групи 0 полегшує розпізнавання фенотипу Bombay.

7.6.1.1. Набір діагностичних реактивів і стандартних еритроцитів

7.6.1.1.1. Реактиви

Застосовують 2 комплекти моноклональних діагностичних реактивів:

- Комплект 1: анти-А та анти-В;
- Комплект 2: анти-А і анти-В з інших клонів, відмінних від Комплекту 1.

Можливе використання комплектів, які містять реактиви з 2-х різних серій одного клону.

Реактиви слід застосовувати згідно з рекомендаціями виробника.

7.6.1.1.2. Стандартні еритроцити

Стандартні еритроцити являють собою зависі еритроцитів груп крові 0, А₁ та В. Стандартні еритроцити слід застосовувати згідно з рекомендаціями виробника.

УВАГА!

А. Еритроцити А₁ відбирають із крові групи А за допомогою аналізу з лектином анти-А₁.

Б. Усі складові діагностичного комплекту мають знаходитися в замкнених контейнерах, оснащених крапельницями.

В. У випадку застосування автоматичних методів (із дотриманням принципів, описаних у п. 7.5.15) допускається використання одного комплекту моноклональних реактивів анти-А і анти-В — за умови, що для кожного зразка крові донора/реципієнта визначають антитіла анти-А і анти-В.

Г. Визначаючи алоантитіла АВ0 в автоматичних системах, можна оминати увагою еритроцити групи 0.

7.6.1.1.3. Контроль комплекту реактивів і стандартних еритроцитів

Макроскопічний контроль діагностичних реактивів та стандартних еритроцитів слід проводити щоденно. Скаламучення, осад або гемоліз, наявний у надосаді, є достатніми причинами для вилучення складових з комплекту.

Обов'язковим є щоденний контроль специфічності та активності діагностичних реактивів у тестах, які застосовуються для аналізів. Контроль стандартних еритроцитів є обов'язковим після кожного їх виготовлення.

1. Діагностичний комплект вважається придатним до застосування, якщо одержані результати відповідають схемі у таблиці 7.2. Слід виключити з комплекту ті компоненти, які виявляють неспецифічні реакції, так само, як і ті, активність яких не відповідає критеріям, рекомендованим виробником.

2. Номери серій, умовні позначення реактивів та еритроцитів, відібраних для діагностичного комплекту, записують у Журналі аналізів груп крові (Зразок №7.5, див. п. 7.4.3) або в окремому Журналі разом із протоколом та приміткою: «Комплект пройшов контроль(дата), визнається придатним до аналізів», а також із підписом особи, яка проводила контрольні аналізи.

Таблиця 7.2

Схема результатів визначень груп крові за системою АВ0

Аналізовані зразки крові	Моноклональні реактиви		Зразкові еритроцити			Результати визначень груп крові
	анти-А	анти-В	0	A ₁	В	
№1	–	–	–	+	+	0
№2	+	–	–	–	+	А
№3	–	+	–	+	–	В
№4	+	+	–	–	–	АВ

7.6.1.2. Порядок проведення аналізу груп крові АВ0

Аналіз здійснюється мануальним або автоматичним методом згідно з рекомендаціями виробника діагностичних реактивів. Якщо мікроколонковий або автоматичний методи дали сумнівні результати, визначення групи крові за системою АВ0 здійснюють мануальним методом у пробірках.

УВАГА!

- А. Результати аналізів груп крові мають визначатися 2 особами паралельно: одна називає одержані результати реакції, а друга протоколює їх у Журналі аналізів за допомогою позначок «+» (аглютинація) та «–» або «0» (відсутність аглютинації). Після запису результатів друга особа має відслідкувати реакції на пластині, а та, яка їх уже оглядала, — перевірити правильність записів у Журналі.*
- Б. Якщо результати реакції не відповідають схемі, наведеній у таблиці 7.2, або якщо реакція аглютинації дуже слабка — у записах, що стосуються всього аналізу, слід фіксувати інтенсивність аглютинації у кожній з окремих реагуючих сумішей.*
- В. Якщо застосовуються автоматичні методи (згідно з принципами, описаними у п. 6.5.15), результат аналізу може визначатися і перевірятися однією особою.*

Після визначення та запису результатів треба провести контрольний аналіз, який полягає у повторному визначенні антигенів на еритроцитах за допомогою діагностичних реактивів із другого комплекту. Для цього аналізу беруть еритроцити з первинного зразка крові. Неможливе використання раніше приготованих зависей еритроцитів, які вже застосовувалися в основному аналізі. Отримання однозначних результатів, які збігаються з попередніми (що має бути запроTOCOLьовано), дозволяє записати кінцевий результат у графі «Результат».

7.6.1.3. Визначення антигену А₁ на еритроцитах, призначених для аналізу АВ0

Аналіз виконують за допомогою лектину анти-А₁, згідно з рекомендаціями виробника. Наявна аглютинація (від 3+ до 4+) вказує на різновид А₁.

УВАГА! Трапляється, що реакція з лектином є слабковираженою (1+). Такі еритроцити характеризують як А_{int}; їх використання як стандартних для аналізів системи АВ0 неможливе.

7.6.1.4. Причини відхилень від класичної схеми оцінки результатів аналізів груп крові АВ0

7.6.1.4.1. Технічні помилки

Можливе виникнення помилки технічного характеру:

- забруднені пластини або піпетки;
- неправильна пропорція еритроцити/реактив;
- надто пізня спроба визначення результату (висихання суміші);
- забруднення реактивів або аналізованих еритроцитів та сироватки;
- недодання діагностичного реактиву або аналізованої сироватки;
- нездійснення перевірки стандартних еритроцитів після їх приготування;
- помилка ідентифікації досліджуваних зависей еритроцитів або сироваток (заміна пробірок).

7.6.1.4.2. Нетипові властивості аналізованих еритроцитів або сироваток

Можуть спостерігатися такі нетипові властивості аналізованих еритроцитів/сироваток:

- дуже слабкі реакції регулярних аглютининів в аналізованій сироватці;
- наявність гемолізину;
- наявність аутоаглютининів;
- наявність дрібних згустків, що імітують аглютинацію;
- наявність іррегулярних антитіл в аналізованій сироватці;
- поліаглютинація аналізованих еритроцитів, яка виявляє себе у присутності діагностичних сироваток людини;
 - присутність слабого різновиду антигену А або В;
 - наявність 2 популяцій еритроцитів (природний химеризм, післятрансфузійний химеризм, післятрансплантаційний химеризм).

Якщо спостерігаються відхилення від класичної схеми результатів аналізу груп крові за системою АВ0 — потрібно:

- повторно зробити спробу визначення групи крові, використовуючи для аналізів сироватку та завись еритроцитів, які виготовлені з первинного зразка крові;
- проаналізувати еритроцити із сироваткою групи АВ та з аутологічною сироваткою у середовищі NaCl при кімнатній температурі.

Це дозволить виключити помилки технічного характеру, а також встановити поліаглютинацію та аутоаглютинацію.

7.6.1.5. Слабкі різновиди антигенів за системою АВ0

Слабкі різновиди антигенів за системою АВ0 наведені в таблиці 7.3. Про наявність слабких різновидів антигенів А або В свідчить:

- значне послаблення або відсутність аглютинації аналізованих еритроцитів із діагностичним реактивом анти-А або анти-В, якщо при цьому часто спостерігається відсутність очікуваних аглютининів;
- картина 2-х популяцій аналізованих еритроцитів із діагностичними реактивами (сироватками).

УВАГА! Моноклональні реактиви часто не диференціюють слабких різновидів, особливо Ах та А3.

Таблиця 7.3

Співставлення найтипівіших реакцій рідкісних різновидів антигенів системи АВ0 із діагностичними сироватками людини

Фенотип	Реакції еритроцитів із діагностичними реактивами				Реакції сироватки зі стандартними еритроцитами				Слина секретора містить
	анти-А	анти-В	анти-А, В*	анти-Н	А ₁	А ₂	В	0	
A ₃	Змішана аглютинація	0	Змішана аглютинація	3+	±	0	3+	0	А та Н
A _m	0/±	0	0/±	4+	0	0	4+	0	А та Н
A _x	0/±	0	1+/2+	4+	1+	0	4+	0	Н
A _{el}	0	0	0	4+	2+	0	4+	0	Н
A _{end}	+сл.	0	+сл.	4+	0	0	3+	0	Н
B ₃	0	Змішана аглютинація	Змішана аглютинація	4+	4+	4+	0	0	В та Н
B _m	0	0	0/±	4+	4+	3+	0	0	В та Н
B _x	0	0/±	0/2+	4+	4+	3+	0	0	Н
B _{частк.}	0	±	±	+сл.	3+	2+	±	0	В та Н
B _{end}	0	+сл.	+сл.	4+	3+	3+	0	0	Н
Bombay 0 _h A, 0 _h B, 0 _h AB	0	0	0	0	+	+	+	+	нема

* Сироватка людини.

Для підтвердження та ідентифікації різновиду системи АВ0 слід проводити такі дії:

1. Проаналізувати еритроцити з обраними сироватками анти-А або анти-В, а також із лектином анти-Н.
2. Застосувати більш чутливі методи (колонковий метод).
3. Проаналізувати сироватки з більшою кількістю еритроцитів А або В пробірковим методом.
4. Перевірити наявність слабого антигену на еритроцитах методом адсорбції/елюції антитіл.
5. Проаналізувати слину на предмет наявності субстанції АВН.
6. Провести сімейні аналізи.

7.6.1.6. Наявність двох популяцій еритроцитів

Наявність двох популяцій еритроцитів характеризується тим, що під впливом діагностичних реактивів тільки частина аналізованих еритроцитів піддається аглютинації, тоді як решта утворює однорідну завись (аглютинати на фоні вільних еритроцитів). Це явище може спостерігатися у таких випадках:

- наявність слабого різновиду А₃ або В₃ (в аналізах із сироватками людини);
- депресія (пригнічення) антигену А або В у частині популяції еритроцитів у перебігу хвороб кровотворної системи, що супроводжуються новоутвореннями;
- після переливання еритроцитів іншої групи крові (наприклад, людині з групою АВ — еритроцитів А, В або 0) — тимчасове явище;
- після пересадки алогенних гемопоетичних стовбурових клітин від донора з іншою групою АВ0 — тимчасове явище;
- химеризм у двояйцевих близнят — тимчасове явище;
- порушення процесу запліднення — диспермія (постійне явище).

УВАГА!

А. Якщо спостерігаються 2 популяції еритроцитів — слід спробувати їх розділити (п. 7.5.8). Якщо це не вдасться, варто підозрювати наявність слабого різновиду антигену.

Б. Якщо вкрай необхідно перелити кров ще до отримання остаточного результату аналізу на групу крові, слід обирати КЕ групи 0.

7.6.1.7. Поліаглютинація

Явище поліаглютинації викликане змінами у клітинній оболонці еритроцитів під впливом бактеріальних ензимів або інших невідомих факторів, які призводять до оголення детермінант T, Tn та інших, які у нормальних станах є недоступними. Сироватки більшості дорослих людей, у тому числі й діагностичні сироватки людського походження, характеризуються наявністю природних антитіл, спрямованих проти цих детермінант, унаслідок чого вони аглютинують такі еритроцити. Поліаглютинацією називають явище, яке виникає внаслідок наявності прихованих детермінантів *in vivo*, найчастіше під час зараження. Те саме явище, спричинене зараженням узятого зразка крові, має назву панаглютинації.

Під час аналізу групи крові за системою АВ0, який проводиться з використанням сироваток людини, можна спостерігати реакції аглютинації, що не відповідають схемі. Таких реакцій моноклональні реактиви не виявляють. Якщо аналізовані еритроцити при поєднанні з кількома зразками сироватки групи АВ дадуть аглютинацію — це підтвердить припущення про наявність прихованих детермінант. Для того щоб встановити, котрий з антигенних детермінантів вивільнився, слід провести аналізи з комплектом лектинів, витяжкою з білкової залози *Helix pomatia* та з полібреном (табл. 7.4).

УВАГА!

- А. До вивільнення антигену T та споріднених антигенних детермінантів (Tk) призводять хвороботворні мікроорганізми, що виробляють нейрамінідазу (ензим, який спричиняє розклад сілової кислоти). Це явище минає та зникає після ліквідації інфекції.*
- Б. Фактор, що вивільняє антиген Tn, досі не знаний. Він діє одночасно на еритроцити, тромбоцити і гранулоцити, що призводить до анемії, тромбоцитопенії та гранулоцитопенії. Поліаглютинація при цьому, як правило, має постійний характер.*
- В. Поліаглютинацію Tn не слід плутати з присутністю на еритроцитах антигену Cad, який є генетично зумовленим.*
- Г. Концентрати клітинних компонентів крові, призначені для реципієнтів, еритроцити яких виявляють поліаглютинацію (особливо якщо йдеться про новонароджених та немовлят), мають бути максимально звільнені від плазми. Таким реципієнтам не слід переливати плазму.*

Таблиця 7.4

Диференціація причин поліаглютинації

Вивільнення антигенів	Діючий фактор	Реакція еритроцитів із лектином					Полібрен
		<i>Arachis hypogea</i>	<i>Dolichos biflorus</i>	<i>Helix pomatia</i>	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Salvia horminum</i>	
T	Нейрамінідаза	+	-	-	-	-	Відсутність агрегації
Tk	Ендо-галактозидаза	+	-	-	-	-	Агрегація
Tn	Невідомий	-	+	+	+	+	Відсутність агрегації
VA	α-Фукозидаза	-	-	+	+	+	Агрегація
Cad	Генетично зумовлений	-	-	+	-	-	Агрегація
HEMPAS	Генетично зумовлений	-	-	+	-	-	Відсутність агрегації
NOR	Генетично зумовлений	-	-	-	-	-	Агрегація

7.6.1.8. Наявність алогемолізинів

Під час аналізу на групу крові АВ0 свіжозятого зразка крові замість очікуваної аглютинації зі стандартними еритроцитами може з’явитися гемоліз, який є еквівалентом аглютинації. Щоб уникнути помилкової інтерпретації, треба:

1. Розвести аналізовану сироватку розчином NaCl у співвідношенні 1:9.
2. Повторити аналіз зі стандартними еритроцитами (замість гемолізу має з’явитися аглютинація).
3. У разі відсутності наявної аглютинації застосувати пробірковий метод.

7.6.1.9. Значне зниження рівня алоаглютининів АВ0 або їх відсутність

Після виключення наявності алогемолізину відсутність очікуваної реакції аналізованої сироватки з відповідними стандартними еритроцитами може свідчити про низький рівень алоаглютининів або їх відсутність. У межах фізіологічної норми це явище спостерігається у новонароджених та немовлят; що ж до випадків, пов'язаних із хворобою, — при гіпо- або агаммаглобулінемії.

7.6.1.9.1. Порядок дій у разі значного зниження рівня алоаглютининів АВ0 або їх відсутності

Реакції досліджуваної сироватки зі стандартними еритроцитами слід перевірити пробірковим методом таким чином:

1. Приготувати 3 пробірки, позначені символами 0, A_1 , В.
2. У кожен пробірку помістити по 2 краплі аналізованої сироватки.
3. Додати по 2 краплі 3–4% зависі еритроцитів, відповідно до позначок на пробірках.
4. Пробірки залишити при кімнатній температурі на кілька хвилин.
5. Вміст пробірок центрифугувати протягом 30–60 сек.
6. Встановити результати в макроскопічному режимі, обережно струшуючи пробірки.

Якщо пробірковий метод алоаглютининів не виявив (відсутність аглютинації еритроцитів із відповідним реактивом) — наступним кроком мають бути аналізи на слабкі різновиди антигену А або В методом адсорбції/елюції.

7.6.1.10. Рулонізація еритроцитів («монетні» стовпчики)

Якщо при аналізі сироватки спостерігається агрегація стандартних еритроцитів усіх груп крові, слід брати до уваги явище рулонізації, яке:

- не спостерігається у здорових людей;
- може виявитися у хворих із розладами, зумовленими білками плазми (макроглобулінемія, хвороби з новоутвореннями, опіки);
- спостерігається після переливання високомолекулярного декстрану або після внутрішньовенного застосування контрастного препарату для рентгенологічних аналізів;
- якщо дивитися в макроскопічному режимі, не відрізняється від аглютинації.

7.6.1.10.1. Порядок дій у разі підозри на рулонізацію

1. Перенести краплю зліплених еритроцитів на предметне скельце і розглянути під мікроскопом.
2. Звернути увагу на характер формування «монетних» стовпчиків еритроцитами.
3. Якщо сироватка виявляє дуже інтенсивні рулонізуючі властивості і якщо труднощі у відрізненні рулонізації від аглютинації все ж є — розвести аналізовану сироватку розчином NaCl (пропорція 1:2, у разі необхідності може бути й більша) і повторити аналіз зі стандартними еритроцитами.

7.6.1.11. Наявність неочікуваних алоантитіл

7.6.1.11.1. Наявність антитіл анти- A_1

Присутність цих антитіл виявляє себе у несподіваному результаті реакції аналізованої сироватки зі стандартними еритроцитами A_1 . У такому разі слід:

- за допомогою лектину анти- A_1 перевірити, чи належать аналізовані еритроцити до A_2 або іншого слабого різновиду;
- проаналізувати сироватку із зависями стандартних еритроцитів A_1 (з іншого зразка) та A_2 ;
- з метою остаточної ідентифікації антитіл узяти більшу кількість еритроцитів A_1 і A_2 .

7.6.1.11.2. Наявність інших алоантитіл

Після виключення наявності аутоаглютининів на підставі аналізу сироватки з аутологічними еритроцитами — якщо спостерігається аглютинація зі стандартними еритроцитами, то це вказує на присутність алоаглютининів. Окрім анти- A_1 , це можуть бути інші «природні» антитіла, які вступають у реакцію при кімнатній температурі, наприклад, анти- P_1 , анти-М, анти-Н, анти- Le^a , анти- Le^b , а також значно рідкісніші повні імунні антитіла (наприклад, із системи Rhesus). Для визначення

їх специфічності служить відповідним чином підготований комплект стандартних еритроцитів, наприклад:

0 NNSs P ₁ Le(a-b+)	0 MMSS P ₁ Le(a+b-)
0 MNss P ₁ Le(a-b+)	0 MNss P ₂ Le(a-b-) Lu(a+)
0 MMSs P ₂ Le(a-b+)	еритроцити, однойменні за АВ0.

Сироватку слід аналізувати із зависями еритроцитів у розчині NaCl та/або у розчині LISS таким чином:

1. У задалегідь позначені пробірки помістити по 2 краплі аналізованої сироватки.
2. Додати по 1 або 2 краплі 3–4% зависі відповідних еритроцитів.
3. Залишити на 15 хв. при кімнатній температурі.
4. Центрифугувати протягом 1 хв. при 340 × g.
5. Встановити результати, фіксуючи у протоколі інтенсивність аглютинації.

УВАГА!

