

УДК 612.111-612.398-08

ПОДБОР ТИТРА ЦОЛИКЛОНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИДКОЙ КРОВИ ПРЯМОЙ РЕАКЦИЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ НА ПЛОСКОСТИ

Е.Б. Платаева

*Семейский филиал РГКП ЦСМ МЗ РК, г. Семей***СҰЙЫҚ ҚАННЫҢ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИЯСЫНЫҢ ЖАЗЫҚТЫҚТАҒЫ ТІКЕЛЕЙ РЕАКЦИЯСЫМЕН ЗЕРТТЕУ ЖҮРГІЗУ ҮШІН ЦОЛИКЛОНДАРДЫ ТАҢДАУ**

Зат бетіндегі сұйық қанның тура гемагглютинациялық реакциясын зерттеу үшін цоликлондар титрын таңдау жүргізілді. Нақты сәйкес келетін, цоликлон анти-А және анти-В титры 1:512, антиген-Н анықтау үшін цоликлон анти-Н титрі 1:64 сәйкес келеді.

THE CHOICE OF THE TITER OF COLYCLONES FOR INVESTIGATION OF LIQUID BLOOD BY DIRECT HEMAGGLUTINATION TEST

The choice of the titer of colyclones for investigation of liquid blood by direct reaction of hemagglutination on plane was carried out. Most proper titer for colyclones anti-A and anti-B is 1:512, and it's more expediently to apply colyclone anti-Nab in titer 1:64 for revealing of antigen H

Судебно-биологическое исследование крови всегда являлось актуальным, т.к. решались многие вопросы, которые оказывали помощь в судебно-следственных действиях. При исследовании крови решаются многие моменты, среди которых и установление групповой принадлежности. Наибольшее значение при установлении групповой принадлежности крови принадлежит системе АВО [1]. Как правило определяются антигены А, В, Н и мутационные признаки А₂, А₃, А_m, В₁, В₂, В_w и т.д. Исследование жидкой крови проводили с применением изосывороток анти-А и анти-В, а также иммунных сывороток анти-А, анти-В и анти-Н [2,3,4]. С октября 2010 года по настоящее время исследование жидкой крови в судебно-биологической лаборатории Семейского филиала РГКП ЦСМ МЗ РК производят согласно информационному листу от 21.10.2005 года № 144 [5]. Выбор данного метода был связан с прекращением выпуска изогемагглютинирующих сывороток Центрами переливания крови во многих городах РК. Причина прекращения выпуска нам не известна. Долгий опыт работы с данными сыворотками говорит о простоте и информативности метода с применением изогемагглютинирующих сывороток, что согласовывается и с данными литературы [2,3].

Опыт работы исследования жидкой крови с помощью цоликлонов выявил необходимость подбора наиболее подходящего их титра для выявления антигенов А, В, а также для антигена Н, как основного, так и сопутствующего в группах крови А, В, прямой реакцией гемагглютинации на плоскости с целью улучшения качества проводимой реакции. Что и явилось **целью** нашей работы.

Материал и методы исследования:

Цоликлоны - название разработанных в лаборатории Гематологического научного центра РАМН (г. Москва) и выпускаемых ООО «Гематолог» типизирующих реагентов нового поколения для определения антигенов человека. Цоликлоны получены с помощью современных биотехнологических методов. Содержащиеся в них моноклональные антитела продуцируются специально сконструированными клеточными линиями мыши - гибридами. Каждая гибридная линия продуцирует антитела, имеющие идентичную химическую структуру и биологическую активность и принадлежащие к одному классу иммуноглобулинов. Поэтому каждый реагент, приготовленный на основе моноклональных антител, строго специфичен, не содержит примеси других антител, балластных белков и других нежела-

тельных компонентов, более того, отсутствие в нем каких-либо инфекционных антигенов делают его полностью безопасным.

Цоликлоны СМ (судебно-медицинские) предназначены для исследования антигенов человека в судебной медицине. Применяются цоликлоны анти-А, анти-В и три разновидности анти-Н: анти-Наб, анти-Нн/аб и анти-Нкра. Все вышеперечисленные реагенты используются для определения антигенов А, В, Н в жидкой крови в прямых реакциях агглютинации на плоскости, в пробирках, в микроплате.

В нашей лаборатории был произведен подбор титра цоликлонов для исследования жидкой крови реакцией гемагглютинации на плоскости цоликлонами анти-А, анти-В, анти-Наб, Анти-Нкра для определения антигенов А, В, Н и сопутствующего антигена Н системы АВО. Так с октября 2010 года по февраль 2011года исследовано 145 образцов жидкой крови (трупной). В дальнейшем, 48 образцов из них были исследованы в высушенном виде реакциями КРА и РАЭ. При этом, установленная групповая принадлежность крови в жидком виде прямой реакцией гемагглютинации на плоскости подтвердилась реакциями КРА и РАЭ в 100% случаев.

Техника реакции:

На пластинку наносили 2 капли (0,1мл) цоликлонов анти-А серии 153 с титром 1:512, анти-В серии 154 с титром 1:512 и анти-Наб серии 160 с титром 1:64. Рядом помещали маленькую каплю (0,01-0,05мл) исследуемой жидкой крови, кровь смешивали с реагентом. Агглютинация эритроцитов с цоликлонами наступает в первые 5-7 секунд, визуально, при легком покачивании пластины. Учет результатов проводили после покачивания пластины в течении 3 минут, ввиду более позднего появления агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые антигены. (Для установления необходимого титра реакция проводилась под контролем гетероиммунных сывороток анти-А, анти-В, анти-Н, выявляли наименьший титр с хорошо различимой агглютинацией с гомологичным антигеном, наступающий в первую минуту после смешивания реагентов). Затем кровь высушивали на марле.

