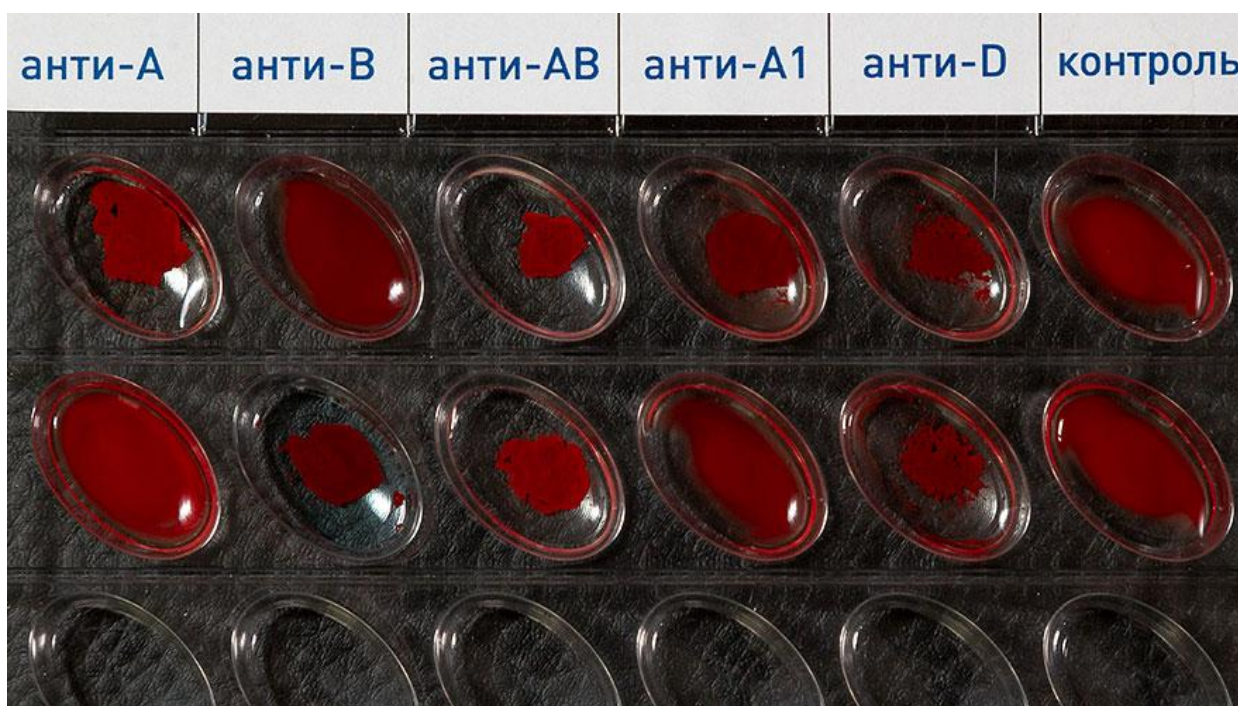


В 1901 году выдающийся ученый Карл Ландштейнер открыл группы крови и заложил основы современной трансфузиологии. Исследователь выявил три группы на основании различных вариантов реакции агглютинации эритроцитов и сывороток крови. Материал для исследования был взят у сотрудников собственной лаборатории. Ученики Ландштейнера Декастелло и Стюрли несколькими годами позже открыли четвертую группу, но посчитали ее сомнительной и исключили из результатов исследований. В 1906 году психиатр из Праги Ян Янский подтвердил существование группы АВ (IV). Публикация исследования в местном издании оказалась практически незамеченной. В 1910 году после повторного обнаружения четвертой группы Моссом Ян Янский был вынужден доказывать первенство открытия. Чешский ученый предложил цифровое обозначение групп крови: I, II, III, IV.



планшет для типирования крови

В трансфузиологии группами крови называют различные сочетания антигенов эритроцитов. Антигены являются генетическими признаками: наследуются от родителей и остаются неизменными на протяжении жизни. В 1980 году Международное сообщество переливания крови разработало числовую терминологию для антигенов эритроцитов. Выделены 23 системы группы крови, включающие 194 антигена. Нумерация в большинстве случаев соответствует порядку обнаружения. Входящие в каждую из 23 систем антигены кодируются шестизначным номером: первые три цифры являются номером системы, оставшиеся три – указывают на специфичность антигена внутри системы.

№ системы	Наименование	Обозначение	Наименование генов	Хромосомная локализация
001	ABO	ABO	ABO	9q34.1—q34.2
002	MNS	MNS	GYPA, GYPB, GYPE	4q28—q31
003	P	P1	P1	22q11.2—qter
004	Rh	RH	RHD, RHCE	1p36.2—p34
005	Lutheran	LU	LU	19q12—q13
006	Kell	KEL	KEL	7q33
007	Lewis	LE	FUT3	19p33
008	Duffy	FY	FY	1q22—q23
009	Kidd	JK	JK	18q11—q12
010	Diego	DI	AE1	17q12—q21
011	Yt	YT	ACHE	7q22
012	Xg	XG	XG	Xp22.32
013	Scianna	SC	SC	1p36.2—p22
014	Dombrock	DO	DO	неизвестна
015	Colton	CO	AQP1	7p14
016	Landsteiner-Wiener	LW	LW	19p13.2—cen
017	Chido/Rogers	CH/RG	C4A, C4B	6p21.3
018	Hh	H	FUT1	19q13
019	Kx	XK	XK	Xp21.1
020	Gerbich	GE	GYPC	2q14—q21
021	Cromer	CROM	DAF	1q32
022	Knops	KN	CR1	1q32
023	Indian	IN	CD44	11p13