- А. У людей з групою A₁ та A₁B реакція сироватки з еритроцитами групи 0 проковує підозру щодо присутності антитіл анти-Н. Для встановлення специфічності цих антитіл треба таким же способом проаналізувати сироватку з кількома зависями еритроцитів груп 0, A₂ та A₁. Аглютинація еритроцитів групи 0 і A₂ при відсутності реакції з еритроцитами A₁, а також уповільнення активності за допомогою слини секретора групи 0, — ось явища, які підтверджують специфічність антитіл анти-Н.*
- Б. Аглютинація приблизно однакової інтенсивності з усім комплектом стандартних еритроцитів (за винятком аутологічних еритроцитів) може вказувати на присутність дуже рідкісних алоантитіл анти-І.*
- В. Якщо реакції з окремими різновидами еритроцитів дозволяють установити специфічність аналізованих антитіл, слід підтвердити правильність ідентифікації шляхом визначення фенотипу аналізованих еритроцитів за тією груповою системою, до якої зараховуються виявлені антитіла.*
- Г. Після встановлення специфічності алоантитіл слід перевірити методом НАГТ, чи не мають ці антитіла імунного характеру, що спостерігається найчастіше у випадках анти-М, анти-С, анти-Le^a, анти-P₁.*

7.6.1.12. Аутоаглютинація

Якщо сироватка аглютинує стандартні еритроцити всіх груп крові, то слід провести контрольний аналіз із зависсю аутологічних еритроцитів (аутоконтроль). Поява аглютинації свідчить про наявність аутоантитіл холодового типу. У рідкісних випадках у хворих із синдромом холодових аглютининів аглютинація спостерігається вже під час приготування зависі еритроцитів. Вона ускладнює визначення групи крові за системою АВ0.

7.6.1.12.1. Порядок дій

1. Із вени на ліктьовому згині, зігрітому термофором, повторно взяти кров «теплим» способом, за допомогою комплекту, підігрітого до температури 37 °С.
2. Частину взятої крові перевести в суху пробірку, частину — у пробірку з антикоагулянтом (EDTA-Na₂), розміщену в посудині з водою з температурою 37 °С.
3. Після кількаразового відмивання еритроцитів розчином NaCl, підігрітим до температури 37 °С, приготувати їх завись.
4. Відокремити від згустка сироватку і довести до температури 37 °С.
5. Аналізи на групу крові за системою АВ0 робити при температурі 37 °С.
6. Встановити результати після 10–15-хвилинної інкубації, одразу ж після вилучення з термостата.
7. Аналіз групи крові має супроводжуватися контролем активності стандартних реактивів при цій температурі.

7.6.2. Визначення груп крові за системою АВ0 у новонароджених та немовлят

Нормальна експресія антигенів А і В на еритроцитах спостерігається переважно з другого року життя дитини. У зв'язку з цим при аналізах еритроцитів у більш ранній період можуть виявлятися слабші та запізніліші реакції з діагностичними реактивами анти-А і анти-В (порівняно з еритроцитами дорослих осіб). З іншого боку, продукування натуральних антитіл системи АВ0 розпочинається найчастіше на третьому місяці життя, тож не завжди їх можна виявити. Отже, в таких аналізах слід застосовувати пробіркові методи.

7.6.2.1. Порядок дій

1. У дві позначені пробірки помістити по 2 краплі реактиву — відповідно, анти-А і анти-В.
2. У додаткову пробірку помістити 2 краплі сироватки людини групи крові АВ (перевіреної на відсутність антитіл до антигенів еритроцитів).
3. В усі пробірки додати по 2 краплі 3–4% зависі аналізованих еритроцитів у розчині NaCl та перемішати.
4. Вміст пробірок центрифугувати протягом 1 хв. при $150\text{--}340 \times g$ або згідно з рекомендаціями виробника.
5. У макроскопічному режимі встановити результати, легко струшуючи пробірки.
6. Виконати таким самим способом контрольний аналіз із застосуванням діагностичних реактивів з інших клонів або серій.

УВАГА!

- А. Вищеописаний спосіб дій не включає аналізу на присутність антитіл анти-А та/або анти-В у сироватці новонародженого, оскільки вони ще не виробляються у достатніх для виявлення кількостях, а ті, які виявити все-таки можна, походять з організму матері.*
- Б. Якщо дитині ще не виповнилося два роки — слабку експресію антигену А або В на еритроцитах не варто розглядати як слабкий різновид антигену; рекомендується повторити аналізи пізніше. Також не слід брати ці результати для постійного обліку.*
- В. Проведення контрольного аналізу із сироваткою групи АВ має на меті можливе виявлення поліаглютинації через бактеріальну інфекцію. Таку сироватку можна отримати з проаналізованих зразків крові людей з групою АВ — після виключення присутності в ній інших іррегулярних антитіл. Зразки цих сироваток слід зберігати в замороженому стані.*
- Г. При аналізах груп крові новонароджених та немовлят дуже добрим і високочутливим є колонковий мікрометод.*
- Ґ. Визначати групу крові усім новонародженим недоцільно.*

7.6.3. Аналіз антигену D

7.6.3.1. Визначення антигену D у донорів

Присутність або відсутність антигену D на еритроцитах є вирішальним чинником для визначення їх групи — RhD+ або RhD-. Визначення антигену D здійснюють за допомогою двох реактивів анти-D. Для кожного первинного донора цей аналіз проводять двічі, тобто аналізують два зразки крові, взяті в різний час, і щоразу застосовують два різні реактиви анти-D:

- моноклональний реактив анти-D IgM;
- моноклональний реактив анти-D IgM, що походить з іншого клона, або реактив анти-D IgM + IgG (Blend).

Реактиви анти-D IgM + IgG можна використовувати також і в непрямому антиглобуліновому тесті (при аналізах донорських еритроцитів).

Методика визначення антигену D за допомогою моноклональних реактивів має узгоджуватися з рекомендаціями виробника. Одночасно з кожною серією аналізів слід проводити контроль реактиву анти-D з еритроцитами RhD+ та RhD-.

УВАГА! Застосовувані реактиви анти-D мають виявляти більшість випадків слабкої експресії антигену D (колишнє позначення — D^u), а також більшість категорій антигену D, у тому числі D VI. Наприклад, якщо один з реактивів анти-D не розпізнає антигену D^{VI} , то другий із них повинен виявляти цю категорію.

7.6.3.1.1. Інтерпретація результатів аналізів

Аглютинація реактиву анти-D з аналізованими еритроцитами свідчить про присутність антигену D (результат Rh+); відсутність аглютинації вказує, що аналізовані еритроцити слід визначити як Rh-.

7.6.3.1.2. Труднощі в інтерпретації результатів аналізів антигену D

7.6.3.1.2.1. Слабка аглютинація аналізованих еритроцитів із реактивами анти-D

Слабка активність аналізованих еритроцитів може свідчити про слабку експресію антигену D, т. зв. D слабкий (D^u), а може вказувати на антиген D частковий, який належить до однієї з категорій, наприклад, D^{VI} . У таких випадках для донора треба:

- 1) провести аналізи в НАГТ з різними реактивами анти-D, що містять антитіла класу IgG, моноклональні або поліклональні;
- 2) в окремих випадках дуже слабкої експресії антигену D — підтвердити його присутність аналізами елюату після інкубації еритроцитів з поліклональними антитілами IgG анти-D;
- 3) якщо у донора виявлено слабкий антиген D, цього донора необхідно зарахувати до RhD-позитивної групи.

Кінцевий результат повинен мати таке формулювання:

«RhD-позитивний (слабка експресія антигену D).

Як реципієнт — RhD-негативний».

УВАГА! Причини слабкої експресії антигену D:

- мутація гена D, яка призводить до заміни у білку Rh у міжмембранній або цитоплазматичній ділянці, як правило, тільки однієї амінокислоти іншою та до виникнення фенотипу D слабкий; у рідкісних випадках організми людей із фенотипом D слабкий можуть продукувати антитіла анти-D;
- мутація гена D, яка веде до відсутності частини епітопів D у зовнішньомембранній ділянці та до виникнення D часткового; слабка експресія антигену D характерна для категорії D^{VI} ;
- вплив гена C у позиції транс.

7.6.3.1.2.2. Категорії антигену D (D частковий)

Категорії антигену D характеризуються відсутністю на еритроцитах одного або кількох епітопів, які входять до його складу. Аналізи в цьому напрямку проводять у таких випадках:

1. Наявність алоантитіл анти-D у Rh-позитивних людей;
2. Розбіжності в результатах, отриманих із набором реактивів анти-D. У таких ситуаціях, маючи в розпорядженні спеціальний набір моноклональних антитіл анти-D, можна встановити категорію цього антигену. Ці аналізи здійснює відповідна лабораторія ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України», ЗСК.

УВАГА!

- А. Різновиди антигену D, що зараховуються до окремих категорій, трапляються дуже рідко. Серед них найчастіше розпізнається категорія D^{VI} .
- Б. На практиці розпізнавання категорій антигену D стосується найчастіше $Rh_0(D)$ -позитивних людей, у яких виявлено алоантитіла анти-D; специфічність цих антитіл спрямована до епітопів антигену D, відсутніх на аутологічних еритроцитах.
- В. Донори, у яких розпізнано будь-яку категорію антигену D, зараховуються до групи $Rh_0(D)$ -позитивних донорів.
- Г. Хоча імуногенності часткового антигену D категорії D^{VI} досі не доведено, результат донорського аналізу повинен мати таке формулювання:
«RhD-позитивний (категорія D^{VI}).
Як реципієнт — RhD-негативний».

7.6.3.2. Визначення антигену D у реципієнтів крові та в жінок до періоду менопаузи

Реактиви анти-D IgM застосовуються для аналізів шляхом тесту зі скельцем або пробіркового тесту в середовищі NaCl.

Не можна визначати антиген D шляхом непрямого антиглобулінового тесту, оскільки є ризик отримати псевдопозитивний результат.

Методика визначення антигену D за допомогою моноклональних реактивів має узгоджуватися з рекомендаціями виробника. Одночасно з кожною серією аналізів слід проводити контроль реактиву анти-D з еритроцитами RhD+ та RhD-.

УВАГА!

- А. Реактиви не повинні містити додаткових складників, які могли б спричинити псевдопозитивні реакції, якщо еритроцити хворого навантажені in vivo антитілами IgG. Якщо виробник рекомендує застосовувати й контрольний реактив — цей контроль повинен бути включений до аналізу як його частина. Позитивний результат із контрольним реактивом (навіть слабка реакція) робить неможливою видачу Rh₀(D)-позитивного результату аналізу.*
- Б. Контрольний реактив, рекомендований виробником, завжди має застосовуватися (реакція з ним має бути частиною аналізу) у випадках сильної аутоаглоїтинації еритроцитів, спричиненої холодними аутоантитілами. У таких випадках, перш ніж робити аналіз із реактивами анти-D, доцільно промивати еритроцити розчином NaCl, підігрітим до температури 37 °C.*

7.6.3.2.1. Інтерпретація результатів аналізів

Якщо всі вищенаведені зауваження враховано — аглюїтинація реактиву анти-D з аналізованими еритроцитами свідчить про наявність антигену D (результат Rh+); відсутність аглюїтинації вказує, що аналізовані еритроцити слід визначити як Rh-.

7.6.3.2.2. Труднощі в інтерпретації результатів аналізів антигену D**7.6.3.2.2.1. Позитивний результат реакції з одним із реактивів анти-D, негативний результат з іншим реактивом анти-D або слабка аглюїтинація аналізованих еритроцитів з обома реактивами**

Причиною розбіжності у результатах може бути виявлення слабкої експресії антигену, т. зв. D слабкий (D^u), або антигену D часткового, наприклад, D категорії VI. У таких випадках і реципієнт крові, і жінка до періоду менопаузи мають розглядатися як Rh₀(D)-негативні, а результат аналізу повинен мати таке формулювання: «Rh₀(D)-негативний (слабка експресія антигену D)».

Для точного встановлення слабкої експресії антигену D свіжозятий зразок крові слід передати у відповідну лабораторію ЗСК або Інституту гематології і трансфузіології, — така лабораторія повинна мати відповідні реактиви для диференціації категорії D та антигену D слабого.

Особи, у яких виявлено категорію D^{VI} антигену D або антиген D слабкий, зараховуються до Rh₀(D)-негативної групи, їм для переливання має підбиратися Rh₀(D)-негативна кров, а жінки мають бути залучені до профілактики RhD-конфлікту.

7.6.3.3. Дві популяції еритроцитів унаслідок недавньої трансфузії

У хворих, котрим перелили кров, яка відрізняється антигеном D (наприклад, Rh-позитивній особі — Rh-негативну кров), можна спостерегти 2 популяції (великі аглюїтинати на фоні вільних еритроцитів) після контакту аналізованих еритроцитів із реактивом анти-D. Тоді слід:

- 1) перевірити, яку кров і коли отримував хворий, а також більш ранні результати його аналізів;
- 2) встановити Rh після відокремлення еритроцитів хворого від перелитих (метод наведено у п. 7.5.8) або повторити аналіз через 3 місяці з моменту останнього переливання.

7.6.4. Визначення антигенів еритроцитів різних групових систем та їх документування

Аналізи фенотипів за окремими груповими системами роблять для всіх багаторазових донорів групи 0, а в міру можливості, і для інших груп крові. Такі аналізи мають на меті:

1. Відокремлення донорів, гомозиготних за окремими груповими системами, та резервування взятих у них одиниць крові для хворих — багаторазових реципієнтів, у яких уже утворилися імунні алоантитіла;
2. Створення наборів стандартних еритроцитів для діагностичних аналізів — для цього слід брати людей, у яких антигенний склад еритроцитів дозволяє ідентифікувати антитіла. До них належать:
 - еритроцити гомозигот за 2-ма або кількома груповими системами: DCC_{see}, DccEE, dc_{see}, MM, SS, ss, Fy(a-b+), Fy(a+b-), Jk(a-b+), Jk(a+b-);
 - еритроцити, які не містять поширених антигенів, наприклад: KK, Kp(a+b-), Lan-, Ge-, Rhnull, Bombay, Vel-, Yt(a-), Yk(a-), LW(a-), Co(a-);
 - еритроцити, що містять антигени низької або дуже низької частоти виявлення, наприклад: C^w, Kp^a, Lu^a, Wr^a, Di^a, Jn^a, KREP.

Фенотипічні аналізи роблять також для хворих у випадках:

1. Наявності імунних алоантитіл. Тоді визначають фенотип за тією груповою системою, до якої належать виявлені алоантитіла, а також фенотип Rh і антиген K;
2. Аутоімунні гемолітичної анемії теплого типу. Визначають фенотип Rh і антиген K;
3. Аналізів, пов'язаних із пересадкою стовбурових клітин кровотворної системи (визначення фенотипу в донора та реципієнта).

Аналізи фенотипів еритроцитів у донорів слід робити двічі, користуючись двома зразками крові, взятими в різний час. Отримання ідентичних результатів із двох різних зразків дозволяє вносити цей результат у картотеку донора. Фенотипи еритроцитів у хворих можна визначати за одним зразком крові.

На сьогодні для фенотипічних аналізів застосовують моноклональні реактиви фірмового виробництва. Однак визначення деяких антигенів вимагає застосування реактивів людського походження. Методика аналізів має узгоджуватися з рекомендаціями виробника. Реактиви, перевірені лабораторією контролю якості, передаються у лабораторії, які проводять відповідні аналізи; супроводжувати реактиви має українськомовна версія методики аналізу.

7.6.4.1. Визначення фенотипу Rh

Аналізи фенотипу системи Rh виконують переважно пробірковим методом у середовищі NaCl за допомогою моноклональних реактивів: анти-D, анти-C, анти-c, анти-E, анти-e, а в міру можливості — й анти-C^w. Кожна серія аналізів вимагає паралельного проведення — для кожного реактиву — позитивного контролю з еритроцитами, що мають одиничну дозу антигену, та негативного контролю з еритроцитами без даного антигену. Фенотип Rh можна визначати також колонковим методом і за допомогою автоматів.

УВАГА!

- А. Хоча тепер відомо, що ген d не існує, — цей символ і досі не вилучений з ужитку і позначає відсутність гена та антигену D (наприклад, dc_{see}). Нема потреби писати цей символ двічі.*
- Б. Встановлення фенотипу Rh не завжди дозволяє робити певні висновки стосовно генотипу, оскільки це вже вимагає сімейних або генетичних аналізів. Спираючись на знання про частоту появи окремих комбінацій антигенів, на підставі фенотипу можна лише припускати найімовірніший генотип (табл. 7.5).*

Таблиця 7.5

Поширеність фенотипів Rh-позитивних людей та їхні найімовірніші генотипи

Фенотип Rh	Найімовірніший генотип	Фенотип Rh	Найімовірніший генотип
DC _{see}	DCe/ce	DccEE	DcE/DcE
DCC _{see}	DCe/DCe	Dc _{see}	Dce/ce
DCcEe	DCe/DcE	DCC _{Ee}	DCE/DCe
DccEe	DcE/ce	DCC _{EE}	DCE/DcE

7.6.4.2. Визначення фенотипів в інших групових системах

Так само, як в аналізах антигенів Rh, для визначення більшості антигенів інших групових систем найчастіше застосовують моноклональні реактиви. Найбільш рекомендованим є пробірковий метод, який дозволяє дуже швидко одержати розбірливі та однозначні результати. З огляду на те, що застосовується середовище NaCl, такі аналізи можуть виконуватися також на еритроцитах, навантажених аутоантитілами теплового типу (хворі з АІГА).

Для визначення деяких антигенів, наприклад, антигенів системи Duffy, необхідним є застосування антиглобулінового тесту.

Усі результати фенотипічних аналізів, виконуваних класичними методами (вручну), слід документувати за нижченаведеним зразком.

Для позитивного контролю використовують еритроцити з одиничною дозою даного антигену.

Приклад документування аналізів фенотипів еритроцитів:

Дата	Прізвище, ім'я		Діагностичні реактиви анти-:							
			-D	-C	-C ^w	-c	-E	-e	-K	-k
		Контроль +	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
		Контроль –	0	0	0	0	0	0	0	0
		Зразок (проба) №: ...	4+	4+	0	4+	0	4+	0	4+

7.6.4.3. Популяція донорів із визначеними антигенами еритроцитів для потреб гемотерапії

Заклад служби крові повинен мати в розпорядженні еритроцитовмісні компоненти спеціально відібраних донорів, гомозиготних за різними груповими системами, оскільки така кров необхідна хворим, імунізованим антигенами еритроцитів. Ця кров походить головним чином від донорів групи 0, оскільки їх еритроцити можна переливати також реципієнтам інших груп крові.

У післятрансфузійній імунізації найбільше клінічне значення, окрім антигену D, має антиген K із системи Kell, а для D-позитивних реципієнтів — антигени E та C із системи Rh. Рідше за імунізацію відповідають такі антигени: Jk^a із системи Kidd; S, s із системи MNS; Fy^a із системи Duffy; e із системи Rh. Отже, необхідно мати в наявності кров донорів групи 0, а також інших груп системи ABO із такими фенотипами:

- 1) за системою Rh: DCCee, DccEE, dccee;
- 2) за системою Kell: K-;
- 3) за системою Kidd: Jk(a-b+), Jk(a+b-);
- 4) за системою Duffy: Fy(a-b+), Fy(a+b-);
- 5) за системою MNS: SS, ss, NN.

