

УДК 616.15. - 615.38

О.А. Искакова

АО «Республиканский научный центр неотложной медицинской помощи», г. Астана

## ПРИМЕНЕНИЕ ГЕЛЕВОЙ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КРОВИ

### Аннотация

Статья содержит сведения о гелевой технологии, используемой для иммуногематологических исследований крови, принципах гелевого теста, характеристику идентификационных карт. Здесь же описывается клиническая значимость и преимущества гелевой технологии, а также представлены результаты некоторых исследований. Предназначено для специалистов, занимающихся иммуногематологическими исследованиями в трансфузиологии, трансплантологии, гематологии, иммунологии.

**Ключевые слова:** иммуногематология, гелевые технологии, стандартизация гемагглютинации.

**Введение.** Гелевая технология была предложена Y.Lapierre в 1989г. - основана на агглютинации эритроцитов в агаровом геле «сефадекс», помещенных в микропробирки и внедрена с целью стандартизации реакций гемагглютинации с получением достоверных результатов.

Обычно иммуногематологические исследования, основанные на реакции гемагглютинации, проводятся в жидкофазных системах. Ложные, слабые или отрицательные результаты непрямого антиглобулинового теста, за счет нейтрализации антиглобулинового реагента следами сыворотки (вследствие недостаточно эффективного отмывания эритроцитов), могут стать причиной ошибок и неверно интерпретированы, особенно неопытным персоналом.

Гелевая технология использует комбинацию методов агглютинации и гель-фильтрации.

**Тесты включают в себя:** определение группы крови, Rh-фактора, фенотипа эритроцитов, антиглобулиновый тест, скрининг и идентификацию антител, тесты на совместимость и некоторые другие.

Для исследований пригодны как образцы цельной крови (взятые в чистую, сухую пробирку), так и образцы крови, взятые на консервантах и стабилизаторах. Также пригодна артериальная, капиллярная и пуповинная (без отмывания) кровь.

**Характеристика идентификационных карт.** Идентификационные карты (ID-карты) представляют собой пластиковые карточки, в которые встроено по шесть микропробирок. В пяти пробирках содержится смесь геля со специфическими моноклональными антителами и антиглобулиновым реагентом, предназначены для определения группы крови по системе АВ0 и Rh-принадлежности эритроцитов доноров и реципиентов (включая слабые варианты антигенов), а также для типирования других антигенов эритроцитов.

Каждая карточка имеет шестую контрольную пробирку, содержащую нейтральный гель без антител (ctl).

Маркировка пробирок в ID-карте осуществляется по выявляемым антигенам, например: A-B-AB-D-CDE-ctl или C-c-E-e-K-ctl.

Идентификационные карты для выявления антител к антигенам эритроцитов имеют некоторые отличия, например, карты "Coombs / Enzyme Test": в трех пробирках, расположенных слева, содержится гель, содержащий антитела к глобулинам человека (моноспецифические анти-IgD или полиспецифические - к иммуноглобулинам различных классов) - реакция Кумбса. В следующих трех пробирках содержится только нейтральный гель, предназначенный для выявления антител к антигенам эритроцитов в солевой среде.

**Принцип гелевого теста.** Для проведения тестов обычно используются три вида геля:

1) нейтральный, не содержащий специфических антител (применяется для поиска и идентификации антител солевым и ферментативным методами, на холодной стадии пробы на совместимость крови донора и реципиента);

2) специфический, содержащий антитела (моноклональные или поликлональные) к антигенам эритроцитов крови человека (применяется для типирования антигенов эритроцитов систем АВ0, Rh, Kell и т.д.);

3) антиглобулиновый, содержащий антитела (полиспецифические или моноспецифические) к иммуноглобулинам человека и компонентам системы комплемента (применяется для прямого и непрямого антиглобулинового теста, т.е. реакции Кумбса, при поиске и идентификации ауто- и аллоиммунных антител, пробе на совместимость крови донора и реципиента).

Исследуемые или стандартные эритроциты и исследуемая сыворотка (плазма) помещаются в соответствующие микропробирки, где происходит реакция агглютинации, затем идентификационные карты центрифугируются для разделения результатов реакции. При этом неагглютинированные эритроциты свободно проходят между частицами геля и образуют на дне микропробирки компактный осадок красного цвета - отрицательный результат; агглютинированные располагаются на поверхности или в толще геля (в зависимости от размеров агглютинатов) - положительный результат.