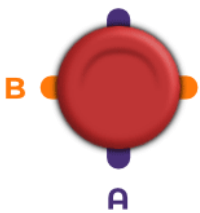
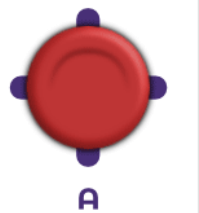
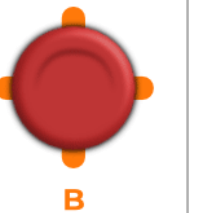
Система группы крови АВ0

Определение группы крови по системе АВ0 основано на выявлении на поверхности эритроцитов человека группоспецифических антигенов 0, А, В и изоиммунных антител анти-А (α) и анти-В (β) в сыворотке. Уникальная особенность системы АВ0 заключается в наличии в плазме человека естественных антител α и β к отсутствующему антигену. Возможны шесть вариантов аллельных антигенов: 00, А0, АА, В0, ВВ, АВ. Фенотипически выделяют четыре группы: 0(I), А(II), В(III), АВ(IV) — гетеро- и гомозиготные варианты объединяют (в России используют буквенно-цифровое обозначение).

Групповая принадлежность по системе АВ0

Агглютиногены	Агглютинины
0	α и β
А	β
В	α
АВ	нет

- 0(I): антигены А и В отсутствуют, антитела α и β – обнаружены (35 - 40 % населения в мире);
- А(II): присутствует антиген А и антитела β (35 %);
- В(III): обнаружен агглютиноген В и агглютинин α (15 – 20 %);
- АВ(IV): наличие агглютиногенов А и В, отсутствие агглютининов α и β (5 – 10 %).

Антитела в сыворотке		антити-В	антити-А	антити-В антити-А
Антигены на эритроцитах				
Группа крови	А В	А	В	0

система АВ0

По мере движения с запада на восток Евразии частота обнаружения антигена А падает, а антигена В возрастает. Антиген 0 редко встречается в Азии, но имеет широкое распространение у коренных народов Южной Америки, Полинезии и Австралии. Причина – эпидемии инфекционных заболеваний.

Результат типирования крови записывают в историю болезни или в карту донора. Врач-трансфузиолог указывает дату и ставит подпись.

В отдельных случаях во время типирования наблюдается слабовыраженная агглютинация эритроцитов. Недостаточно выраженная реакция объясняется наличием слабых вариантов антигенов А и В. Наибольшее клиническое значение представляют подгруппы A_1 и A_2 . Впервые слабые варианты были обнаружены в 1911 году учеными Dungern и Hirsfeld. Позднее в 1930 году Landsteiner и Levine предложили названия подгруппы – A_1 и A_2 . A_2 встречается до 20 % в группе А и до 35 % в группе АВ. Сыворотка лиц из образцов крови A_2 может содержать анти- A_1 -антитела: в 2 % случаев в группе A_2 и в 30 % в A_2B . Антитела анти- A_1 представляют опасность ввиду агглютинации эритроцитов группы А.

Методика определения групп крови A_2 и A_2B

Частота выявления эритроцитов A_2 существенно варьируется в зависимости от применяемых реагентов. Приводим сравнение результатов исследования при использовании различных методик типирования групп крови A_2 и A_2B .

- Анти- A_1 (лектин, фитогемагглютинин). Диагностикум явно выражено (на +++/++++) агглютинирует A_1 эритроциты сразу после смешения с образцом. Не агглютинирует A_2 или вызывает мелкую агглютинацию на пятой минуте и позднее.

- Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки.
- Цоликлоны анти-А и анти-АВ.
- Цоликлон анти-А слабый.

Число проанализированных образцов	Группа крови А (II)		Группа крови АВ (IV)	
	Число проанализированных образцов	Группа A ₂ (II) в %	Число проанализиро- ванных образцов	Группа A ₂ B (IV) в %
Анти-А ₁ (лектин, фитогемагглютинин)	1592	14,7	357	23,5
Цоликлоны: анти-А, анти- АВ	3599	2,1*	357	7,03*
Цоликлон анти-А — слабый	3587	4,5*	357	11,2*
Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки	1592	17,4	344	34,2

Примечание: * — агглютинация выражена слабо, присутствуют мелкие агглютинаты на розовом фоне.

Наибольшую точность исследования обеспечивает Анти-А₁ (лектин, фитогемагглютинин). Тест рекомендован для выявления подгрупп антигена А у детей младше двух лет. Причина — физиологическая незрелость эритроцитов новорожденных, влекущая ошибочные результаты исследования со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками.