Слід брати до уваги, що імунізація може мати поліспецифічний характер, наприклад, реципієнт утворює антитіла анти-c і анти-Jk^a, або ж анти-e, анти-K і анти-S; з огляду на це важливо мати в розпорядженні еритроцитовмісні компоненти донорів із відповідними фенотипами за кількома груповими системами одночасно, наприклад:

- DCCee K- Jk(a-b+) SS;
- DccEE K- Fy(a-b+) ss.

Реципієнти, у яких утворилися будь-які імунні алоантитіла до антигенів еритроцитів, потребують крові, яка не містить відповідного антигену і при цьому є фенотипічно сумісна за системами Rh та Kell. Такий вибір диктується відомим спостереженням: реципієнт, здатний до імунної відповіді на один антиген еритроцитів, неодноразово імунізується й іншими антигенами, найчастіше тими, які є найбільш імуногенними.

Еритроцитовмісні компоненти донорів, еритроцити яких не містять високочастотних і дуже високочастотних (понад 95%) антигенів, мають зберігатися в замороженому стані — вони виконують функцію наявного запасу для тих хворих, у яких наявні антитіла до поширеного антигену. Приклади таких фенотипів: Bombay (O_h), dccEE, Rh_{null}, KK, Kp(b-), p, Lu(b-), Lan-, Co(a-), Ge-2, -3.

Серед антитіл, що виявляють себе переважно як природні, іноді спостерігається активність також і при температурі 37 °С. До таких належать анти-Le^a, анти-M, а винятково рідко — анти-P₁ і анти-A₁. Для таких реципієнтів має бути доступна кров із фенотипами Le(a-b-), P₂ та NN. Перш ніж підбирати кров для реципієнта з антитілами анти-A₁, активними при температурі 37 °С, треба визначити кров A₂ за допомогою лектину анти-A₁.

Дані про донорів із рідкісними фенотипами еритроцитів мають бути внесені до національного реєстру.

7.6.5. Виявлення імунних антитіл

7.6.5.1. Виявлення антитіл у реципієнтів крові, вагітних жінок, а також у донорів та реципієнтів кровотворних стовбурових клітин

Для аналізів застосовують набір еритроцитів, який дозволяє виявляти антитіла системи Rh, антитіла анти-К, а також інші антитіла, спрямовані до антигенів сильної імуногенності. У цьому наборі мають бути еритроцити, які містять антигени в подвійній дозі, що робить можливим виявлення слабкореагуючих антитіл (табл. 7.6). Аналіз виконують за допомогою двох тестів: це НАГТ, який виявляє імунні антитіла з усіх групових систем, та LEN, який має найбільшу чутливість у виявленні антитіл системи Rh. Найпростіший набір має складатися з двох різновидів Rh₀(D)-позитивних еритроцитів, містити антиген C^w (наприклад, DC^wCee), антиген E у подвійній дозі (DccEE); також до цього набору мають входити еритроцити, які є RhD-негативними і при цьому K-позитивними. Стандартні еритроцити слід добирати так, щоб у них були такі фенотипи: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Jk(a+b-), Jk(a-b+), MMss, NNSS, Le(a+b-), Le(a-b+), P₁. Якщо в одному або в обох тестах виявлено антитіла — треба визначити їхню специфічність.

УВАГА! При автоматичному аналізі ензимний тест можна не проводити.

Таблиця 7.6

Приклад набору стандартних еритроцитів для виявлення іррегулярних алоантитіл

Rh	Rh						Kell		MNSs				P	Lewis		Duffy		Kidd	
	D	C	c	E	e	Cw	K	k	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	Fya	Fyb	Jka	Jkb
DCCwee	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0
DccEE	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
ddccee	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+

7.6.5.2. Виявлення антитіл у донорів крові

Невиявлення слабкоактивних антитіл у донорів не має суттєвого значення, оскільки не загрожує безпеці реципієнта. Тому можна застосовувати один різновид еритроцитів, який міститиме всі важливі з клінічного боку антигени в одиничній дозі. Для визначення імунних алоантитіл у донорів застосовують виключно непрямий антиглобуліновий тест.

7.6.6. Визначення специфічності антитіл

У таблиці 7.7 наведено приклад набору еритроцитів для ідентифікації найпоширеніших імунних антитіл.

Фенотипи з окремих групових систем не обов'язково мусять між собою співвідноситися. Неодмінно треба мати в розпорядженні еритроцити, які є Rh-негативними (dcsee) і при цьому K-позитивними, а також ті, що є Rh-негативними і при цьому K-негативними.

Визначаючи специфічність алоантитіл, слід до набору стандартних еритроцитів групи 0 включити аутологічні еритроцити, а також однойменні за системою АВ0. Аутологічні еритроцити використовують для контролю аутоантитіл, а однойменні еритроцити полегшують діагностику тих еритроцитів, що спрямовані одночасно до комплексу двох антигенів, серед яких і антиген Н. Таким прикладом є алоантитіла анти-Le^bH, що реагують лише з тими еритроцитами, які містять антигени Le^b та Н.

Встановлення специфічності алоантитіл має базуватися на позитивних результатах зі щонайменше двома різновидами стандартних еритроцитів, які містять даний(і) антиген(и), та зі щонайменше двома різновидами стандартних еритроцитів, які не містять даного(их) антигену(ів). Від цього принципу можна відступити лише в тому разі, якщо будуть виявлені антитіла до антигену або дуже поширеного, або дуже рідкісного в популяції.

Якщо аналізи свідчать про наявність у сироватці антитіл із кількома специфічностями, то заради їх ідентифікації часто треба застосувати адсорбцію (підібраними еритроцитами), а також дослідити отримані з них елюати. Кожну встановлену специфічність алоантитіл слід підтвердити, довівши, що даний антиген відсутній на еритроцитах людини, в якій взято аналіз.

Таблиця 7.7

Приклад набору стандартних еритроцитів для ідентифікації алоантитіл

Rh	Rh						Kell		MNS				P	Lewis		Duffy		Kidd		
	D	C	c	E	e	C ^w	K	k	M	N	S	s	P ₁	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	
DCCee	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	+	+
DCCwee	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0
DccEE	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+
DccEE	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+
Dccee	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0
DCcEe	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0
dCcee	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+
dccEe	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+
dccee	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+
dccee	0	0	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0
dccee	0	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+

7.6.7. Порядок дій з кров'ю донорів, у яких виявлено імунні антитіла

Присутність імунних антитіл є достатньою підставою для дискваліфікації консервованої крові та всіх її компонентів для переливань новонародженим, незалежно від рівня показника антитіл.

Людам з інших вікових груп можна переливати консервовану кров і всі її компоненти лише в тому разі, якщо показник імунних антитіл є меншим від 10. Виняток — еритроцитовмісні компоненти у додатковому розчині (наприклад, SAGM, ADSOL). Цей компонент можна переливати, якщо показник імунних антитіл є меншим від 50.

УВАГА! Рішення про кваліфікацію крові та її компонентів до переливання слід ухвалювати після здійснення аналізу на показник імунних антитіл у кожній донації.

7.6.7.1. Кваліфікування плазми з антитілами на виробництво препаратів крові

Для виробництва препаратів крові можна кваліфікувати плазму з імунними антитілами, показник яких не перевищує 4. Від цього принципу можна відійти, якщо фракціонатор має інші вимоги.

Плазму з імунними антитілами можна використовувати для виготовлення зразків для контролю якості в імуногематологічних лабораторіях медичних закладів, а також для навчальних цілей у ЗСК.

Чоловіки-донори, у яких виявлено антитіла анти-D, мають бути залучені до проведення подальшої запланованої імунізації — з метою отримання показника антитіл, потрібного для продукування імуноглобуліну анти-Rh₀(D).

7.7. Проба серологічної сумісності між реципієнтом та донором перед переливанням крові

Для безпечної та ефективної трансфузії працівники лабораторії мають дотримуватися таких умов:

- постійно звертати увагу на те, щоб застосовувалися лише перевірені реактиви й діагностичні сироватки, і на те, щоб обов'язкові аналізи робилися правильно;
- уникати помилок, викликаних людським фактором;
- бути ознайомленими із імуногематологічним минулим хворого (переливання крові, вагітності, відомості про антитіла, що були виявлені в минулому). Дані про це містяться в таких документах, як: записи в особовій документації, медичні картки з закладів охорони здоров'я, документація у журналі медичних послуг, результати аналізів, що є на руках у пацієнта.

7.7.1. Основні імуногематологічні принципи гемотерапії

1. Переливають компоненти крові, сумісні за антигенами системи АВ0 та антигеном D із системи Rh.
2. Компоненти крові, що переливається, не повинні містити антигени, які вступають в реакцію з антитілами реципієнта, а також антигену, який спричинив виявлену алоімунізацію в минулому.
3. Для уникнення подальшої імунізації для хворих, у яких колись вироблялися імунні алоантитіла, а також для хворих, у яких спостерігаються аутоантитіла, активні при температурі 37 °С, слід підбирати компоненти крові, фенотипічно сумісні за системою Rh і сумісні за антигеном K із системи Kell.
4. Для жінок до періоду менопаузи слід, у міру можливості, визначати антиген K, і якщо він відсутній — підбирати для них K-негативну кров.
5. Пробу сумісності слід робити також у тих випадках, коли рекомендовано переливати тромбоцити і концентрат гранулоцитів із залишками еритроцитів (> 5 мл), про що свідчить червоне забарвлення цих компонентів.

7.7.2. Відхилення від принципів

7.7.2.1. Вибір еритроцитовмісних компонентів групи 0 для переливання пацієнтам з іншою групою

Брати еритроцитовмісні компоненти групи 0 для переливання пацієнтам з іншою групою допустимо за таких обставин:

- загроза для життя хворого і при цьому — відсутність компонентів однойменної групи крові;
- присутність імунних алоантитіл і при цьому — відсутність сумісної однойменної крові;
- дуже слабка експресія антигенів А чи В або труднощі у визначенні групи АВ0;
- відсутність Rh-негативної крові, однойменної за системою АВ0.

7.7.2.2. Вибір еритроцитовмісних компонентів групи А або В для переливання пацієнтам із групою АВ

Брати еритроцитовмісні компоненти групи А або В для переливання пацієнтам із групою АВ допустимо, коли відсутня однойменна кров.

7.7.2.3. Вибір крові для масивних переливань

Переливання вважається масивним, якщо об'єм крові, перелитої впродовж 24 год., дорівнює об'ємові циркулюючої крові у хворого. Підбираючи кров, слід перевірити сумісність між реципієнтом та донорами у системі АВ0; проби сумісності не роблять.

7.7.3. Проба сумісності

Власне пробу сумісності (це реакція сироватки реципієнта з еритроцитами донора) слід доповнювати такими аналізами:

1. Скринінг антитіл у сироватці реципієнта у тестах LEN та НАГТ — на предмет імунних ало-антитіл.
2. Контроль антигенів А і В у донора та реципієнта за допомогою моноклональних реактивів анти-А і анти-В.
3. Контроль антигену D у реципієнта за допомогою моноклонального реактиву анти-D, який не виявляє антигену D категорії VI; а якщо реципієнт RhD-негативний — також контроль антигену D у донора за допомогою антигену D, який виявляє антиген D категорії VI.

УВАГА! Перелічені вище аналізи можна виконувати одночасно з пробю сумісності.

7.7.3.1. Кров реципієнта

Пробу сумісності та всі супровідні аналізи виконують на зразку крові хворого, взятого окремо спеціально для цієї мети. Не слід робити пробу з того самого зразка, що використовували для визначення групи крові хворого. Від цього принципу можна відійти лише у виняткових обставинах. Узятий у лікарні зразок крові реципієнта має бути переданий у лабораторію разом із направленням на пробу сумісності (Зразок №7.6). Звіривши дані на етикетці пробірки з даними на направленні, зразок крові слід позначити реєстраційним номером та внести у Журнал проб сумісності (Зразок №7.7). Друга графа призначена для порядкових номерів реципієнтів. Якщо ми аналізуємо кілька контейнерів із кров'ю — у другу графу лише один раз треба внести номер реципієнта, який слід зазначити на пробірці з його кров'ю. Не слід позначати окремих донацій додатковими номерами.

Зразок №7.6

Лікарня _____ Дата _____
 Відділення _____
 (печатка) _____
 До лабораторії трансфузійної серології _____
 у _____

НАПРАВЛЕННЯ на пробу сумісності крові

Пацієнт:
 Прізвище та ім'я _____
 Дата народження або ідентифікаційний код _____
 Діагноз _____
 Група крові _____
 Імунні антитіла _____
 Реципієнт: першоразовий, багаторазовий; вагітності (потрібне підкреслити)
 Дата останнього переливання _____
 Підпис та печатка лікаря-куратора _____
 Дата і година взяття зразка крові _____
 Розбірливий підпис особи, яка взяла кров _____

Компоненти крові, що видаються банком крові _____
 Група крові / Номери контейнерів _____
 Підпис працівника банку крові _____

**ЖУРНАЛ
проб сумісності**

Сторона 1

Дата	Порядковий номер реципієнта	Керівне відділення	Прізвище та ім'я реципієнта, ідентифікаційний код або дата народження	Група крові АВ0 та Rh (за направленням)		Номер донації	Контроль антигенів АВ0 та D							
				реципієнт	донор		реципієнти			донори				
							-A	-B	-D	-A	-B	-D		

Сторона 2

Контроль антигенів у донора	Оглядовий аналіз антитіл									Сироватка реципієнта + еритроцити донора		Ауто-контроль (якщо є потреба)	Результат	Примітки	Підпис
	Ензимний тест			НАГТ			Контр. НАГТ мінус			НАГТ	Контр. НАГТ мінус				
	Зразкові еритроцити														
	I	II	III	I	II	III	I	II	III						

7.7.3.2. Кров донора

Для проби сумісності використовують зразок крові із сегмента з'єднувальної трубки, відокремленого від контейнера з консервованою кров'ю цільною або з еритроцитовмісним компонентом.

Перш ніж відокремити сегмент з'єднувальної трубки, слід перевірити, чи номер донації та група крові на етикетці сегмента відповідають даним, зазначеним на етикетці контейнера; також слід внести у журнал проб сумісності дані стосовно донора (група крові, номер донації).

У випадках, коли для хворих готують відмиті еритроцитовмісні компоненти, а також інші клітинні компоненти, з домішкою еритроцитів (> 5 мл; про залишок еритроцитів свідчить червоне забарвлення компонента) — пробу сумісності слід виконати перед приготуванням цих компонентів.

Зразки крові донорів слід відцентрифугувати і відмовитись від тих, в яких наявний сильний гемоліз або бактеріальний процес (червоне забарвлення плазми, фіолетове забарвлення еритроцитів). Якщо гемоліз вдається усунути після одного відмивання — зразок може бути придатним для проби сумісності.

Якщо під час скринінгу антитіл в реципієнта не виявлено імунних антитіл, якщо відсутні відомості про імунізацію в минулому, а також якщо в реципієнта не спостерігається аутоантитіл теплового типу — для переливання беруть кров так званого випадкового донора, сумісного з реципієнтом за системою АВ0 та за антигеном D.

Кров спеціально відібраного донора призначена:

1. Для реципієнтів, у яких виявлено (тепер чи в минулому) імунні алоантитіла. У цих випадках підбирати слід кров без антигену, що відповідає цим антитілам; при цьому кров має бути фенотипічно сумісна за системою Rh та антигеном К. Робити контроль антигенів у крові, яка підбирається, не обов'язково, якщо в комп'ютерній системі ЗСК є протоколи визначень цих антигенів і при цьому такі визначення вже щонайменше двічі робилися для цього донора. Якщо в цей конкретний момент кров потрібного фенотипу недоступна — слід у зразках крові випадкових донорів визначити відповідні антигени й обрати для проби сумісності лише таку кров, яка їх не містить. Усі ці дії виконує ЗСК.

2. Реципієнтів, у яких виявлено аутоантитіла теплового типу (НАГТ-позитивний). Таким реципієнтам підбирають кров фенотипічно сумісну за системою Rh та антигеном К.

3. К-негативних реципієнтів-жінок до періоду менопаузи підбирають К-негативну кров.

7.7.3.3. Порядок дій, якщо результат аналізу групи крові реципієнта не відповідає даним, зазначеним у направленні

1. Повідомити відповідне відділення ЗОЗ і розпорядитися, щоб у цього хворого взяли зразок крові повторно.

2. Зробити на матеріалі цього зразка повний аналіз групи крові за системою АВ0 та аналіз антигену D.

3. З'ясувати, чому сталася помилка.

Якщо внаслідок помилки вже видано хибний результат, слід діяти так:

– скасувати запис хибного результату в усіх документах і внести замість нього правильний результат;

– розпорядитися, щоб відділення ЗОЗ ініціювало термінові контрольні аналізи груп крові для всіх пацієнтів, у яких того дня брали кров для визначення групи;

– порівняти отримані результати з попередніми результатами і скасувати в усіх документах хибні результати, замінивши їх на правильні.

7.7.3.4. Порядок дій, якщо результат аналізу групи крові зі зразка, взятого із сегмента дренажної трубки, не відповідає даним на етикетці контейнера

Як діяти в лікарні:

1. Не видавати таку кров та виготовлені з неї компоненти для переливання.

2. Повідомити про розбіжність банк крові, який, у свою чергу, зобов'язаний передати одиницю крові та результати аналізів в ЗСК, з якого надійшла ця кров.

Як діяти в ЗСК:

1. Провести повний аналіз групи крові зі зразка, взятого з контейнера, та зі зразка, взятого повторно в донора.

2. Проконтролювати правильність визначення груп крові в усіх дренажних сегментах, узятих у той день, а в разі виявлення розбіжностей — видалити таку кров і виготовлені з неї компоненти та провести контрольні аналізи крові донорів.

7.7.3.5. Виконання проби сумісності у пробірковому тесті

1. Приготувати заплановану кількість відповідно до позначених пробірок (№ реципієнта, № донора).

2. Відцентрифугувати зразок крові реципієнта й перенести сироватку/плазму в окрему пробірку.

3. Еритроцити донора з дренажного сегмента помістити у пробірку і промити розчином NaCl, а потім — розчином LISS, та виготовити 3–4% завись у цьому розчині.

4. Сироватку реципієнта аналізувати з еритроцитами донорів у тесті НАГТ LISS (згідно з методикою, описаною у п. 7.5.4.1.4.2).

УВАГА!

А. Замість проби сумісності можна проводити мікроколункові тести або інші тести, затверджені ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України».

Б. Якщо аналіз на присутність імунних антитіл у сироватці реципієнта проводиться одночасно з виконанням власне проби сумісності, то аналізи, згадані у підпункті 4 (вище), треба доповнити аналізами сироватки реципієнта з набором стандартних еритроцитів.

В. Щоб максимально убезпечити реципієнта від ризику гемолітичного ускладнення, аналізи на імунні антитіла слід виконувати в день підбору крові. В екстрених випадках можна задовольнитися результатом аналізу, виконаного не раніше ніж 48 год. тому, якщо тільки за цей час не переливалася кров.