В зависимости от силы реакции агглютинации в гелевой среде принята следующая оценка полученных результатов:

- сильно-положительный (++++) - образовавшиеся агглютинаты эритроцитов задержались на поверхности геля;

- положительный (+++) - агглютинаты располагаются в верхней трети столбика геля;

- слабо-положительный (++) - агглютинаты фиксированы в верхних двух третях геля;

- очень слабо-положительный (+) - агглютинаты располагаются в нижней трети геля;

- отрицательный (-) - эритроциты формируют на дне микропробирки компактный осадок.

Размер частиц геля, специальный подбор моноклональных или поликлональных антител позволяет достичь наилучших результатов чувствительности и специфичности, а его прозрачность делает считывание результатов более надежным и позволяет интерпретировать самые сложные диагностические случаи.

**Клиническая значимость.** Принцип безопасности трансфузий эритроцитосодержащих гемокомпонентов воз-

можно осуществлять за счёт выявления предшествующей сенсibilизации. Это достигается обязательным для всех реципиентов скринингом нерегулярных антиэритроцитарных антител имеющее клиническое значение, способные вызывать in vivo разрушение эритроцитов, имеющих на мембране соответствующий антиген. Присутствие которых, вызывает возникновение посттрансфузионной гемолитической реакции и осложнения, гемолитической болезни новорожденных или укорочение времени выживания перелитых эритроцитов. При отсутствии антител (отрицательный результат скрининга) эритроцитарные среды выбирают только с учётом группы крови по системе АВ0 и Rh(D) принадлежности. Положительный результат скрининга говорит об «опасном» реципиенте, которому трансфузии гемокомпонентов осуществляют только по индивидуальному подбору с обязательным исключением антигена, к которому выявлена сенсibilизация. В таких случаях целесообразно выполнять типирование эритроцитов реципиента по антигенам С,с,Е,е системы Rh, антигену К системы Kell и другим для точных рекомендаций по выбору гемокомпонентов для трансфузий. Это относится также к реципиентам, которым планируются многократные трансфузии гемокомпонентов (пациенты гематологических, онкологических стационаров, гемодиализа, реципиенты органов и тканей). Таким реципиентам индивидуальный подбор проводится не только с учётом выявления предшествующей сенсibilизации, но и с обязательным фенотипированием эритроцитов.

Для исследования вышеуказанных антигенов эритроцитов и антител к ним используются различные методы, наиболее чувствительным и специфичным из которых является гелевый тест.

**Основные преимущества использования гелевой технологии:**

- Высокая чувствительность и специфичность тестов, что позволяет проводить диагностику слабых вариантов антигенов и антител (включая А2, А3; Du, DVI);
- Единственный метод выявления посттрансфузионных и посттрансплантационных «химер»;
- Объективизация, стандартизация и возможность фотодокументации результатов исследований для сохранения их в архиве или использования для учебных пособий;
- Автоматизации выполнения исследований и компьютерной обработки результатов;
- Удобство и простота в исследовании, повышение безопасности персонала: отсутствие этапов отмывания эритроцитов; исследование крови, заготовленной на консервантах и стабилизаторах без искажения результатов; сокращение времени на проведение полного иммуногематологического исследования в 2-5 раз; снижение риска заражения персонала инфекциями, передающимися через кровь;
- Возможность использования небольших количеств крови – актуально при использовании в педиатрии - неонатологии, когда получение достаточных количеств материала (необходимых для других методик) затруднено;

тологии, когда получение достаточных количеств материала (необходимых для других методик) затруднено;

**Оборудование и реактивы.**

- ID-карты для определения антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител;
- ID-центрифуга для центрифугирования карт;
- термостат на +37°С;
- штатив для пробирок и карт;
- пробирки вместимостью 5 и 10 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные (10, 25, 50 мкл);
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор для разведения 1 (раствор бромелина);
- раствор для разведения 2 (раствор низкой ионной силы - LISS, PHIC);
- 0,9% раствор хлорида натрия;
- стандартные типированные эритроциты человека для выявления антител и проведения перекрестной реакции.