Результаты исследования.**Подбор титра цоликлонов**

Цоликлоны разводили физиологическим раствором в 5,10, 20,30,40,50,60,70 раз, затем каждое разведение титровали и с полученным титром ставили прямую реакцию гемагглютинации на плоскости под контролем гетероиммунных сывороток анти-А, анти-В, анти-Н.

Каждый образец исследовали с цоликлонами с титром от 1:16 до 1:2048. Наилучшие результаты (хорошо различимая агглютинация с гомологичным антигеном, наступающая в первую минуту после смешивания реагентов (+) при исследовании крови в жидком виде наблюдались с цоликлонами анти-А серии 153 и анти-В серии 154 при титре 1:512 (разведение в 20 раз) и с цоликлоном анти-Наб серии 160 при титре 1:64 разведение в 10 раз и анти-Нкра серии 188 при титре 1:128 разведение в 7 раз). При более низком титре реакции агглютинации не наступало, или наступала слабоположительная реакция агглютинации к концу 3-й минуты наблюдения. При более высоком титре ложноположительная реакция агглютинации не наступила ни в одном из исследований.

Также при исследовании установлено, что анти-Наб одинаково хорошо выявляет как основной антиген Н, так и сопутствующий антиген Н в группах крови А, В, и чуть слабее в группе крови АВ. (анти-Нкра слабо выявляет сопутствующий антиген Н во всех группах крови) (таблица 1).

Рекомендуемое изложение исследовательской части в «Заключении эксперта»:

Исследование жидкой крови реакцией гемагглютинации на плоскости цоликлонами

На пластинку наносили 2 капли (0,1мл) цоликлонов анти-А серии 153, анти-В серии 154 и анти-Наб серии 160 с титром 1:32. Рядом помещали маленькую каплю (0,01-0,05мл) исследуемой жидкой крови, кровь смешивали с реагентом. Учет результатов после покачивания пластинки в течении 3 минут.

(О) - Кровь агглютинируется цоликлоновой сывороткой анти-Н и не агглютинируется цоликлоновыми сыворотками анти-А и анти-В. (А) - Кровь агглютинируется цоликлоновой сывороткой анти-А и не агглютинируется цоликлоновыми сыворотками анти-В и анти-Н.

(В) - Кровь агглютинируется цоликлоновой сывороткой анти-В и не агглютинируется цоликлоновыми сыворотками анти-А и анти-Н.

(АВ) - Кровь агглютинируется цоликлоновыми сыворотками анти-А и анти-В и не агглютинируется цоликлоновой сывороткой анти-Н.

(А,Н) - Кровь агглютинируется цоликлоновыми сыворотками анти-А, анти-Н и не агглютинируется цоликлоновой сывороткой анти-В (то же для В,Н и А,В,Н) (таблица 2).

Таблица 1 - Результаты исследований.

Цоликлоны	Титр цоликлонов и результаты исследований								Группа крови (количество исследований)
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
Анти-А	-	-	-	-	-+	+	++	+++	А (42)
Анти-В	-	-	-	-	-+	+	++	+++	В (40)
Анти-Наб	-	-+	+	++	+++	+++			О (20 осн. а/г Н) (10 сопут.а/г Н)
Анти-Нкра	-	-+	-+	+	++	+++			О (16 осн. а/г Н) (17сопут.а/г Н)

Таблица 2 - Запись в журнале регистрации исследованной трупной крови в лаборатории.

Исследование изосерологической системы АВО			Результаты исследования по системам
ЦОЛИКЛОНЫ			
Анти-А	Анти-В	Анти-Н	
-	-	+	О
+	-	-	А
-	+	-	В
+	+	-	АВ
+	-	+	А,Н
-	+	+	В,Н
+	+	+	АВ,Н

Таким образом, можно сделать **вывод**, что при исследовании жидкой крови прямой реакцией гемагглютинации на плоскости наиболее подходящий титр для цоликлонов анти-А и анти-В **1:512**, а для выявления антигена Н целесообразно применять цоликлон анти-Наб с титром **1:64**.

Литература:

1. Барсеянц Л.О., Крюков В.Н., Солохин А.А., Ширинский П.П. Судебная медицина. ИНФРА-М – Норма, 1996.
2. Томилин В.В., Барсеянц Л.О., Гладких А.С. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. М. Медицина, 1989г.

3. Информационный листок «Применение моноклональных антител анти-А, анти-В и анти-Н для определения групповой принадлежности жидкой крови в судебно-медицинской практике». Минздрав, Москва, 1989г.

4. Информационный листок «Рекомендации по применению моноклональных реагентов диагностических жидких для судебно-медицинских целей» Москва. ООО «Гематолог» 2009г.

5. Информационный листок «Инструкция по применению «Цоликлонов ЦИТО анти-А, анти-В, анти-АВ диагностических жидких» для специалистов». Утверждена приказом КФ МЗ РК от 21.10.2005 года № 144.