Г. Якщо у хворого виявлено аутоантитіла холододового типу, що вступають у реакцію при кімнатній температурі, то під час виконання проби сумісності слід точно додержувати температури 37 °С (еритроцити промивають розчином NaCl та LISS з температурою 37 °С).

7.7.3.6. Інтерпретація результатів проби сумісності

Результати встановлюють у макроскопічному режимі. Пробу слід визнати сумісною, якщо отримано негативний результат з еритроцитами донора, а зі стандартними еритроцитами не виявлено алоантитіл або виключено наявність додаткових алоантитіл, окрім тих, що вже були ідентифіковані.

Аглотинація і з донорськими, й зі стандартними еритроцитами, або тільки з одними із них, свідчить про наявність алоантитіл. Треба встановити їх специфічність і підібрати для хворого кров, яка не містить антигену, що відповідає цим антитілам. Якщо дефіцит часу не дозволяє швидко ідентифікувати антитіла, слід провести пробу сумісності з більшою кількістю зразків крові донорів. Перш ніж переливати підібрану (серологічно сумісну) кров, слід розпорядитися, щоб у хворого взяли 5–10 мл крові в суху пробірку — для визначення специфічності алоантитіл.

Виявлення в сироватці реципієнта алоантитіл, що реагують тільки зі стандартними еритроцитами, а з донорськими не реагують, ще не є достатньою підставою, щоб дати згоду на переливання; рішення про переливання можна ухвалити лише після ідентифікації антитіл і з'ясування, що еритроцити донора не містять того антигену, проти якого імунізований реципієнт.

Якщо сироватка реципієнта реагує з усім набором еритроцитів, узятих для виявлення алоантитіл, а також зі зразками еритроцитів, які підбираються, — слід доповнити аналізи аутоконтролем. Позитивний результат аутоконтролю свідчить про наявність аутоантитіл, і тоді слід провести для реципієнта ПАГТ. Якщо ПАГТ позитивний — слід віддати розпорядження про виконання діагностичних аналізів на предмет аутоімунної гемолітичної анемії і, підбираючи кров, дотримуватися принципів, обов'язкових для цієї групи хворих. Негативний результат аутоконтролю може вказувати на присутність поліспецифічних антитіл або антитіл до поширеного антигену. У деяких хворих причиною слабкопозитивних реакцій сироватки реципієнта з усіма еритроцитами може бути комплемент, адсорбований *in vitro*. Тоді пробу сумісності слід повторити за допомогою класичного НАГТ або застосувати антиглобуліновий реактив анти-IgG.

Якщо в реципієнта не виявлено імунних антитіл, а у пробі сумісності НАГТ дав позитивний результат із одним зі зразків донорської крові, — слід розглянути 2 можливості:

- наявність у реципієнта алоантитіл до рідкісного антигену, наявного у донора та відсутнього у наборі стандартних еритроцитів;
- позитивний ПАГТ у донора.

З'ясувати причину допоможе результат ПАГТ у донора. Частота виявлення позитивного ПАГТ — приблизно 1/10 000–1/14 000 здорових донорів. Кров донора з позитивним ПАГТ не може служити для переливання, оскільки перехресні проби завжди будуть несумісними. ПАГТ у такого донора слід контролювати раз на рік, оскільки цей показник може стати негативним. Донор може здавати плазму методом аферезу.

УВАГА!

- А. Для реципієнтів, яким систематично проводять трансфузії компонентів крові (гемотерапію), а також для тих, яким переливали кров протягом останніх 3-х місяців, слід беззастережно дотримуватися рекомендованого терміну дії проби сумісності, який становить 48 год. з моменту взяття зразка крові у хворого. Ті самі принципи стосуються терміну дії скринінгу сироватки на присутність імунних антитіл. Якщо в цей період кров іще не перелили — необхідно повторити пробу сумісності, використовуючи для цього свіжовзятий зразок крові.*
- Б. Для реципієнтів, яким планується здійснити операційну процедуру в умовах гіпотермії, методика підбору крові не відрізняється; зокрема не слід шукати у них антитіл, активних при температурі, нижчій від 37 °С. Адже немає жодних доказів того, що вони руйнують перелиті кров'яні тільця.*
- В. Поява позитивної реакції, що свідчить про наявність алоантитіл, у пробі сумісності вагітної жінки або породіллі є достатнім приводом для проведення в матері — і, можливо, в дитини — аналізів на предмет серологічного конфлікту.*

Після завершення проб сумісності зразки крові донорів та реципієнтів (цільну кров та відокремлену сироватку) слід помістити в безпечні умови та зберігати в холодильнику при температурі 2–6 °С, протягом 5 днів для того, щоб можна було виконати імуногематологічні аналізи у разі післятрансфузійних ускладнень.

7.7.3.7. Формулювання результатів проб сумісності

Результат проби сумісності пишуть на спеціальному бланку (Зразок №7.8). Коли бланк буде заповнено, здійснюється контроль відповідності інформації у бланку та результатів у журналі аналізів, з етикеткою на пробірці з кров'ю реципієнта, а також з етикетками на сегментах з'єднувальних трубок. Контроль здійснюють 2 особи. Результат проби сумісності має бути підписаний двома особами: особою, яка виконує аналіз, та особою, яка контролює та інтерпретує результати аналізу.

Визначення результату має бути сформульоване однозначно:

кров донора №..... сумісна;
 кров донора №..... несумісна;
 кров донора №..... серологічно несумісна (аутоантитіла),
 фенотипічно сумісна.
 Кров можна переливати хворому.

У бланку до цього результату треба додати результат контрольного аналізу груп АВ0 та Rh хворого і донора, а також відомості про виявлення або невиявлення імунних антитіл.

УВАГА! У позапланові години до аналізів допускається одна особа — лабораторний діагност, який має дійсне посвідчення, що надає право виконувати аналізи.

Зразок №7.8

Лабораторія
 трансфузійної серології
 у _____

Дата _____

Відділення _____

РЕЗУЛЬТАТ
проби сумісності № _____

Прізвище та ім'я реципієнта _____

Дата народження або ідентифікаційний код _____

Контрольний аналіз групи крові _____

Імунні антитіла _____

Кров донора:

Група крові № донації Результат

Група крові № донації Результат

Група крові № донації Результат

Група крові № донації Результат

Проба сумісності дійсна до _____
 (день) (година)

Зауваження _____

Пробу виконав (розбірливий підпис) _____

Перевірив (підпис та печатка) _____

Підписи осіб,
 що підтверджують ідентичність реципієнта перед під'єднанням контейнера з компонентом крові

7.7.3.8. Вибір крові для термінової трансфузії в ургентних випадках

У випадках обґрунтованих показань до негайного переливання крові на письмове розпорядження лікаря-куратора або лікаря, відповідального за запаси крові у лікарні (Зразок №7.9), можна видати замовлену кров іще до виконання проби сумісності. Тоді слід діяти так:

- 1) зареєструвати зразки крові реципієнта і донорів у журналі проб сумісності;
- 2) за допомогою моноклональних реактивів визначити антигени АВ0 і D у реципієнта і донорів;
- 3) задокументувати результати аналізів у журналі проб сумісності;
- 4) видати результати аналізів разом із контейнерами з кров'ю;
- 5) не зволікаючи розпочати проведення проби сумісності.

УВАГА!

А. Не слід виконувати телефонних розпоряджень.

Б. Якщо результат проби сумісності вказує на несумісність — негайно повідомити лікаря.

У винятково екстрених випадках лікар може ухвалити рішення про переливання еритроцитів групи 0 без аналізу групи крові реципієнта й без контрольного аналізу донорської крові. Таке рішення має бути зазначене на формулярі запиту крові для екстреної трансфузії. Якщо екстрену трансфузію планується робити жінці до періоду менопаузи, видавати слід еритроцити групи 0 RhD(–) (мінус). Після видачі контейнерів із кров'ю слід терміново розпочати проведення вищезазначених аналізів.

Зразок №7.9

Заклад охорони здоров'я
Відділення
(печатка)

Дата _____

До лабораторії
трансфузійної серології
у _____

**ЗАПИТ КРОВІ
для екстреної трансфузії**

Прошу видати кров для екстреної трансфузії до виконання проби сумісності
для пацієнта _____
дата народження або ідентифікаційний код _____
група крові пацієнта _____
імунні антитіла _____

Розбірливий підпис особи, яка бере кров

Печатка і розбірливий підпис лікаря

7.7.4. Аналізи, що робляться перед переливанням крові новонародженим та немовлятам до 4-х місяців

Перш ніж переливати кров дитині у перші 4 місяці життя, слід:

1. Визначити групу крові за системою АВ0 і антиген D системи Rh у матері та дитини.
2. Виконати аналізи на наявність імуних алоантитіл у сироватці матері.
3. Для дитини провести ПАГТ.

Якщо у сироватці матері не виявлено імуних алоантитіл, а в дитини ПАГТ дає негативний результат, то для переливання слід видати кров, сумісну з еритроцитами дитини за системою АВ0 і антигеном D, без проби сумісності — за умови, що у крові, призначеній на переливання, перевірено групу АВ0 і антиген D. Результати цих аналізів слід задокументувати у Журналі проб сумісності.

Цих принципів слід дотримуватися навіть при багаторазових трансфузіях (Зразок №7.10).

Якщо у матері виявлено імунні антитіла, то для дитини слід підібрати кров без антигену, що відповідає цим антитілам; крім того, перед кожним переливанням треба робити пробу сумісності із сироваткою матері. У таких випадках слід узяти в матері близько 10 мл крові, а виділену сироватку поділити на малі порції та зберігати їх у замороженому стані. Їх використовують у наступних дослідженнях проб сумісності.

Якщо кров матері не є наявною, слід перевірити сироватку дитини на наявність імунних антигенів і виконати пробу сумісності перед першою трансфузією. Якщо обидва аналізи дали негативні результати, перед наступними трансфузіями проб сумісності можна не робити. Однак, якщо у сироватці дитини виявлено імунні антитіла, необхідно визначити їх специфічність і проводити пробу сумісності перед кожною трансфузією.

Зразок №7.10

ЯК ДІЯТИ ПЕРЕД ПЕРЕЛИВАННЯМ КРОВІ НОВОНАРОДЖЕНИМ ТА НЕМОВЛЯТАМ ДО 4-Х МІСЯЦІВ

Кров матері наявна

Аналізи

Мати

Група АВ0, Rh

Імунні антитіла

Дитина

Група АВ0, Rh

ПАГТ

Негативні результати аналізу на імунні антитіла
МОЖНА ПЕРЕЛИВАТИ БЕЗ ПРОБИ СУМІСНОСТІ

Позитивні результати аналізу на імунні антитіла
ПЕРЕД КОЖНОЮ ТРАНСФУЗІЄЮ РОБИТИ АНАЛІЗ ІЗ СИРОВАТКОЮ МАТЕРІ

Кров матері неаявна

Аналіз крові дитини

Група АВ0, Rh

ПАГТ, імунні антитіла у сироватці

Негативні результати аналізу на імунні антитіла
МОЖНА ПЕРЕЛИВАТИ БЕЗ ПРОБИ СУМІСНОСТІ

Позитивні результати аналізу на імунні антитіла
ПЕРЕД КОЖНОЮ ТРАНСФУЗІЄЮ РОБИТИ АНАЛІЗ ІЗ СИРОВАТКОЮ ДИТИНИ

Дітям із групами крові А і В, народженим матерями з групою 0, слід переливати еритроцити групи 0. У цих випадках кров, однойменну з групою дитини, можна переливати лише після аналізів із сироваткою матері, якщо ці аналізи вказують на відсутність антитіл анти-А або анти-В класу IgG, або ж після виконання проби сумісності із сироваткою дитини з використанням ПАГТ.

УВАГА! Аналізи у новонародженого можна робити на зразку пуповинної крові.

7.7.5. Аналізи, що робляться перед аутотрансфузією

Перш ніж брати кров для аутотрансфузії, для хворих слід виконати:

- обстеження на маркери вірусів HBsAg (гепатит В), анти-HCV (гепатит С) і анти-ВІЛ 1,2, а також аналіз на сифіліс;
- визначення групи крові за системою АВ0 і антигену D системи Rh; ці дослідження мають проводитися тими ж методами, що застосовувалися й для донорів крові;
- аналіз на наявність імунних антитіл, спрямованих до еритроцитів.

Перед аутотрансфузією слід провести:

- контрольний аналіз групи АВ0 зі зразка крові, взятого з сегмента з'єднувальної трубки, і порівняти результат із результатом аналізу групи крові хворого;
- пробу сумісності.

УВАГА!

А. Позитивний результат будь-якого з тестів на інфекцію, яка переноситься через кров, автоматично являє собою протипоказання до взяття цієї крові для аутотрансфузії.

Б. Виявлення імунних алоантитіл не являє собою протипоказання до взяття крові для аутотрансфузії.

В. Невикористану кров та її компоненти слід утилізувати. Не можна переливати її іншому хворому. Виняток — концентрати еритроцитів, що не містять якогось із поширених антигенів; такі еритроцити слід зберігати в замороженому стані.

7.8. Імунологічний аналіз гемолітичних післятрансфузійних реакцій

Метою аналізів є встановлення причини післятрансфузійної реакції, а також визначення, яку кров можна переливати хворому.

7.8.1. Рання реакція

Ранньою реакцією вважаються симптоми, що виявляються у хворого під час трансфузії або у 24 год. після неї.

Для аналізу післятрансфузійної реакції дуже важливе значення має зразок крові хворого, узятий перед переливанням.

Вказівки щодо того, як діяти у разі виявлення післятрансфузійної реакції, містяться наказі МОЗ України від 12.03.2011 р. №1112 «Про затвердження положення для установи переливання крові щодо організації управління системою якості і безпеки донорської крові та її компонентів».

Раннє виявлення серологічної причини післятрансфузійної реакції надає можливість швидкого медичного втручання і дозволяє уникнути найтяжчих ускладнень, спричинених передусім несумісністю за системою АВ0 та за антигеном D із системи Rh. Часто клінічні симптоми є неоднозначними; причину ускладнення треба відрізнити від бактеріального зараження. Тоді, перш ніж розпочинати серологічні аналізи донорської крові з контейнерів, слід перевірити, чи були з цих контейнерів узяті зразки для бактеріологічних аналізів.

Аналізи крові реципієнта і донора роблять за загальноприйнятою схемою:

1) перевірити групу за системою АВ0 та Rh у зразках крові реципієнта, взятих до і після переливання, а також крові донорів, у контейнерах та сегментах з'єднувальних трубок, які залишилися в лабораторії після виконання проби сумісності;

2) повторити пробу сумісності;

3) провести ПАГТ з еритроцитами реципієнта, які походять із крові, взятої після переливання. Отримання позитивного результату зобов'язує до виготовлення елюату та дослідження специфічності виявлених у ньому антитіл;

4) здійснити пошук імунних антитіл в усіх доступних зразках сироватки реципієнта, застосовуючи при цьому додаткові чутливі методики (наприклад, колонковий мікротест або інший тест, випробуваний та затверджений ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України»). Під час

аналізів слід використовувати, окрім перелитих еритроцитів, також стандартні еритроцити, що містять антигени в подвійній дозі.

Результат аналізу слід надавати у 2-х примірниках: один для лікарні, другий для хворого. Рекомендується також виконати контрольний аналіз антитіл приблизно через 3 місяці.

УВАГА!

А. Якщо в сироватці реципієнта не виявлено імунних антитіл, слід повторити їх пошук, почекавши кілька днів після переливання.

Б. Якщо отримано негативні результати, які свідчать проти серологічної несумісності у сфері еритроцитів, доцільно провести контрольний аналіз сироватки реципієнта на наявність антитіл анти-HLA і антитіл, спрямованих проти антигенів, які виявляються тільки на тромбоцитах або на гранулоцитах.

7.8.2. Відстрочена реакція

У людей, сенсibiliзованих попередніми переливаннями крові або вагітностями, може виявитися відстрочена гемолітична реакція. Зазвичай вона виявляється між 3-м та 21-м днем після трансфузії серологічно сумісної крові. Саме тому так важливо забезпечувати хворим тривалий клінічний нагляд після кожного переливання. Якщо виявляють себе симптоми гемолізу (безпідставне підвищення температури тіла, анемія, білірубінемія, пожовтіння шкірних покривів) слід якнайшвидше провести такі аналізи:

- прямий антиглобуліновий тест (отримання позитивного результату зобов'язує до визначення специфічності антитіл в елюаті);
- пошук і встановлення специфічності алоантитіл у сироватці.

УВАГА! Якщо з моменту останнього переливання минуло понад 3 дні, рекомендується відокремити еритроцити хворого від перелитих і провести аналізи популяції еритроцитів донора (п. 7.5.8).

Вчасне виявлення відстроченої гемолітичної реакції та встановлення специфічності антитіл, які спричиняють цю реакцію, має велике значення для запобігання майбутнім тяжким післятрансфузійним ускладненням.

7.9. Імуногематологічні аналізи у діагностиці гемолітичної хвороби плода і новонародженого (ГХПН)

Імуногематологічні аналізи треба розпочинати у пренатальний період, щоб розпізнати вагітність із ризиком ГХПН і призначити внутрішньоматкову діагностику, яка дозволить почати лікування і позитивно завершити вагітність в оптимальний для дитини час. Необхідні аналізи зазначено у схемі, наведеній на рис. 7.2.

I. До 12-го тижня вагітності
для всіх жінок

- група АВ0 та Rh
- імунні алоантитіла



антитіла відсутні



- імунні алоантитіла



антитіла відсутні



II. 28-й тиждень вагітності
для всіх жінок

III. Після пологів

Rh(-) жінки:

Кваліфікаційні аналізи,
чи потрібен IgG анти-RhD

Rh(+) жінки:

Імунні антитіла,
якщо дитині необхідна
гемотерапія

алоантитіла наявні:
– ідентифікація
– систематичний контроль

– аналізи крові батька дитини
Призначення
внутрішньоматкової діагностики



Діагностика ГХПН

Рис. 7.2. Імуногематологічні аналізи у діагностиці гемолітичної хвороби плода і новонародженого (ГХПН)

7.9.1. Аналізи під час вагітності

Виконувати основні діагностичні аналізи зобов'язані певні (конкретно визначені) імунотрансфузіологічні лабораторії, до яких лікар-гінеколог має направляти жінок у період вагітності, як RhD-позитивних, так і RhD-негативних, двічі:

- до 12-го тижня вагітності;
- на 28-му тижні вагітності.

Метою цих аналізів є раннє виявлення імунних алоантитілів до антигенів еритроцитів. Жінки, у яких виявлено алоантитіла, мають бути терміново направлені (разом із чоловіком) до відповідної лабораторії ЗСК або ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України». Таке направлення має містити:

- результат аналізу групи крові АВ0 та Rh;

– відомості про виявлені антитіла — у такому вигляді: «у сироватці виявлено алоантитіла, що реагують з еритроцитами..... у тестах..... Потрібен контроль у лабораторії, яка здійснює діагностику серологічного конфлікту; адреса.....».

Обсяг обов'язкових аналізів включає:

- встановлення специфічності антитіл;
- показник антитіл;
- аналізи крові батька дитини.