Таблица 1.

**Результаты исследования антигенов группы крови АВ0 и резус-принадлежности в ID-карте АВ0/Rh.**

Выявляемые антигены					Заключение
A	B	AB	D	CDE	
+	+	+	+	+	AB Rh+
+	+	+	-	-	AB Rh-
+	-	+	+	+	A Rh+
+	-	+	-	-	A Rh-
-	+	+	+	+	B Rh+
-	+	+	-	-	B Rh-
-	-	-	+	+	0 Rh+
-	-	-	-	-	0 Rh-

*Примечание:* Специфичность исследования подтверждается по отрицательному результату в пробирке с контролем ID-карты.

Таблица 2.

**Определение антигенов эритроцитов системы АВ0.**

Группа крови	Результаты исследования с сыворотками		
	анти-А	анти-В	анти-АВ
0 (I)	-	-	-
A1 (II)	++++	-	++++
A2 (II)	++++	-	++++
A3 (II)	++/++++	-	++/++++
A <sub>x</sub> (II)*	-/++	-	+/++
B (II)	-	++++	++++
B3 (III)	-	+/++++	+/++++
B <sub>x</sub> (III)*	-	-/++	-/++
A1B (IV)	++++	++++	++++
A2B (IV)	+++ /++++	++++	++++

*Примечание:* \* - определение очень слабых вариантов антигенов А и В требует дальнейших исследований.

Таблица 3.

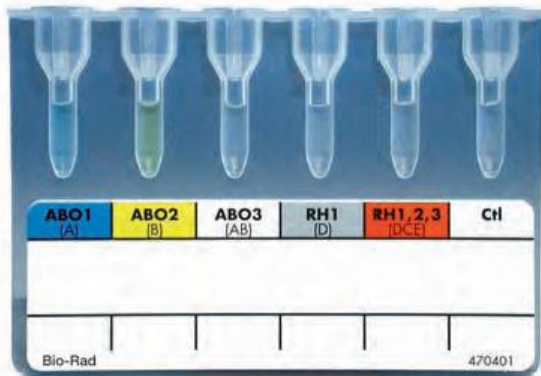
**Определение резус-принадлежности (D, CDE).**

Резус-принадлежность	Результаты исследования с сыворотками	
D-положительная	++++	++++
D-отрицательная	-	-
D-отрицательная, С	Е- положительная*	-
Слабоположительная (D <sup>u</sup> )	От ± до +++	от +++ до ++++

*Примечание:* \* - Положительная реакция с сывороткой анти-CDE при отрицательной реакции с сывороткой анти-D свидетельствует о наличии антигенов С, Е и требует дальнейшего типирования с использованием ID-карт: С-с-Е-е-К-ctl или С-С<sup>w</sup>-с-Е-е-К

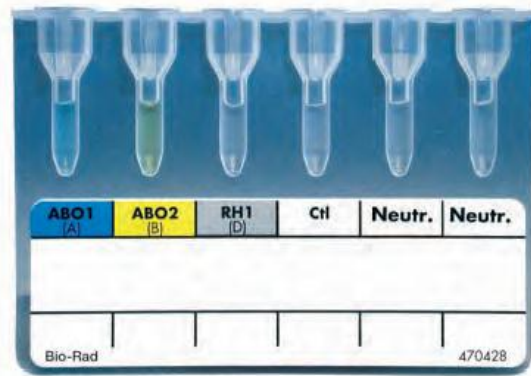
**ID-карточки**

**А-В-АВ-D-DCE- Контроль** – для определения групп крови ABO/RH. Каждая микропробирка (1-5) содержит специфические моноклональные антитела, 6 – контроль содержит нейтральный гель.



**ID-карточки**

**А-В-D-Контроль-Нейтр-Нейтр** - для определения групп крови ABO/RH перекрестным методом. Микропробирка 1 содержит анти - А, 2 - анти-В, 3 – Анти-D, 4 - контрольная, 5 и 6 –нейтральный гель.