Отримані результати дозволяють оцінити ризик виявлення ГХПН.

Під час вагітності не роблять аналізів імунних антитіл із системи АВ0, оскільки діагностичне значення результатів цих аналізів є дуже низьким. Материнські антитіла анти-А/анти-В не становлять загрози для дитини у період її життя як плода. Такі діти народжуються з добрим клінічним станом, без анемії або з легкою анемією (зрідка — з помірною). Діагностичні аналізи слід зробити, коли у новонародженого почнуть виявлятися клінічні симптоми гемолітичної хвороби.

7.9.1.1. Виявлення антитіл системи Rh та інших групових систем

1. Для виявлення антитіл рекомендуються 2 тести: НАГТ-LISS та LEN.
2. Для аналізів застосовують такий самий набір стандартних еритроцитів, як і при виявленні антитіл у реципієнтів крові (п. 7.6.5.1.).
3. Якщо результати аналізів груп крові АВ0 дозволяють — слід залучити до аналізів і еритроцити батька.

УВАГА!

А. Аналіз із еритроцитами батька необхідний у кожному з тих випадків, коли при попередній вагітності мали місце симптоми ГХПН або загибель плода з невизначених причин, а при цьому імунні антитіла у матері за допомогою стандартних еритроцитів не виявляються. Якщо антитіла анти-А або анти-В виявити неможливо, то їх належить абсорбувати відповідними еритроцитами випадкового донора (дві адсорбції при пропорції 1:1; одна — упродовж 60 хв. при кімнатній температурі, друга — тривалістю 30 хв. при температурі 37 °С).

Б. Виявлення в сироватці матері алоантитіл, які реагують виключно з еритроцитами батька дитини, підтверджує серологічний конфлікт у родині (зустрічається він досить рідко). У такій ситуації для встановлення специфічності алоантитіл потрібні ширші аналізи із застосуванням набору еритроцитів, що містять низькочастотні антигени.

7.9.1.2. Ідентифікація алоантитіл

Визначення специфічності антитіл, виявлених у сироватці матері, є необхідним для:

1. Оцінки клінічного значення антитіл у патогенезі ГХПН.
2. Проведення відповідних аналізів крові батька дитини, які нерідко дозволяють передбачити наявність або відсутність на еритроцитах плода того антигену, до якого організм матері виробляє антитіла.
3. Більш ранньої підготовки потрібної крові для переливання, як для матері, так і для дитини, — якщо таке лікування буде необхідним під час вагітності або після пологів.

Принципи ідентифікації антитіл наведено у п. 7.6.6.

Специфічність алоантитіл слід контролювати у ході вагітності, оскільки може виявитися додаткова імунізація матері іншими антигенами еритроцитів плода, а в разі внутрішньоматкових переливань — також антигенами донорів.

Для пошуку додаткових антитіл слід підготувати набір еритроцитів, які не містять антигену, що вже спричинив імунізацію матері. Рекомендується, щоб еритроцити походили від донорів, гомозиготних в окремих групових системах (особливо в системах Kidd та Duffy).

У вагітних жінок частіше виявляють «натуральні» антитіла (класу IgM), як-от анти-Lea, анти-H (-H), анти-P₁, наявність яких не пов'язана з імунізацією антигенами еритроцитів і які не мають значення в імунопатології вагітності. Якщо вони утруднюють пошук імунних антитіл (IgG), то їхню активність слід усунути за допомогою 2ME.

7.9.1.3. Визначення титру антитіл

У разі виявлення алоантитіл IgG, які можуть бути причиною ГХПН, слід визначити їх титр у НАГТ-NaCl:

- у першому зразку, в якому їх виявлено;

- у зразках, що бралися з місячними інтервалами;
- починаючи з 24-го місяця вагітності, — у зразках, узятих навіть із двотижневими інтервалами, залежно від динаміки зростання рівня антитіл.

Решту сироватки з аналізованого зразка слід зберігати в замороженому стані до наступного аналізу. Подальші аналізи мають виконуватися паралельно: на сироватці зі свіжозятого зразка та зі зразка з попереднього аналізу за допомогою гетерозиготних еритроцитів — того самого донора, що й у попередньому аналізі, або іншого з таким самим фенотипом. Такий спосіб дій дозволяє правильно оцінити зростання рівня антитіл у матері.

7.9.1.3.1. Інтерпретація результатів аналізів

Титр антитіл анти-D із системи Rh, що становить понад 16 в НАГТ, свідчить про їх високий рівень і являє собою разом із акушерським обстеженням та результатами ультрасонографії одне з показань для внутрішньоматкової діагностики.

Для антитіл іншої специфічності граничного значення титру не встановлено.

7.9.1.4. Аналізи крові батька дитини

1. Визначити групу крові за системою АВ0 та Rh.
2. Якщо в матері виявлено тільки антитіла анти- $Rh_0(D)$, а батько є $Rh_0(D)$ -негативним, подальших аналізів робити не треба, оскільки дитина мусить бути теж $Rh_0(D)$ -негативною.
3. Якщо батько є $Rh_0(D)$ -позитивним, слід визначити його фенотип Rh за допомогою додаткових реактивів: анти-С, анти-с, анти-Е та анти-е. Після встановлення ймовірного генотипу (табл. 7.5) — сформулювати результат у такому, наприклад, вигляді: «Rh+(DCCee). Імовірний генотип DСe/DСe». Сьогодні існує можливість визначення генотипу батька і гена D плода методами молекулярної біології. Ці аналізи здійснюються в закладах та установах, що мають відповідні акредитовані лабораторії.
4. Якщо в матері виявлено антитіла системи Rh, наприклад, анти-с, анти-С^w, анти-Е, або антитіла з інших групових систем, наприклад, анти-К системи Kell, то слід за допомогою діагностичних реактивів з'ясувати, чи наявний на еритроцитах батька антиген, що відповідає їм, в одинарній або подвійній дозі. Це в багатьох випадках дозволить точно передбачити, присутній чи відсутній антиген, що відповідає за конфлікт, на еритроцитах плода.

УВАГА! Аналізи, згадані вище у підпунктах 3 і 4, можна замінити/доповнити визначенням генотипу (п. 7.4.2).

7.9.1.5. Серологічні аналізи еритроцитів плода

Якщо при вагітності є високий ризик ГХПН, то застосовують прокол судин пуповини (кордоцентез) для безпосередньої оцінки тяжкості гемолітичної хвороби плода. Нижче окреслено обсяг імуногематологічних аналізів.

1. Визначення групи крові за системою АВ0 та антигену D із системи Rh. Якщо у плода група крові АВ0 та $Rh_0(D)$ виявиться ідентичною з матір'ю, необхідно повністю виключити можливість помилки у взятті аналізованого зразка (кров матері). Найпростіший метод — паралельний аналіз цих еритроцитів та еритроцитів матері за допомогою сироватки анти-I, яка не реагує з еритроцитами плода.
2. Залежно від специфічності антитіл, виявлених у сироватці матері, — визначення інших антигенів, відповідальних за її імунізацію.
3. Виконання ПАГТ.

УВАГА! У плода ген D, а також гени С, с та Е можна визначити неінвазивним методом (у плазмі матері), тоді як гени, відповідальні за успадкування плодом інших антигенів, аналізують у навколоплідній рідині або у ворсинках хоріона плаценти. Для виконання цих аналізів матеріал слід надіслати до закладу або установи, де є відповідне відділення або лабораторія. Молекулярні аналізи дозволяють значно зменшити потребу в кордоцентезі.

7.9.2. Аналізи після пологів

7.9.2.1. Кров матері

Жінки, прийняті до акушерського відділення, повинні мати результати аналізів групи крові АВ0 та Rh, а також імунних антитіл. Якщо протягом вагітності такі аналізи не робилися — слід негайно їх виконати. Виявлення імунних алоантитіл у матері свідчить про можливість гемолітичної хвороби в дитини. У такому разі зразок крові матері слід передати в консультаційну лабораторію закладу служби крові:

- для підтвердження та ідентифікації антитіл;
- визначення їхньої ваги в імунопатології вагітності;
- підбору крові для можливого переливання матері або дитині.

УВАГА! Якщо мати має в крові імунні антитіла — для новонародженої дитини слід негайно виконати аналізи на діагностику ГХПН.

7.9.2.2. Кров новонародженого

1. Рекомендується брати зразок пуповинної крові в кожного новонародженого.
2. Зразок слід позначити прізвищем матері та приміткою «пуповинна кров» і зберігати в холодильнику упродовж 3–5 днів при температурі 2–6 °С до можливого використання, якщо виникне необхідність проведення імуногематологічних аналізів.

УВАГА!

А. Аналіз груп крові і ПАГТ слід робити для всіх новонароджених, матері яких є Rh₀(D)-негативними (визначення показань до застосування імуноглобуліну анти-D). Якщо матері під час вагітності вводили імуноглобулін анти-D, ПАГТ для новонародженого не роблять.

Б. Для решти новонароджених, матері яких RhD-позитивні й не імунізовані антигенами еритроцитів, серологічних аналізів крові не роблять.

7.9.2.3. Діагностика ГХПН

Діагностичні аналізи є обов'язковими для кожного випадку виявлення імунних антитіл у матері під час вагітності або в перинатальний період. На матеріалі зразка пуповинної крові слід зробити:

- визначення групи крові за системою АВ0 та Rh;
- визначення антигенів з інших групових систем, залежно від специфічності алоантитіл матері;
- ПАГТ;
- у деяких випадках, коли ПАГТ дитини дає позитивний результат, а у матері при скринінгу не виявлено антитіл або виявлено поліспецифічні антитіла, — рекомендовано виконати елюцію антитіл з еритроцитів новонародженого.

Для новонародженого визначення групи крові за системою АВ0 (див. п. 7.6.2) і антигену D із системи Rh проводиться виключно за допомогою моноклональних реактивів, пробірковим методом або іншим, що його перевірено та затверджено ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України». Якщо еритроцити новонародженого щільно вкриті антитілами IgG, застосування людських діагностичних сироваток для визначення антигенів в ПАГТ може призвести до помилкової інтерпретації результатів. У таких випадках, якщо бракує відповідних моноклональних реактивів IgM (наприклад, анти-Fy^a, анти-s), треба перед виконанням аналізу усунути з еритроцитів антитіла, наприклад, за допомогою кислого гліцину та EDTA (п. 7.5.10.2).

Прямий антиглобуліновий тест слід виконати пробірковим методом або чутливішими колонковими методами. Позитивний результат ПАГТ підтверджує ГХПН і свідчить про те, що антитіла матері проходили крізь плаценту і руйнували еритроцити дитини.

У дітей із резус-конфліктом, які отримували внутрішньоматкову гемотерапію, визначення групи крові АВ0 та Rh, а також ПАГТ можуть давати псевдонегативний результат; причина — наявність у кровообігу новонародженого перелитих Rh₀(D)-негативних еритроцитів. Їх популяція переважає — часто їх кількість перевищує 99%. Щоб уникнути помилкових результатів, у направленні на серологічний аналіз крові та в інформаційній лікарняній картці слід робити примітку: «На стадії плода прохдив лікування кров'ю RhD Rh₀(D) (нег.)».

УВАГА!

А. Діагностику на предмет ГХПН слід здійснювати також у кожному з випадків несподіваної появи в новонародженого клінічних симптомів гемолітичної хвороби (патологічна жовтуха, анемія). Несподівана ГХПН буває головним чином тоді, коли жінки у період вагітності не роблять аналізів на імунні антитіла. У такому разі слід провести аналізи крові як новонародженого, так і матері.

Б. Якщо аналізи з набором стандартних еритроцитів не виявляють антитіл у сироватці матері — причиною ГХПН можуть бути антитіла із системи АВ0 або антитіла до рідкісного антигену.

7.9.2.4. Діагностика ГХПН при АВ0-конфлікті**7.9.2.4.1. Пошук антитіл IgG анти-А/анти-В у сироватці матері**

Після термічної інактивації натуральних антитіл IgM у сироватці матері слід провести пошук антитіл анти-А/анти-В. Роблять це так:

- розвести сироватку такою самою кількістю розчину NaCl;
- ретельно перемішавши, помістити на 20 хв. на «водяну баню» при температурі 70 °С;
- охолодивши до кімнатної температури, виконати НАГТ з еритроцитами дитини, а також з еритроцитами донора, який має спільну з дитиною групу крові АВ0.

Поява аглютинації з еритроцитами донора свідчить про наявність імунних антитіл у матері. Аглютинація еритроцитів дитини свідчить про те, що антиген АВ0 дозрів до імунних реакцій. Невиявлення антитіл IgG у матері безпосередньо після пологів іще не виключає можливості ГХПН, оскільки в перинатальний період їхня концентрація може падати аж до такого низького рівня, що звичайні, повсякденно застосовувані серологічні тести можуть їх і не виявляти. Початкова діагностика ГХПН має спиратися на клінічні симптоми і на точно встановлений незбіг груп крові АВ0 у матері та дитини. Зазвичай, якщо через 3–5 днів після пологів повторити аналізи, антитіла виявляться.

7.9.2.4.2. Аналізи в новонародженого

Для новонародженого обов'язково:

- визначити групу крові АВ0 та Rh₀(D);
- виконати ПАГТ;
- якщо збереглася пуповинна кров — виконати аналіз антитіл у сироватці (без інактивації) та в елюаті з еритроцитів.

УВАГА!

А. Результати аналізів пуповинної крові підтверджують клінічний діагноз ГХПН краще, ніж аналізи крові матері.

Б. Рекомендується метод елюції антитіл за Ландштейнером або описаний нижче метод Луї.

7.9.2.4.3. Елюція антитіл методом Луї

1. Шестиразово промити еритроцити розчином NaCl і залишити супернатант з останнього промивання (контроль елюату).
2. Щонайменше у 2 пробірки помістити по 0,5 мл промитих густих еритроцитів.
3. Додати по 3 краплі розчину NaCl і ретельно перемішати.
4. Пробірки закоркувати і обергати таким чином, щоб еритроцити вкрили їх внутрішню поверхню.
5. На 10 хв. помістити пробірки у горизонтальне положення при температурі від –20 до –70 °С.
6. Вийнявши пробірки, швидко розморозити еритроцити під струменем гарячої води і центрифугувати протягом 2 хв. із прискоренням 1000 × g.
7. Перенести супернатант (елюат) до чистої пробірки й аналізувати шляхом НАГТ, пробірковим методом (не колонковим), паралельно з контрольним супернатантом, з еритроцитами А або В.

7.9.2.5. Діагностика ГХПН у рідкісному серологічному конфлікті

Цей конфлікт стосується антитіл, спрямованих до низькочастотних чи дуже низькочастотних антигенів або ж до антигенів, які є поширеними.

7.9.2.5.1. Антитіла до антигенів з низькою частотою поширення

Приклади таких антитіл — це анти-С^w із системи Rh (частота анти-С^w — 2%), анти-Кр^a із системи Kell (1%) чи анти-Di^a із системи Diego (0,46%). Присутність цього типу антитіл можна виявити шляхом аналізів сироватки матері з еритроцитами дитини або її батька. У разі неспівпадіння за групою АВ0 треба в першу чергу усунути активність групових антитіл шляхом їх адсорбції за допомогою еритроцитів випадкового донора з відповідною групою крові. Можна також використати елюат з еритроцитів новонародженого — проаналізувати елюат з еритроцитами батька у таких тестах, як НАГТ -LISS та ензимний тест.

Якщо йдеться про антитіла до рідкісного антигену еритроцитів — проблем із пошуком сумісної крові для матері й дитини немає. Отже, ідентифікацію антитіл, відповідальних за ГХПН, можна проводити протягом кількох наступних днів і не затримувати з цього приводу процедур гемотерапії. Діагностика таких антитіл вимагає багато часу та застосування спеціального набору стандартних еритроцитів.

7.9.2.5.2. Антитіла до поширених антигенів

Приклади таких антитіл: анти-k та анти-Кр^b із системи Kell, анти-Di^b із системи Diego, анти-Со^a із системи Colton або анти-Lan. Частота вияву антигенів, до яких вони спрямовані, перевищує в популяції 99%. В імуногематологічних аналізах вони характеризуються активністю стосовно всіх еритроцитів — стандартних і випадкових, за винятком аутологічних. Якщо антитіла виявлено у класі IgG, то необхідно їх якнайшвидше ідентифікувати. Якщо у встановленні специфічності антитіл виникають труднощі — зразки крові вагітної, її кровних родичів та чоловіка слід передати до ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України». Такі антитіла треба виявляти у ранній період вагітності — з огляду на те, що ідентифікувати їх дуже складно і знайти сумісного донора крові може бути вкрай важко. Оскільки мати й дитина мають бути забезпечені сумісною кров'ю, у таких випадках можна міркувати про взяття крові у вагітної та зберігання цієї крові в замороженому стані. Якщо діагностику розпочато вже після пологів, необхідна як матері, так і дитині гемотерапія може виявитися неможливою.

7.9.3. Принципи вибору крові для трансфузії у плід та обмінної трансфузії

7.9.3.1. Вибір крові для трансфузії у плід

1. Підбирати слід кров групи 0, що не містить антигенів, до яких спрямовані антитіла, виявлені у матері.

2. З огляду на деякі випадки імунізації вагітної антигенами, присутніми у крові, використаній для трансфузії у плід, — слід у вагітної визначити антигени із систем Kell (K та k), Kidd (Jk^a та Jk^b), Duffy (Fy^a та Fy^b), MNS (S та s) і вибрати для переливання кров, сумісну за цими антигенами із кров'ю матері.

3. Якщо група крові АВ0 плода серологічно сумісна з групою крові матері (наприклад, мати і плід групи А, або мати групи АВ, а плід групи А), то можна підбирати еритроцити, однойменні за системою АВ0.

4. У ситуації конфлікту Rh₀(D) добирати слід Rh₀(D)-негативну кров, а в іншому дотримуватися принципів, наведених у підпунктах 1, 2 і 3 (вище).

7.9.3.2. Вибір крові для обмінної трансфузії

1. У ситуації конфлікту Rh₀(D) добирати слід Rh₀(D)-негативну кров.

Якщо між матір'ю та дитиною є серологічна сумісність за системою АВ0 (наприклад, мати і новонароджений групи А, або мати групи АВ, а новонароджений групи А), слід підбирати кров, сумісну з групою крові дитини.

У випадку новонароджених групи А або В, матері яких мають групу 0, для обмінної трансфузії готують кров цільну відновлену (КЦВ АВ0).

Якщо материнські антитіла системи АВ0 роблять неможливим виконання проби сумісності із сироваткою матері (наприклад, мати групи А, а дитина групи В, або мати групи В, а дитина групи АВ), то для обмінної трансфузії готують кров цільну відновлену (КЦВ АВ0).

2. У ситуації конфлікту в системі АВ0 підбирати слід кров цільну відновлену (КЦВ АВ0). Це концентрат еритроцитів донора групи 0 (його Rh має бути сумісним із кров'ю дитини), завішений у плазмі донора групи АВ або у плазмі, сумісній із групою АВ0 дитини.

3. Якщо серологічний конфлікт стосується інших антигенів (наприклад, анти-К, анти-Е, анти- Fy^a), то кров для переливання не повинна містити антигену, який спричинив імунізацію матері.

4. У плазмі, призначеній для КЦВ АВ0, титр аглютининів анти-А або анти-В не повинен перевищувати 16. Замість визначення титру аглютининів можна зробити НАГТ у розведенні плазми 1:50; результат цього тесту має бути негативним.

УВАГА! У період перших 4-х місяців життя дитини для наступних переливань використовують кров тієї самої групи АВ0 та $Rh_0(D)$, що й для першої трансфузії.

Деталі стосовно виготовлення препаратів крові для трансфузії у плід та для обмінної трансфузії наведено у пп. 6.3.1, 6.3.3 і 6.3.4.

7.9.3.3. Проба серологічної сумісності

Пробу серологічної сумісності виконують згідно з методикою, наведеною у п. 7.7; нижче подано додаткові принципи, яких треба дотримуватися.

1. У сироватку реципієнта слід застосовувати сироватку матері.

2. Якщо антитіла АВ0 матері не дозволяють підібрати кров, сумісну за групою з кров'ю дитини, слід підбирати еритроцити групи 0.

3. Виконуючи пробу сумісності з концентратом еритроцитів, завішених у плазмі іншої групи АВ0, слід пам'ятати, що в контрольних аналізах донора необхідно перевірити також титр антитіл анти-А або анти-В у плазмі.

4. Якщо сироватка матері недосяжна, слід брати сироватку новонародженого, а в разі позитивного результату ПАГТ — також елюат із його еритроцитів.

УВАГА! Якщо дитину імунізованої матері переводять до іншої лікарні, то в супроводі слід передати:

- результати аналізів, що стосуються груп крові матері й дитини, а також імунних антитіл, виявлених у матері;
- зразок крові матері (20 мл крові, сироватку з якої, поділену на кілька порцій, можна зберігати в замороженому стані протягом періоду лікування дитини і використовувати в наступних пробах сумісності).

7.9.4. Лабораторні аналізи, пов'язані з профілактикою конфлікту за антигеном D системи Rh

Перш ніж давати імуноглобулін анти- $Rh_0(D)$ породіллі, слід провести такі обов'язкові аналізи:

а) у крові матері:

- визначення антигену D системи Rh;
- аналіз антитіл анти-D за допомогою НАГТ;

б) у пуповинній крові:

- визначення антигену D системи Rh;
- прямий антиглобуліновий тест.

Імуноглобулін анти- $Rh_0(D)$ призначають $Rh_0(D)$ -негативній жінці, в якій не виявлено антитіл анти-D, і дитина якої є $Rh_0(D)$ -позитивною з негативним ПАГТ.

Перш ніж давати імуноглобулін анти- $Rh_0(D)$ під час вагітності чи після викидня, слід провести для жінки такі кваліфікаційні аналізи:

- визначення антигену D системи Rh;
- аналіз антитіл анти-D за допомогою НАГТ.

Імуноглобулін анти- $Rh_0(D)$ призначають $Rh_0(D)$ -негативній жінці, в якій не виявлено антитіл анти-D.

УВАГА!

- А. Якщо аналіз зроблено також для партнера і визначено, що він є Rh-негативним, жінці під час вагітності не призначають імуноглобулін анти-Rh₀(D).*
- Б. Жінка, яка отримала імуноглобулін анти-Rh₀(D) під час вагітності, повинна отримати відповідну дозу препарату й після народження Rh₀(D)-позитивної дитини. Кваліфікаційні аналізи в такому разі обмежуються до визначення в матері та дитини антигену D із системи Rh. У матері не роблять аналіз антитіл анти-D, оскільки вони можуть бути присутні як пасивно набуті; з тих самих причин для новонародженого не виконують ПАГТ.*
- В. Відомості про початок профілактики під час вагітності мають бути розміщені в документації пацієнтки та надіслані до лабораторії трансфузійної серології.*
- Г. Повсюдне впровадження аналізу гена D плода у плазмі матері значною мірою обмежить використання та витрати імуноглобуліну анти-Rh₀(D) у профілактиці конфлікту під час вагітності, оскільки цей імуноглобулін не буде призначатися жінкам, у яких не виявлено гена D плода.*

7.9.4.1. Виявлення еритроцитів плода у кровообігу матері: тест кислотної елюації модифікованим методом Клейхауера–Бетке

У випадку підозри на велику втрату крові плодом, наприклад, у разі значної анемії новонародженого безпосередньо після появи на світ, слід визначити об'єм крові плода у кровообігу матері. Після цього слід обчислити дозу імуноглобуліну анти-RhD, яку треба дати матері. Виходимо з того, що на кожен мілілітр крові плода потрібно 10 мікрограмів антитіл анти-D.

7.9.4.1.1. Реактиви

1. Буфер Мак-Ілвейна, рН 3,3–3,4: для кожного аналізу слід готувати свіжий буфер, змішуючи 74 мл маточного розчину А і 26 мл маточного розчину Б; перемішавши, перевірити рН.

Маточний розчин А (0,1 моль/л лимонна кислота):

21,0 г C₆H₈O₇ · H₂O розвести дистильованою водою до 1 л; зберігати у холодильнику при температурі 2–6 °С;

Маточний розчин Б (0,2 моль/л фосфат натрію):

71,63 г Na₂HPO₄ · 12H₂O розвести дистильованою водою до 1 л; зберігати у холодильнику при температурі 2–6 °С.

2. Барвники:

- 0,5% водний розчин еритрозину В;
- кислий гематоксилін (Гарріса).

3. 80% етиловий спирт.

4. Позитивний контроль: суміш крові дорослої людини (10 часток) та пуповинної крові (1 частка).

5. Негативний контроль: кров дорослої людини.

7.9.4.1.2. Виконання аналізу

1. Приготувати тонкі мазки крові.
2. Сушити на повітрі протягом 10 хв.
3. Фіксувати мазки протягом 5 хв. 80% етиловим спиртом.
4. Промити дистильованою водою.
5. Довести буфер Мак-Ілвейна до температури 37 °С і занурити в нього скельця з мазками на 5 хв.
6. Промити дистильованою водою.
7. Занурити скельця з мазками у гематоксилін на 5 хв.
8. Протягом хвилини ретельно промивати проточною водою.
9. Занурити скельця з мазками в еритрозин на 5 хв.
10. Промити проточною водою.
11. Полічити під мікроскопом 2000 еритроцитів і зафіксувати кількість еритроцитів плода.
12. Обчислити відсоток еритроцитів плода у загальній кількості полічених еритроцитів.

7.9.4.1.3. Інтерпретація результату

Еритроцити плода, які містять гемоглобін F, видимі як рожеві клітини, що заломлюють світло. Еритроцити дорослих людей, що містять гемоглобін А, — знебарвлені, видимі як бліді тіні клітин. Ядра лейкоцитів мають інтенсивне блакитне забарвлення, а цитоплазма сіро-блакитна. Частка плодово-материнського кровообігу в мл цільної крові = відсоток еритроцитів плода × 50.

7.9.4.2. Інші методи виявлення еритроцитів плода у кровообігу матері

Серед інших методів найчастіше застосовується проточна цитометрія.

7.10. Аналізи при аутоімунній гемолітичній анемії (АІГА)

7.10.1. АІГА з аутоантитілами теплового типу

Для аналізів слід узяти в суху пробірку близько 5 мл крові, а також узяти 4 мл крові на EDTA, після чого виконати перелічені нижче аналізи.

1. ПАГТ із полівалентним реактивом.
2. ПАГТ із моноспецифічними реактивами (якщо з полівалентним реактивом отримано позитивний результат).
3. Елюат з еритроцитів хворого (п. 7.5.9.2) та аналіз активності елюату з набором стандартних еритроцитів.
4. Аналіз сироватки з набором стандартних еритроцитів та з аутологічними еритроцитами. У разі отримання позитивних результатів провести адсорбцію аутоантитіл із сироватки (п. 7.5.9.1).
5. Виявлення алоантитіл у сироватці після адсорбції аутоантитіл (за допомогою НАГТ).
6. Визначення фенотипу Rh та — в міру потреби — інших антигенів еритроцитів (із використанням моноклональних реактивів). Якщо застосовуються людські діагностичні сироватки, передусім слід усунути з еритроцитів аутоантитіла (п. 7.5.10).
7. Підбір для переливання крові, фенотипічно сумісної за системою Rh та антигеном К. У випадку одночасної наявності алоантитіл слід також узяти до уваги фенотипічну сумісність за відповідною групою системою.

7.10.2. АІГА з аутоантитілами холодного типу

Кров для аналізів має бути взята у пробірку, поміщену в хімічну склянку з водою температури 37 °С, і одразу ж перенесена у термостат із тією самою температурою. Після згущення крові слід відділити сироватку, а еритроцити тричі промити розчином NaCl температури 37 °С. Слід виконати такі аналізи:

- визначення групи крові АВ0 та антигену D за допомогою моноклональних реактивів;
- ПАГТ;
- визначення температурної амплітуди холодних аутоантитіл (аглютинінів).

7.10.2.1. Диференціація аутоантитіл холодного типу системи I: природні та клінічно важливі

Аутоантитіла холодного типу, що виявляють під час визначення груп крові АВ0, найчастіше мають специфічність за системою I. Попри те, що оптимальну активність вони демонструють при низьких температурах — у деяких людей вони, однак, дають про себе знати і при кімнатній температурі. Їхня присутність може бути пов'язана з перенесеною інфекцією. Ними також можуть супроводжуватися хвороби кровотворної системи, пов'язані з новоутвореннями; крім того, ці аутоантитіла можуть виявлятися при ідіопатичній АІГА холодного типу, що зветься хворобою холодних аглютинінів. Аутоантитіла холодного типу, які мають патологічне значення, зв'язують систему комплементу, мають високий титр і широку теплову амплітуду. Для підтвердження їх присутності слід провести паралельні аналізи у трьох температурах: 20 °С, 30 °С та 37 °С.

7.10.2.1.1. Спосіб дій

1. Приготувати 3% зависі аутологічних еритроцитів та стандартних еритроцитів групи 0 у розчині NaCl.
2. Підготувати 3 ряди пробірок (у кожному по 4 пробірки) для аналізів при трьох температурах.
3. У першу та другу пробірки кожного ряду помістити по 2 краплі аналізованої сироватки.
4. У третю і четверту пробірки кожного ряду помістити по одній краплі аналізованої сироватки та по одній краплі 30% розчину альбуміну в NaCl.
5. Два ряди пробірок перенести до термостатів із відповідними температурами (30 °С, 37 °С). Третій ряд залишити при кімнатній температурі. Біля пробірок із сироваткою у вищенаведених температурах помістити зависі підготовлених еритроцитів.
6. Через 10 хв. у першу і третю пробірки сироватки в кожному ряду додати по краплі 3% зависі аутологічних еритроцитів, а у другу і четверту — по краплі 3% зависі стандартних еритроцитів групи 0.
7. Перемішавши, вміст пробірок протягом 2 год. інкубувати у відповідних температурах.
8. Результати враховувати у макроскопічному режимі (візуально), легко струшуючи кожную пробірку. Запротоколювати інтенсивність аглютинації.
9. На підставі результатів аналізів при окремих температурах установити теплову амплітуду реакцій антитіл.

Важливими з клінічного боку визнаються аутоантитіла, що вступають у реакції в діапазоні температур 30–37 °С. У цих випадках для переливання підбирають кров, фенотипічно сумісну за системою Rh і антигеном K із системи Kell (після виключення наявності інших імунних антитіл).

Аутоантитіла, активні лише в низьких температурах (нижчих від 30 °С), не мають клінічного значення.

Якщо з'ясується, що виявлені аутоантитіла мають патологічний характер, рекомендується виконати такий аналіз:

- приготувати два ряди розведень аналізованої сироватки в розчині NaCl;
- до першого ряду додати такий самий об'єм 3–4% однойменних еритроцитів, завішених у розчині NaCl, а до другого — еритроцитів групи 0;
- залишити на годину при кімнатній температурі. Через годину врахувати результати.

Якщо титр з однойменними еритроцитами є значно вищим (більш ніж 2 розведення), ніж з еритроцитами групи 0, — це є підставою для рекомендації переливати КЕ групи 0.

7.10.3. Пароксизмальна холодова гемоглобінурія (ПХГ)

ПХГ характеризується наявністю у сироватці двофазових гемолізинів. Первинна ПХГ трапляється дуже рідко. Натомість гемолізینی минушого характеру досить часто виявляються у дітей під час вірусних та бактеріальних захворювань (наприклад, кір, вітряна віспа, свинка, грип, інфекційний монунолеоз). Двофазові гемолізینی найчастіше мають специфічність, спрямовану до поширеного антигену Р.

Нижчеописаний тест слід проводити, якщо у хворого спостерігаються симптоми гемолізу (гемоглобінурія, гемоглобінемія), але в сироватці аутоантитіл холодового типу не виявлено, а на еритроцитах присутній лише С3 (елюат з еритроцитів — негативний).

7.10.3.1. Підготовка матеріалу до аналізів

1. Кров хворого взяти в суху пробірку і перенести до інкубатора в температуру 37 °С. Після закінчення процесу згортання відцентрифугувати у такій самій температурі й сироватку перевести в окрему пробірку.
2. Зі свіжознятого зразка донорської крові відокремити сироватку, яка є джерелом комплекменту.
3. Приготувати 50% завись еритроцитів групи 0 у розчині NaCl.

7.10.3.2. Виконання аналізу

1. У 3-х рядах штатива для пробірок помістити по 3 пробірки і позначити їх, наприклад, А1, А2, А3 (перший ряд), Б1, Б2, Б3 (другий ряд), В1, В2, В3 (третій ряд).
2. Додати у першу і другу пробірку кожного ряду по 10 крапель сироватки хворого.

3. Додати у другу і третю пробірку кожного ряду по 10 крапель сироватки донора.
4. В усі пробірки додати по краплі зависі еритроцитів і перемішати.
5. Перенести 3 пробірки з першого і 3 пробірки з другого ряду в контейнер із льодом, що тоне (0 °С).
6. Три пробірки з третього ряду помістити в інкубатор, у температуру 37 °С.
7. Через 30 хв. 3 пробірки, позначені літерою А, із контейнера з льодом перенести в інкубатор, у температуру 37 °С.
8. Ще через годину відцентрифугувати всі пробірки й врахувати результати, спостерігаючи забарвлення супернатанту.

7.10.3.3. Інтерпретація результатів

Гемоліз у пробірках із сироваткою хворого, інкубованою спершу в температурі 0 °С, а потім у температурі 37 °С, вказує на присутність двофазових гемолізінів.

Гемоліз у пробірках із сироваткою хворого, інкубованою тільки в температурі 0 °С або тільки в температурі 37 °С, вказує на присутність однофазових гемолізінів, відповідно — холодого або теплового типу.

У пробірках, що містять тільки сироватку донора та еритроцити, гемоліз спостерігатися не повинен.

***УВАГА!** Оскільки в сироватці хворого на ПХГ часто виявляється зниження активності комплекменту, гемоліз у пробірці з додатком свіжої сироватки донора може бути значно сильнішим, ніж у пробірці, яка містить тільки сироватку хворого.*

7.11. Імуногематологічні аналізи, пов'язані з пересадкою кровотворних стовбурових клітин

Для всіх реципієнтів і донорів перед цією операцією треба:

1. Визначити групу крові за системою АВ0 та антигеном D із системи Rh; фенотип еритроцитів за антигенами систем Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS; а також антиген P₁.
2. Провести скринінг антитіл проти еритроцитів; у разі їх виявлення — визначити їхню специфічність.
3. Узяти в лікаря-куратора докладні дані щодо гемотерапії в минулому, а у випадку жінок — також відомості про перенесені вагітності.
4. Перед пересадкою підбирати кров, сумісну за фенотипом Rh та антигеном К.
5. Якщо реципієнт і донор пересадного матеріалу різняться за антигеном D (тобто реципієнт Rh-позитивний, а донор Rh-негативний, або реципієнт Rh-негативний, а донор Rh-позитивний) — у ранній період після пересадки підбирати Rh-негативну кров.

7.11.1. Як чинити у випадках несумісності за системою АВ0 між донором та реципієнтом

Розрізняють високу і низьку несумісність за системою АВ0 (табл. 7.8).

Таблиця 7.8

Несумісність за системою АВ0 між реципієнтом та донором стовбурових гемопоетичних клітин

Група крові		Різновид несумісності	Переливання у ранній період	
Реципієнт	Донор		КЕ	Плазма та КТ
0	А, В, АВ	Велика	Одноійменний з реципієнтом	Одноійменні з донором
А	АВ			
В	АВ			
АВ	0, А, В	Мала	Одноійменний з донором	Одноійменні з реципієнтом
А	0			
В	0			
А	В	Велика і мала	Група 0	Група АВ
В	А			

7.11.1.1. Висока несумісність за системою АВ0

Висока несумісність за системою АВ0 полягає у наявності в реципієнта антитіл анти-А та/або анти-В, спрямованих проти антигенів на еритроцитах донора. Крім вищезгаданих аналізів, перед пересадкою слід здійснити визначення титру антитіл системи АВ0, відповідальних за високу несумісність:

- у розчині NaCl при кімнатній температурі;
- застосовуючи ПАГТ (спершу знищивши антитіла IgM за допомогою 2ME або DTT).

УВАГА! Отримані результати необхідні трансплантологу для того, щоб удатися до необхідних процедур для обмеження руйнівної дії антитіл на еритроцити донора, які містяться в пересадному матеріалі.

У випадку високої несумісності після пересадки підбирають для переливання КЕ, однойменний за системою АВ0 із реципієнтом; до того часу, коли антиген реципієнта на еритроцитах не буде виявлятися, ПАГТ буде негативним, а в елюаті з еритроцитів та в сироватці не спостерігатиметься антитіл, спрямованих до антигенів на еритроцитах донора. Частоту цих аналізів визначає лікар-куратор.

Плазма і КТ, узяті для переливання, за АВ0 мають бути сумісні з донором.

7.11.1.2. Низька несумісність за системою АВ0

Низька несумісність — це наявність у сироватці донора антитіл анти-А та/або анти-В, спрямованих проти антигенів на еритроцитах реципієнта. Перед пересадкою згідно з розпорядженням лікаря-куратора визначають рівень антитіл системи АВ0 у донора пересадного матеріалу. З цією метою застосовують ті самі методики, про які йшлося у п. 7.11.1.1 (висока несумісність).

Для переливання підбирають КЕ, однойменний за системою АВ0 із донором; при цьому до того часу, коли антигени реципієнта на еритроцитах уже не будуть виявлятися, еритроцити для переливання повинні бути максимально позбавлені плазми.

Плазма і КТ, призначені для переливання, мають походити з крові, однойменної з реципієнтом. Переливання цих компонентів, сумісних за системою АВ0 із донором, можна розпочати лише тоді, коли на еритроцитах хворого вже не спостерігатимуться його первинні антигени.

Пошук антигенів реципієнта на еритроцитах здійснюють методом безпосередньої аглютинації, за допомогою моноклональних антитіл, пробірковою або мікроколунковою методиками.