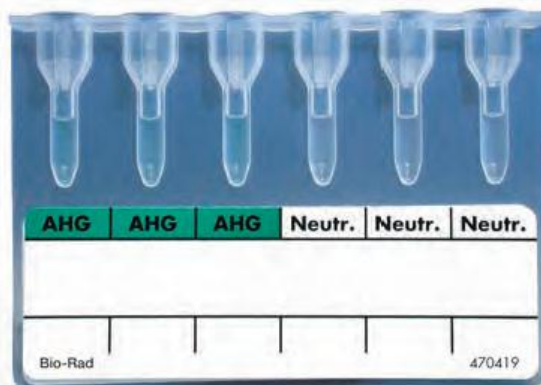


**ID-карточки**

**Кумбс + нейтральные** – для скрининга антиэритроцитарных антител (непрямая реакция Кумбса и ферментный тест).

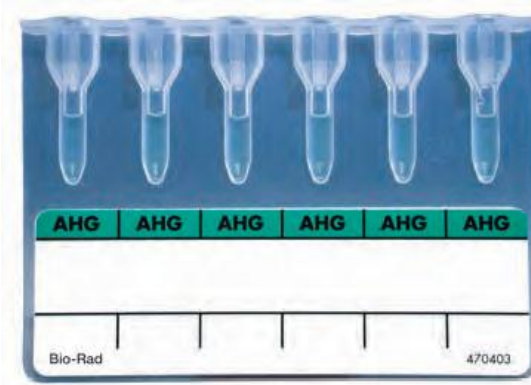
Первые три микропробирки содержат гель с антиглобулиновой сывороткой для проведения реакции Кумбса в растворе низкой ионной силы (РНИС).

Последние три - нейтральный гель для выполнения солевой или ферментативной реакции с папаином



**ID-карточки**

**Кумбс анти - IgG, анти - IgG, C3d (АГС)** - прямая реакция Кумбса. Микропробирки содержат гель с антиглобулиновой сывороткой для проведения реакции Кумбса в растворе низкой ионной силы (РНИС).



**Выводы.** Гелевый тест является простым, воспроизводимым, быстрым и очень чувствительным методом, позволяющим сразу выявлять слабые варианты антигенов эритроцитов. Тест оценивается только макроскопически. После короткого обучения персонала, выполнения теста, сводятся к минимуму затрат рабочего времени и ошибок, встречающиеся при традиционных методиках.

Гелевый тест позволяет стандартизировать лабораторные методики, дать объективную оценку результатов реакции геммагглютинации. Тесты позволяют перепроверять полученные данные, для контроля, так как могут быть фотокопированы для сохранения их в архиве. Для теста используется небольшое количество сыворотки или эритроцитов, что чрезвычайно важно для педиатрических клиник.

Использование гелевой системы позволяет снизить риск заражения персонала даже при работе с потенциально инфицированными образцами.

Отсутствие этапов отмывания эритроцитов при выполнении непрямого антиглобулинового теста позволяет более эффективно использовать рабочее время.

**Литература:**

1. Жибурт Е.Б. Трансфузиология. Издательский дом "Питер", - 2002. – 345с.
2. Минеева Н.В. Группы крови человека. Основы иммуногематологии. - Санкт-Петербург. – 2004.
3. Bromilov I.M. Гелевая технология в серологии групп крови // Вестник службы крови России. - №1, январь – 1998. – С. 23-24.
4. Волкова О.Я. Применение гелевой технологии «Скангель» для иммуногематологических исследований крови доноров и реципиентов гемокомпонентов. Методические рекомендации. - Санкт-Петербург. – 2008. – 65с.

**Тұжырым**  
**ҚАНЫҢ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЯЛЫҚ ЗЕРТТЕУЛЕРІ ҮШІН ГЕЛДІК ТЕХНОЛОГИЯНЫ ҚОЛДАНУ**  
**О.А. Искакова**

**АҚ «Республикалық жедел медициналық көмек көрсету ғылыми орталығы», Астана қ.**

Мақала қанды иммуногематологиялық зерттеу үшін қолданылатын гелдік технология, гелдік сынақтама туралы мәліметтерді және сәйкестендіру карталарының сипаттамасын ұсынады. Мұнда гелдік технологияның клиникалық маңыздылығы мен артықшылықтары, сонымен қатар бірқатар зерттеулердің нәтижелері қарастырылған. Аталмыш жұмыс трансфузиология, трансплантология, гематология, иммунология салаларында иммуногематологиялық зерттеулермен айналысатын мамандарға арналады.