7.11.1.3. Водночас висока і низька несумісність за системою АВ0

Вона виявляється тоді, коли в реципієнта є антитіла, спрямовані до антигену на еритроцитах донора, а в донора — антитіла до антигенів на еритроцитах реципієнта. У таких випадках перед здійсненням пересадки рекомендується виконати всі аналізи, згадані в описах високої та низької несумісностей.

Для переливань слід брати КЕ групи 0.

Плазма і КТ, призначені для переливання, мають походити від донорів групи АВ.

Рекомендується також діяти саме так з моменту початку підготовки реципієнта до пересадки стовбурових клітин (рис. 7.3).

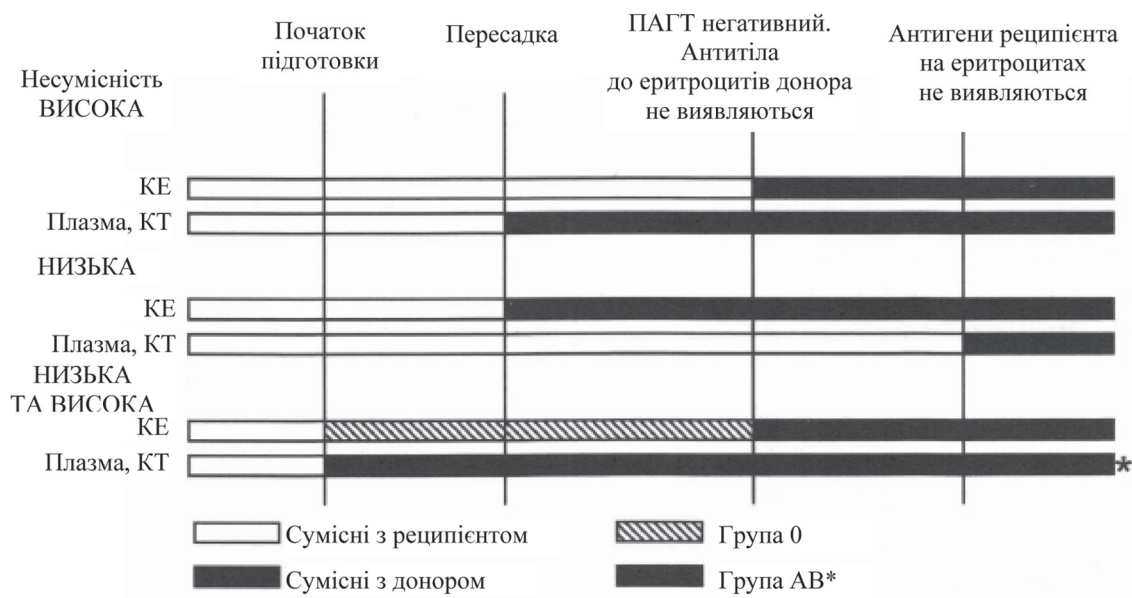


Рис 7.3. Трансфузії компонентів крові для реципієнта пересадки кровотворних стовбурових клітин, несумісних за системою АВ0

7.11.2. Гемолітичні реакції у хворих із пересадженими стовбуровими клітинами

Гемоліз під час інфузії препарату стовбурових клітин є явищем винятковим; це може статися тоді, коли не було вжито заходів для обмеження дії антитіл системи АВ0 на еритроцити донора. Вважається, що ризику гемолізу нема, якщо титр антитіл не перевищує 16. Низька несумісність не призводить до гемолізу під час операції пересадки.

7.11.2.1. Гемолітична реакція у випадку високої несумісності

Клінічні симптоми гемолітичної реакції (яка є явищем рідкісним) виникають найчастіше між 37 та 105 днем після пересадки. Ця реакція спостерігається впродовж 10–94 днів. Вона є наслідком збереження в організмі лімфоцитів, які виробляють антитіла системи АВ0.

У цьому випадку слід виконати такі аналізи:

- ПАГТ;
- пошук антитіл анти-А та/або анти-В у сироватці та в елюаті з еритроцитів.

Отримані позитивні результати підтверджують клінічно виражену гемолітичну реакцію. Доки вона не пройде, слід підбирати КЕ групи 0.

7.11.2.2. Гемолітична реакція у випадку низької несумісності

Ця реакція відносно часто виявляється у хворих, яких лікують циклоспорином, не даючи їм метотрексату. Кожен хворий із цієї групи обтяжений ризиком гемолітичної реакції, яка найчастіше з'являється через кілька чи кільканадцять днів після пересадки. Відтак, необхідно здійснювати періодичні контрольні аналізи на предмет наявності антитіл системи АВ0, що їх виробляють пересаджені лімфоцити (англ. passenger lymphocytes) донора, які й спричиняють гемоліз у реципієнта. Ці аналізи охоплюють:

- пошук антитіл системи АВ0 у сироватці;
- виконання ПАГТ, а також пошук антитіл системи АВ0 в елюаті з еритроцитів.

Перший контрольний аналіз має бути зроблено на 5 день після пересадки. Аналізи слід повторювати кожні кілька днів упродовж кількох тижнів. Позитивні результати можуть випереджати клінічні симптоми гемолізу. Слід у таких випадках підбирати КЕ групи 0 — до того часу, коли еритроцити хворого заміняться еритроцитами донора.

Слід підкреслити, що в рідкісних випадках у кровообігу хворого можуть з'явитися імунні антитіла з інших (не АВ0) групових систем. Їх виробляють або лімфоцити В реципієнта, що збереглися, або перенесені разом із пересадним матеріалом лімфоцити донора. Результати фенотипічних аналізів

реципієнта і донора до пересадки можуть полегшити ідентифікацію цих антитіл. У таких випадках слід підбирати КЕ, який не містить антигену, що відповідає виявленим антитілам.

У реципієнтів цільних органів часто виникають гемолітичні реакції внаслідок низької несумісності та перенесення імунокомпетентних лімфоцитів донора, які виробляють алоантитіла, спрямовані до антигенів, що виявляються на еритроцитах реципієнта. Такі реакції виникають найчастіше після пересадки легень, печінки, рідше — нирки. АІГА, що деколи спостерігається, також є наслідком перенесення лімфоцитів донора. Реакція внаслідок високої несумісності належить до винятків, оскільки, як правило, для пересадки беруть органи, сумісні за системою АВ0.

7.11.2.3. Аутоімунна гемолітична анемія

Цей синдром виявляє себе через кілька, навіть через кільканадцять місяців після пересадки. Він виступає як АІГА з аутоантитілами холодового типу класу IgM або теплового — класу IgG. Принципи аналізу — такі самі, як описано вище.

7.11.2.4. Виявлення двох популяцій еритроцитів

Виявлення, що еритроцити хворого мають фенотип, ідентичний з фенотипом донора, служить за доказ того, що пересадний матеріал прижився. Це так званий абсолютний химеризм. Наявність двох популяцій еритроцитів, які різняться в антигенах і виявляють себе в реакції з відповідним діагностичним реактивом як аглютинати на фоні однорідної зависі, свідчить про частковий химеризм.

7.12. Принципи постійної документації результатів аналізів груп крові (внесення запису до документів, що посвідчують особу, та до книг реєстру медичних послуг)

Метою постійного обліку результатів аналізів груп крові є полегшення гемотерапії, особливо в екстрених випадках, що стосуються як окремих людей, так і великих груп населення під час масових катастроф, стихійних лих тощо. У зв'язку з тим постійні записи мають бути достовірними й базуватися на результатах аналізів, які є обов'язковими для реципієнтів крові. Ці аналізи охоплюють:

- визначення групи крові за системою АВ0;
- визначення антигена D системи Rh;
- скринінг сироватки на наявність імунних антитіл;
- встановлення специфічності виявлених імунних антитіл, а також «природних» антитіл імунного характеру.

Запис визначених груп крові до документів може робитися тільки на підставі ідентичних результатів, отриманих з аналізу двох незалежно один від одного взятих зразків крові. Два зразки крові можуть бути взяті в один і той самий день — за умови, що кожне взяття відбувалося в окремому приміщенні й обслуговувалося різними колективами людей, які брали кров і документували взяті зразки. У цих випадках скринінг імунних антитіл роблять на матеріалі одного зразка крові. Якщо в ньому буде виявлено антитіла — треба буде підтвердити їх наявність і в другому зразку, після чого встановити їх специфічність.

Нагляд над цими аналізами, так само як і над їх документуванням, можуть здійснювати тільки лабораторні діагности, які пройшли навчання у ЗСК й мають посвідчення, що дають право робити записи результатів аналізів в особових документах (Зразок №7.11); такі посвідчення видає головний лікар закладу служби крові. Регіональний ЗСК зобов'язаний вести реєстр уповноважених осіб.

Записи про групу крові можна робити:

- на підставі двох незалежних результатів із лабораторії, в якій робиться запис (обов'язково зазначити два номери і дві дати аналізів);
- на підставі двох оригінальних результатів із різних лабораторій (обов'язково зазначити два номери і дві дати аналізів, а також вказати у книзі постійного обліку, з якої лабораторії надійшли результати аналізів).

У разі виявлення імунних антитіл слід неодмінно зазначити їхню специфічність у рубриці «Примітки». Якщо результати аналізів стосуються зразків крові, взятих у різний час, може виявитися,

що антитіла виявлено лише в одному з них. У цьому випадку запис про специфічні імунні антитіла роблять на підставі результату аналізу того зразка крові, в якому вони виявлені.

УВАГА!

- А. Заклади служби крові можуть видавати картки груп крові на підставі документації, яка узгоджується з принципами постійного обліку.*
- Б. Усі задокументовані відомості про наявність імунних антитіл у минулому (незважаючи на невиявлення їх в останніх аналізах, на підставі яких робиться запис) мають також бути внесені в особовий документ або у Книгу реєстру медичних послуг.*
- В. Такі самі принципи запису є обов'язковими також у разі виявлення «природних» антитіл імунного характеру.*

Зразок №7.11

**ПОСВІДЧЕННЯ, ЩО ДАЄ ПРАВО
РОБИТИ ЗАПИСИ ПРО ГРУПУ КРОВІ В ОСОБОВИХ ДОКУМЕНТАХ**

печатка
ЗСК

ПОСВІДЧЕННЯ

Посвідчую, що (ПІБ) _____

який(а) працює у _____

на посаді _____

уповноважений(а) здійснювати визначення груп крові та робити записи про це в особових та інших документах для цілей постійного обліку.

печатка та підпис головного лікаря закладу служби крові _____

7.12.1. Спосіб ведення постійної документації груп крові

- 1. Записати у книгу постійного обліку (Зразок №7.11) усі дані за окремими рубриками.
- 2. На прокресленій сторінці документа вмістити штамп стандартної величини, згідно зі зразком №7.12.

- 3. У графі «Група крові» вмістити штамп відповідних розмірів, наприклад:

0 RhD + (плюс)
або

0 RhD + (позитивний)

AB RhD – (мінус)
або

AB RhD – (негативний)

- 4. У графі «Примітки» зазначити специфічність імунних антитіл (якщо вони виявлені).
- 5. У наступній графі зазначити два номери аналізів, а через скісну риску — дати їх виконання, наприклад:

148 / 02.07.2001

395 / 19.03.2003

7. З лівого боку останньої граfi зазначити номер запису з книги постійного обліку, а з правого боку тієї самої граfi вмістити тонку й розбірливу печатку і підпис особи, відповідальної за внесення запису.

УВАГА!

- А. У випадках виявлення рідкісного різновиду антигену системи АВ0 або Rh слід зробити запис, використовуючи загальноприйняті позначки. У граfi «Зауваги» робиться примітка «Нетиповий як реципієнт крові».*
- Б. Людям, у яких виявлено рідкісний різновид групи крові або імунні антитіла, треба додатково видавати детальний результат аналізу. У ньому слід характеризувати різновид групового антигену, виявлені імунні антитіла, а також фенотип еритроцитів за тією груповою системою, до якої ці антитіла віднесено. Слід також навести відомості, яку саме кров треба брати для переливання. Людину потрібно повідомити про необхідність зберігання цього результату аналізу разом із документом постійного обліку груп крові.*
- В. Результат аналізу групи крові може бути переписаний з одного документа до іншого виключно особою, яка має повноваження (про це йшлося вище). Якщо буде виявлено неточності в записі (наприклад, відсутність одного з номерів аналізів), слід узяти зразок крові й провести контрольні аналізи.*
- Г. Для донорів книгу постійного обліку можна замінити комп'ютерною базою даних.*

Зразок №7.12

КНИГА ПОСТІЙНОГО ОБЛІКУ

№	Дати аналізів	Номери аналізів	Ім'я та прізвище аналізованого	Номер особового документа	Дата народження	Група крові		Дата запису результату аналізу в особовому документі	Примітки	Підпис особи, відповідальної за запис результату аналізу в особових документах
						АВ0	Rh			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Зразок №7.13

ЗРАЗОК ПЕЧАТКИ ПОСТІЙНОГО ОБЛІКУ

(7 см × 5 см)

Назва закладу

Група крові

Примітки

№ / дата аналізу

№ / дата аналізу

х

хх

х — № запису / дата запису

хх — печатка і підпис особи, відповідальної за запис

7.13. Серологічний контроль якості реактивів, узятої крові та її компонентів

Ці аналізи виконують у лабораторії серологічного контролю, яка входить до складу відділу контролю якості. Усі аналізи мають відповідним чином документуватися і протоколюватися.

7.13.1. Контроль діагностичних реактивів для аналізів груп крові

Перш ніж ухвалювати рішення про закупівлю діагностичних реактивів для аналізів груп крові, рекомендується запросити у виробника зразки, проаналізувати специфічність та активність реактивів та перевірити, чи відомості щодо випробувань, надані виробником, узгоджуються з результатами власних аналізів і чи відповідають нормам, наведеним у пп. 7.13.1.2 та 7.13.1.3.

Лабораторія зобов'язана вести книгу аналізів діагностичних реактивів, яка має містити документацію і протоколи аналізів, а також остаточну оцінку реактиву. Кожна серія діагностичного реактиву має підлягати оцінюванню за такими параметрами:

- зовнішній вигляд: відсутність помутніння, осаду;
- активність та специфічність антитіл: чіткі реакції (позитивні та негативні) з відповідно підібраними еритроцитами.

***УВАГА!** Вищеописаний контроль якості стосується ручних методів. Якщо реактиви призначені для аналізів мікроколунковим методом або за допомогою автомата, то вимоги щодо контролю якості встановлює виробник.*

7.13.1.2. Контроль реактивів для аналізу антигенів системи АВ0

Активність та специфічність: відсутність неспецифічної аглютинації («монетні» стовпчики) та явища прозони; чіткі реакції з антигенами послабленої експресії (наприклад, A_2); відсутність хибних реакцій (контроль з еритроцитами групи 0).

Сила: моноклональні реактиви: приготувати завись еритроцитів згідно з рекомендаціями виробника; аглютинація має з'явитися через 10 сек., а через 3 хвилини сягнути інтенсивності від 3+ до 4+.

Мінімальний титр:

Моноклональні реактиви анти-А

Стандартні еритроцити	A_1	A_2
Тест на площині	32	16
Тест у пробірках	128	64

Моноклональні реактиви анти-В

Стандартні еритроцити	В	A_2B
Тест на площині	32	16
Тест у пробірках	128	64

***УВАГА!** При аналізах титру анти-В замість «старих» (10-денних) еритроцитів В можна застосовувати еритроцити A_2B , оскільки експресія В у них слабша.*

7.13.1.3. Контроль реактивів для аналізу антигену D системи Rh

Аналіз активності та специфічності: так само, як і з реактивами для системи АВ0.

Сила: при кожному із застосовуваних методів, коли мине стандартний для них час реакції, аглютинація з еритроцитами гетерозигот має сягнути інтенсивності від 3+ до 4+.

Титр моноклональних реактивів IgM

Тест на площині	32
Тест у пробірках	64

***УВАГА!** Титр слід аналізувати щодо еритроцитів із гетерозиготною експресією антигенів.*

7.13.1.4. Контроль реактивів для аналізу інших антигенів системи Rh

Специфічність, реактивність та силу аналізують так само, як і у випадку реактивів анти-D.

Титр: у тесті на площині й пробірковому тесті — не нижче від (1:16).

7.13.1.5. Контроль діагностичних реактивів для аналізу антигенів інших групових систем

Реактиви мають проходити аналізи за тими методиками, що їх рекомендує виробник.

Обов'язковими є аналізи специфічності, активності та сили щодо еритроцитів гетерозигот. Якщо виробник зазначив титр реактиву, слід його перевірити.

7.13.1.6. Контроль полівалентного антиглобулінового реактиву (анти-IgG + анти-C3d)

Специфічність: відсутність аглютинації і гемолізу еритроцитів усіх груп системи АВ0 у класичному антиглобуліновому тесті та НАГТ-LISS після інкубації із сироваткою, яка не містить імунних антитіл.

Активність:

а) аглютинація, що оцінюється не вище ніж 2+, з еритроцитами, сенсibilізованими Стандартом анти-D;

б) інтенсивність аглютинації еритроцитів, сенсibilізованих антитілами, які зв'язують компонент (наприклад, анти-Jка), у двоступеневому антиглобуліновому тесті — більша, ніж у класичному антиглобуліновому тесті та НАГТ-LISS.

7.13.1.7. Спосіб дій після оцінки фірмових діагностичних реактивів

1. До імпортованих реактивів кожної перевіреної серії слід долучити інструкцію з використання, складену українською мовою.

2. Якщо в ході користування реактивом з'являються якісь сумніви, а строк його придатності ще не минув, слід здійснити повторний контроль реактиву та, можливо, подати скаргу виробникові.

7.13.2. Контроль розчинів, що застосовуються в аналізах

7.13.2.1. Розчин NaCl

Розчин містить 9 г NaCl на літр дистильованої або деіонізованої води; рН розчину має становити 6,6–7,6. Якщо рН виходить за ці межі, то слід довести його до відповідного значення за допомогою фосфатного буфера.

7.13.2.2. Розчин LISS

Оптимальний рН розчину становить 6,7 (допустимі межі — 6,5–7,0). Якщо рН виходить за ці межі, то слід довести його до відповідного значення за допомогою HCl або NaOH.

7.13.2.3. Папаїновий реактив

Реактивність:

– додавання реактиву до зависі еритроцитів у розчині NaCl не повинне спричинити їх аглютинацію або гемоліз;

– додавання реактиву до зависі еритроцитів у розчині NaCl, до якої вже додано такий самий об'єм сироватки, що не містить антитіл, — не повинне спричинити ні аглютинацію, ні гемоліз;

– додавання реактиву до зависі еритроцитів у розчині NaCl, до якої вже додано такий самий об'єм Стандарту анти-D, повинне спричинити їх аглютинацію.

7.13.3. Серологічний контроль узяті крові

Серологічний контроль усіх компонентів крові, в тому числі й узятих методом аферезу плазми, КТ та концентрату гранулоцитів, рекомендується виконувати автоматичним методом, користуючись зразком крові, взятим із цією метою у пробірку з EDTA; пробірка має бути позначена кодом донатора. Зразок крові слід брати в той самий час, коли береться й зразок для діагностики інфекційних агентів. Аналіз проводять із реактивами анти-A, анти-B і анти-D. Для контролю плазми реактив анти-D не застосовується. Якщо серологічний контроль здійснюють мануальним методом — аналізи можна робити із сегмента дренажної трубки або з пробірки.