**Негізгі сөздер:** иммуногематология, гелдік технологиялар, гемагглютинацияны стандарттау.

**Summary**  
**GEL TECHNOLOGIES FOR THE IMMUNE HEMATOLOGICAL BLOOD TESTING**  
**O.A. Iskakova**

**JSC «Republican Research Center for Emergency Care», Astana**

The article elaborates on use of gel technologies at immunohematology blood studies, principles of gel tests, and characteristics of identification cards. Next, the article continues with describing clinical importance and advantages of gel technology, as well as presents a number of research results. This is a recommended reading for specialists practicing immunohematology studies in transfusiology, transplantology, hematology and immunology.

**Key words:** the immunohematology, gel technologies, gemagglutination standartizing.

УДК 612.014.482.4-017.1

С.Е. Узбекиова, Б.А. Жетписбаев, А.К. Мусайнова, Д.Е. Узбекиов, Г.С. Шалгимбаева

Государственный медицинский университет города Семей

**ВЛИЯНИЕ ИМУНОФАНА НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ФАГОЦИТАРНОЕ ЗВЕНО ИММУНИТЕТА ОРГАНИЗМА, ОБЛУЧЕННОГО ФРАКЦИОНИРОВАННОЙ ДОЗОЙ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ**

**Аннотация**

В статье отражены результаты влияния иммунофана на показатели фагоцитарного фактора иммунной системы у необлученных животных и в отдаленном периоде после после фракционированного гамма-облучения. В результате экспериментов были получены данные, что у интактных животных под влиянием иммунофана фагоцитоз достоверно повышается с  $36 \pm 2,4$  до  $42,6 \pm 1,5$ , а фагоцитарное число – в 1,6 раза. При этом иммунофан в 3 раза повышает НСТ-тест. Под воздействием иммунофана в отдаленном периоде после облучения происходит нормализация фагоцитарных факторов неспецифической резистентности организма.

**Ключевые слова:** фракционированное гамма-излучение, иммунная система, иммунопротекторы, отдаленные последствия облучения.

Реализация восстановительных процессов в организме облегчается при фракционированном облучении и при уменьшении мощности дозы, однако, во всех случаях восстановление не может быть абсолютным, некоторая доля повреждений может оставаться необратимой и участвовать в формировании отдаленных последствий. Поэтому поиск эффективных препаратов для профилактики отдаленных последствий радиационных поражений продолжает оставаться актуальной проблемой современной медицины.

**Цель исследования**

Целью нашего исследования явилась оценка влияния иммунофана на фагоцитарное звено иммунитета интактного организма, а также в отдаленном периоде после фракционированного гамма-облучения.

**Материалы и методы исследования.** Животных подвергали в течение 3 недель облучению гамма лучами  $Co^{60}$  на радиотерапевтической установке «ЛУЧ-1», суммарная доза облучения составила 6 Гр. Контрольными для данной группы служили интактные животные ( $n=10$ ). До и через 90 дней после облучения и проведенного курса иммунофаном (в течение 10 дней по общепринятой схеме) у всех животных определяли показатели фагоцитарного фактора иммунной системы.

Полученные цифровые данные обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики по методике Е.В. Монцевичюте-Эрингене с вычислением критериев Стьюдента с оценкой степени достоверности различий между сравниваемыми группами. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы Microsoft Excel 2000.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Нами было исследовано влияние иммунофана на неспецифическое фагоцитарное звено иммунной системы необлученных животных. Результаты представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что у интактных животных под влиянием иммунофана фагоцитоз достоверно повышается с  $36 \pm 2,4$  до  $42,6 \pm 1,5$ , а фагоцитарное число – в 1,6 раза. При этом иммунофан в 3 раза повышает НСТ-тест.

В дальнейшем нами изучалось влияние иммунофана на неспецифическое фагоцитарное звено иммунной системы облученных фракционированной дозой животных в отдаленном периоде (таблица 2).

Из таблицы 2 мы видим, что под воздействием иммунофана происходит достоверное снижение НСТ-теста до  $2,4 \pm 0,2$  ( $P < 0,05$ ), фагоцитоза до  $24,8 \pm 3,9$ , а фагоцитарное число снижается до нормы.