Серологічний контроль повинна здійснювати група працівників, що складається з 2-х осіб, які мають певну кваліфікацію; працівників визначає керівник відділу трансфузійної імунології. Якщо

результати контрольного аналізу одразу ж уводяться в комп'ютер, оснащений системою блокування помилкового результату, то контрольні аналізи може виконувати й розпізнавати одна особа. Під час проведення контролю слід точно дотримуватися встановленого порядку дій — це мінімізує ризики технічних помилок та огріхів, особливо тих, що спричинені монотонністю роботи й відверненням уваги людини, яка виконує аналіз.

Для контролю слід застосовувати моноклональні реактиви анти-А, анти-В і анти-D. Рекомендується такий порядок дій:

1. У книгу серологічного контролю переписати номер донорії з етикетки контейнера, який містить узятую кров. Рекомендується вклеювати самоклеючі етикетки з номером донорії.
2. У верхній частині пластинки зазначити символи реактивів (анти-А, анти-В, анти-D), а з лівого боку — номер донорії.
3. Помістити на пластинку по краплі відповідних реактивів (згідно з їх зазначеними символами).
4. З дренажної трубки або з пробірки перенести на пластинку по краплі аналізованої крові.
5. Змішати реагенти, почекати 3 хвилини; врахувати результати й запротоколювати їх у книзі.
6. Перевіривши відповідність результатів і всієї документації, наклеїти заповнені етикетки серологічного контролю (Зразок №7.15) на контейнер із кров'ю та на всі порожні супутні контейнери. На етикетках розмістити підпис або кодовий номер особи-контролера.
7. Усі сегменти дренажної трубки позначити номером донорії та результатом аналізу групи крові (AB0 та Rh) згідно з основною етикеткою.

Якщо серологічний контроль плазми, взятої методом плазмаферезу, та КТ, отриманого шляхом аферезу, роблять із дренажної трубки, то аналіз проводять зі стандартними еритроцитами 0, А1, В.

Концентрат гранулоцитів має перевірятися з реактивами анти-А, анти-В і анти-D, оскільки містить значну домішку еритроцитів. Аналіз на пластинці виконується так само, як і аналіз антитіл анти-А і анти-В у сироватці під час визначання груп крові АВ0.

Плазма, отримана з цільної крові в закритій системі, такому контролю не підлягає. Обов'язково слід ретельно перевірити ідентичність записів на основній етикетці і на етикетці контейнера з плазмою, перш ніж від'єднувати його від маточного контейнера.

УВАГА!

- А. Якщо запротоколювані аналізи та отримані результати безпосередньо реєструються в комп'ютері — книги серологічного контролю можна не вести.
- Б. У випадку певинного донора головна етикетка має бути приклеєна на контейнер тільки після аналізів двох зразків крові донора в серологічній лабораторії.
- В. Якщо контроль здійснюється з КЕ, контейнер із плазмою можна відокремити лише після того, як він буде позначений етикеткою серологічного контролю.
- Г. Якщо серологічний контроль здійснюється автоматичним методом, то слід діяти згідно з рекомендаціями виробника.
- Ґ. Серологічний контроль може здійснюватися безпосередньо після взяття крові або ж пізніше (наприклад, у випадку крові, що береться виїзними бригадами або в територіальних відділеннях).
- Д. Якщо серологічний контроль здійснюється автоматичним методом згідно зі Стандартом етикетування ISBT 128, можна відмовитися від наклеювання етикеток серологічного контролю на контейнери з кров'ю й на порожні супутні контейнери.

Зразок №7.15

ЗРАЗОК ЕТИКЕТКИ СЕРОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ

штрих-код 55-00-55555	Група крові		Підпис серол. контр.
	AB0	Rh	

7.13.4. Контроль якості у лабораторії трансфузійної імунології

Процедури контролю якості поділяються на контроль обладнання, реактивів та здійснюваних аналізів. Ця класифікація доволі чітка, хоч деякі контрольні дії й дублюють одна одну. Особливо це стосується контролю реактивів і техніки аналізу.

7.13.4.1. Контроль якості устаткування

Регулярний контроль стосується особливо центрифуг, апаратури для автоматичного промивання еритроцитів, «водяних бань», холодильників та морозильних камер. Автомати для аналізу груп крові підлягають систематичному контролю згідно з інструкцією виробника.

7.13.4.2. Контроль якості реактивів

Рекомендовані процедури стосуються реактивів, що застосовуються головним чином для аналізів, здійснюваних вручну. Реактиви, що застосовуються в інших методиках, зокрема в автоматичних, підлягають спеціальному, більш детальному контролю якості, сферу якого зазвичай окреслює виробник устаткування.

7.13.4.3. Контроль якості методики аналізів

Якщо якість обладнання та реактивів відповідає вимогам, то хибні результати є наслідком недосконалої методики (застосування невідповідного методу) або, що трапляється частіше, — наслідком «робочої помилки», яка полягає в не досить ретельному проведенні аналізу або у неправильній оцінці результату.

7.13.4.4. Контроль якості праці

Контроль якості праці охоплює:

- внутрішній контроль, що стосується працівників ЗСК;
- зовнішній контроль, що стосується лабораторій лікарень та інших лабораторій, які виконують аналізи у сфері трансфузійної серології.

7.13.4.4.1. Внутрішній контроль

Кожен працівник, який виконує аналізи і працює в лабораторіях відділу трансфузійної імунології, а також працівник, який виконує аналізи у лабораторії трансфузійної серології, підлягає періодичному контролю, що його — не рідше ніж двічі на рік — здійснює керівник лабораторії. Керівник лабораторії готує зразки крові для аналізів і оцінює отримані результати.

7.13.4.4.2. Зовнішній контроль

Зовнішньому контролю підлягають усі лабораторії, що виконують аналізи у сфері трансфузійної серології.

7.13.4.4.3. Підготовка контрольного матеріалу

1. Як контрольний матеріал приготувати відповідні кількості плазми або сироваток зі слабкорегуючими антитілами (із титром 1:4 або нижчим).
2. Одним із контрольних зразків має бути сироватка або плазма, що не містить антитіл.
3. Окремі контрольні реактиви розлити по ампулках (приблизно по 2 мл), позначених кодовими номерами, та зберігати при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
4. Контрольний матеріал перед відсиленням має бути стандартизовано.
5. До контрольних зразків, призначених до відсилення, долучити бланки з протоколами аналізів і супровідний лист із детальною інструкцією щодо способу дій та документування результатів, а також терміном передачі їх до закладу служби крові.

УВАГА!

А. Контрольним матеріалом може бути плазма донорів, у яких виявлено антитіла, або ж відповідною мірою розведена плазма імунізованих людей. Для розведення слід застосовувати відповідну сироватку або плазму.

Б. Контрольним зразком також може бути плазма, яка містить антитіла з більш високим титром (наприклад, 1:32). У такому випадку слід дати завдання на визначення титру антитіл із докладною документацією результатів.

7.13.4.4.4. Завдання для контрольованої лабораторії

Керівник лабораторії визначає особу (осіб), якій (яким) доручає виконати аналізи контрольного матеріалу. Аналізи охоплюють:

- виявлення антитіл за допомогою всіх тестів, які повсякденно застосовуються в цій лабораторії (ензимний тест LEN, НАГТ-LISS, класичний НАГТ, NaCl, колонкові тести), із застосуванням набору стандартних еритроцитів;
- визначення титру антитіл за допомогою відповідних тестів;
- докладне протоколювання всіх виконаних аналізів з урахуванням інтенсивності аглютинації (від +сл. до 4+).

Протокол аналізу повинен містити такі дані:

- назву контрольованої лабораторії;
- дату аналізу;
- дату одержання контрольного зразка;
- кодовий номер зразка;
- номери еритроцитів, що використовувались в аналізах, та номери серій реактивів.

7.13.4.4.5. Завдання для закладу служби крові, який здійснює контроль

Після отримання всіх протоколів слід проаналізувати результати та скласти документ зіставлення всіх лабораторій, які взяли участь у проведеному контролі. На цій підставі ЗСК ухвалює рішення про необхідність додаткових навчань для працівників або вдається до кроків, спрямованих на призупинення діяльності даної лабораторії.

7.14. Принципи імунізації донорів крові

Спланована імунізація донорів крові здійснюється з метою отримання плазми для виготовлення імуноглобуліну анти-D, що застосовується для профілактики конфлікту за системою Rh, а також імуноглобуліну анти-HBs, що застосовується для профілактики зараження HBV (гепатитом В).

7.14.1. Вказівки щодо лікарських висновків про допустимість імунізації з метою одержання медичних імунобіологічних препаратів

Ці вказівки містяться у наказі МОЗ України від 02.06.2005 р. №247 «Про затвердження документів з питань контролю якості препаратів крові»

Заклад служби крові зобов'язаний зберігати документацію, пов'язану з імунізацією, протягом 30 років.

Платня донорам еритроцитів, які дають згоду на імунізацію та потім здають кров або плазму для виробництва препаратів, регулюється чинним законодавством.

7.14.2. Принципи взяття крові для імунізації

У процедурах імунізації слід керуватися такими принципами:

- процедури імунізації і взяття зразків крові мають здійснюватися в окремому приміщенні, в якому має бути й набір для реанімації;
- донори під час імунізації еритроцитами не можуть здавати кров для лікувальних цілей;
- з моменту появи у їхній сироватці імунних антитіл цей факт слід занотувати в посвідченні (Зразок №7.16).

Кров для імунізації беруть у постійних донорів групи 0 RhD+. Донор перед кожною здачею крові на імунізацію має пройти лікарське обстеження та лабораторні аналізи — в тому самому обсязі,

як і донор, який здає кров для лікувальних цілей. Необхідно зробити йому аналізи на РНК HCV, ДНК HBV, ДНК ВІЛ, а також на генетичний матеріал парвовірусу В19. Якщо виконати ці аналізи немає змоги, слід надіслати зразок крові до установ або закладів, де є відповідні акредитовані лабораторії молекулярної біології.

Кров, взята для імунізації, має пройти 6-місячний термін карантинізації (у замороженому стані). Під кінець періоду карантинізації слід провести в донора контроль вірусних маркерів, застосовуючи імуноензимні тести та методи молекулярної біології.

Як зберігати і розморожувати призначену для імунізації кров — описано у п. 6.2.9.11.

Зразок №7.16

**ПОСВІДЧЕННЯ ДОНОРА,
ЯКИЙ ПРОЙШОВ ІМУНІЗАЦІЮ КРОВ'Ю**

Перша сторінка обкладинки:

<p style="text-align: center;">ПОСВІДЧЕННЯ</p> <p style="text-align: center;">ДОНОР, ЯКИЙ ПРОХОДИТЬ ІМУНІЗАЦІЮ КРОВ'Ю</p> <p>Видане _____ _____ _____</p> <p>№ _____</p> <p>УВАГА! Це посвідчення слід завжди носити із собою та пред'являти під час кожного відвідування лікаря</p>

Друга сторінка обкладинки:

<p style="text-align: center;">Група крові</p> <p>фотокартка _____</p> <p>Підпис власника _____</p> <p>У сироватці наявні імунні антитіла: анти- _____ _____</p> <p>дата і підпис керівника серологічної лабораторії</p> <p>УВАГА! У разі необхідності трансфузії кров слід підбирати у регіональному закладі служби крові</p>

Дані щодо взяття плазми або крові

Порядковий номер	Дата взяття	Кількість узятої плазми/крові	Термін наступного взяття	Примітки	Підпис та печатка лікаря, який керував донацією

7.14.3. Спланована імунізація з метою отримання антитіл анти-D

Імунізація нових донорів-добровольців — справа необхідна, оскільки інших джерел отримання антитіл анти-D, які служать для виробництва імуноглобуліну анти-D, немає. Досі не вдалося отримати моноклональних антитіл анти-D, які можна було б застосовувати для профілактики конфлікту RhD.

Імунізацію проходять вибрані донори Rh₀(D)- (dcsee), незалежно від їх групи крові за системою АВ0.

Для виклику і стимуляції імунної відповіді, результатом якої є антитіла анти-D, найкраще використовувати еритроцити фенотипу DccEE з огляду на значну імуногенність антигену D таких еритроцитів. Можна застосовувати Rh-позитивні еритроцити й інших фенотипів.

Еритроцити, що служать для імунізації, мають бути сумісні з еритроцитами імунізованого донора за антигенами інших групових систем, відомих своєю імуногенністю, тобто K, Fy^a, Jk^a, S.

Подача еритроцитів має відбуватися повільно, шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Після кожної маніпуляції донор повинен залишатися в ЗСК під наглядом медичного персоналу приблизно 1 годину.

Існує кілька дозволених схем імунізації: вони різняться між собою кількістю еритроцитів, що вводяться, кількістю ін'єкцій і тривалістю перерв між ними.

7.14.3.1. Схеми внутрішньовенної імунізації

Схеми імунізації базуються на вказівках Всесвітньої організації охорони здоров'я, дослідів ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України», а також деяких закладів служби крові.

7.14.3.1.1. Виклик первинної імунної відповіді

Схема 1

Перша доза: 5 мл еритроцитів.

Через 1 місяць — контроль антитіл.

Через 3 місяці після ін'єкції — контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, друга доза 2 мл еритроцитів.

Через 1 місяць: контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, 3 дози по 2 мл еритроцитів із двотижневим інтервалом, із необхідним контролем антитіл перед кожною ін'єкцією.

Через 1 місяць після останньої ін'єкції — контроль антитіл.

Через 3 місяці після останньої ін'єкції — контроль антитіл.

Якщо за цей період донор не виробить антитіл, від подальшої імунізації слід відмовитись. Із цього моменту донор може здавати кров для лікувальних цілей, за умови контролю наявності антитіл перед кожною здачею крові або плазми протягом року.

Схема 2

Перша доза: 5 мл еритроцитів.

Через 1 місяць — контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, друга доза — 2 мл еритроцитів.

Через 1 місяць — контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, третя доза — 2 мл еритроцитів.

Через 1 місяць — контроль антитіл.

Через 1 місяць — контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, від подальшої імунізації слід відмовитись (див. схему 1).

Схема 3

Перша доза: 5 мл еритроцитів.

Через 2 тижні: друга доза — 2 мл еритроцитів.

Через 2 тижні: контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, третя доза — 2 мл еритроцитів.

Через 2 тижні: контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, четверта доза — 2 мл еритроцитів.

Через 2 тижні: контроль антитіл.

Через 2 тижні: контроль антитіл.

Через 3 місяці після останньої ін'єкції — контроль антитіл.

Якщо за цей період донор не виробить антитіл, від подальшої імунізації слід відмовитись (див. схему 1).

Схема 4

Перша доза: 10 мл еритроцитів.

Через 2 тижні: контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, друга доза — 5 мл еритроцитів.

Через 2 тижні: контроль антитіл; якщо антитіла відсутні, третя доза — 2 мл еритроцитів.

Через 2 тижні: контроль антитіл.

Через 2 тижні: контроль антитіл.

Через 3 місяці після останньої ін'єкції — контроль антитіл.

Якщо за цей період донор не виробить антитіл, від подальшої імунізації слід відмовитись (див. схему 1).

Усі контрольні аналізи на предмет наявності антитіл анти-D протягом першого циклу імунізації слід робити за допомогою найчутливіших методів (тест із папаїнізованими еритроцитами, ензимний тест LEN, колонковий ензимний тест).

УВАГА!

- А. Досліди багатьох ЗСК свідчать: якщо для імунізації застосовуються еритроцити, що зберігалися в замороженому стані, імунізація за схемою, встановленою для свіжих еритроцитів, не відповідає очікуванням стосовно виклику первинної імунної відповіді.*
- Б. Відомо, що в ході розморожування еритроцити піддаються частковим механічним пошкодженням, а це скорочує тривалість їхнього життя у кровообігу реципієнта, отже, й тривалість антигенної стимуляції та її інтенсивність.*
- В. З огляду на вищенаведені факти, є доцільним модифікувати схему першого циклу імунізації; зміни мають полягати у скороченні інтервалів між окремими дозами або у збільшенні початкових доз.*
- Г. Розпочинати імунізацію доцільно з якомога більшою групою донорів-добровольців, оскільки потрібного результату вдасться досягти лише з 50–60% із них (найімовірніше).*

7.14.3.1.2. Стимуляція вторинної імунної відповіді

Якщо впродовж першого циклу імунізації той чи інший контрольний аналіз виявить присутність антитіл анти-D, від схеми виклику першої імунної відповіді слід відійти, а натомість через 2 тижні після останньої ін'єкції дати ще 2 мл еритроцитів (стимуляція вторинної імунної відповіді). У більшості імунізованих людей уже через 2 тижні після цієї ін'єкції можна, здійснивши контроль, брати першу плазму методом плазмаферезу.

Дії щодо плазми, заготовленої від імунних донорів:

1. Плазму, що береться, слід систематично піддавати контролю (півкількісний аналіз антитіл у титрі).
2. Придатність плазми для виготовлення імуноглобуліну анти-D слід оцінювати на підставі титру антитіл анти-D в антиглобуліновому тесті, виконаному пробірковим методом. Цей титр не повинен бути нижчим ніж 1:256, якщо тільки вимоги виробника не є іншими.
3. Якщо титр антитіл знижується, слід застосовувати подальшу стимуляцію дозами по 1 мл еритроцитів. Інтервали між ін'єкціями мають становити не менш ніж 3 місяці.

УВАГА!

А. На етикетці взятої плазми, окрім відомостей, згаданих у п. 6.2.20.4.1, має бути також зазначено: «Антитіла анти-D, титр ...».

Б. Донори, які систематично піддаються антигенній стимуляції еритроцитами, раз на рік мають проходити контроль на предмет наявності додаткових антитіл; контроль здійснюється з використанням відповідно до підібраного набору Rh₀D)-негативних еритроцитів, які походять від гомозиготних за різними груповими системами донорів.

7.14.3.2. Документація щодо імунізації донорів

Документація стосовно кожного імунізованого донора має вестися окремо, наприклад, у вигляді теки / скорозшивача. Така тека має містити:

- персональні дані;
- заяву, підписану донором;
- лікарське направлення донора на імунізацію;
- протоколи початкових серологічних аналізів, за результатами яких донора кваліфіковано до імунізації відповідними еритроцитами (донорові дозволено проходити імунізацію відповідними еритроцитами);
- результати контрольних аналізів на вірусні інфекції;
- протоколи всіх маніпуляцій із зазначеними датами, різновидом процедур, кількістю введеної крові (ім'я та прізвище людини, якій належить введена кров);
- коментар щодо самопочуття донора після маніпуляцій;
- протоколи контрольних серологічних аналізів і терміни наступних ін'єкцій крові.

Відповідні примітки щодо імунізації мають бути вміщені й у головній картотеці донора.

Там мають бути такі відомості, як дата початку імунізації, дата кваліфікації на плазмаферез, дата відмови від подальшої імунізації, обов'язковий період контрольних аналізів.