В 1930 году Landsteiner и Levine обнаружили подтип A_{int}: промежуточный вариант между А₁ и А₂. Данный антиген характерен для негроидов и достигает 8,5 % у лиц с группой крови А. У европеоидов A_{int} наблюдался лишь у 1 % людей со второй группой крови. В крайне редких случаях у человека отсутствуют все антигены системы АВ0. Фенотип «Бомбей» обусловлен генотипом hh. При отсутствии антигена Н у лиц данной категории обнаруживаются анти-А и анти-В антитела.

Методика определения групп крови

Типирование по системе АВ0 осуществляют в реакции прямой агглютинации с использованием стандартных гемагглютинирующих сывороток или типизирующих реагентов с моноклональными антителами. Применение цоликлонов предпочтительнее ввиду абсолютной

специфичности: каждый реагент не содержит примеси других антител, балластных белков и инфекционных факторов.

Алгоритм выявления группы крови гемагглютинирующими сыворотками

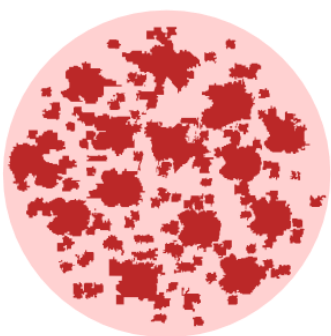
Для определения группы крови АВ0 прямым методом используют две серии стандартных изогемагглютинирующих сывороток. Подготовьте две серии сывороток трех групп с титром 1:32 или выше. Для забора каждой сыворотки используйте отдельную маркированную пипетку. Подготовьте сыворотку АВ(IV) для контроля.

1. Обеспечьте хорошее освещение и температуру воздуха 18 – 25 °С.
2. Промаркируйте планшет: 0(I) – слева, А(II) – по центру, В(III) – справа. Вверху по центру укажите фамилию донора или номер анализируемой крови.
3. Нанесите в лунки 1 – 2 капли (приблизительно 0,1 мл) сывороток в два ряда в соответствии с маркировкой планшета.
4. Пипеткой или стеклянной палочкой поместите по одной маленькой капле исследуемых эритроцитов рядом с каплями сыворотки. Объем сыворотки должен примерно в 10 раз превышать объем эритроцитосодержащей жидкости.
5. Перемешайте капли в лунках палочкой.
6. Для ускорения реакции произведите легкое покачивание планшета.
7. Спустя три минуты в лунки планшета, в которых началась агглютинация, добавьте по одной капле NaCl. Подождите еще две минуты.
8. Спустя пять минут оцените результаты реакции в проходящем свете. В случае невыраженной агглютинации добавьте еще по одной капле NaCl.

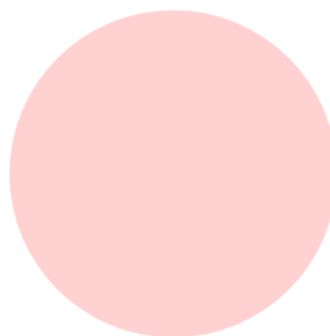
Результаты реакции:

- Отрицательная реакция в трех лунках свидетельствует об отсутствии антигенов на эритроцитах исследуемого образца. Кровь относится к группе 0(I).
- Агглютинация в лунках с сыворотками 0(I) и В(III) говорит о наличии агглютиногена А и принадлежности к группе А(II).
- Наступление реакции с сыворотками 0(I) и А(II) свидетельствует о присутствии антигена В и групповой принадлежности В(III).

- Результаты реакции во всех лунках указывают на присутствие агглютиногенов А и В и соответствуют четвертой группе АВ(IV).



Агглютинация есть



Агглютинации нет

(равномерное окрашивание капли)

агглютинация эритроцитов

Реакция агглютинации с цоликлонами			Кровь принадлежит к группе
Анти-А	Анти-В	Анти-АВ	
 —	 —	 —	O(I)
 +	 —	 +	A(II)
 —	 +	 +	B(III)
 +	 +	 +	AB(IV)

результаты типирования крови цоликлонами

В последнем случае следует удостовериться в отсутствии неспецифической реакции: нанесите на планшет 2 – 3 капли соответствующей группе АВ(IV) сыворотки и добавьте одну каплю анализируемых эритроцитов. Перемешайте жидкости и оцените результат спустя пять минут. Отсутствие агглютинации свидетельствует о принадлежности к группе АВ(IV), наличие – признак неспецифической реакции. В этом случае, а также при слабовыраженной агглютинации повторите исследование с другими сериями сывороток.

Техника определения группы крови цоликлонами

Моноклональные антитела к антигенам эритроцитов пришли на смену изогемагглютинирующих сывороток. Для каждого типирования достаточно одной серии реагентов анти-А, анти-В, анти-АВ. Внедрение моноклональных реагентов позволило значительно упростить и стандартизировать методику типирования по системе АВ0. Приводим краткое пошаговое руководство проведения исследования на планшете.

1. Обеспечьте хорошее освещение. Работайте при комнатной температуре воздуха.
2. Объект исследования – эритроцитосодержащие среды.
3. Промаркируйте лунки планшета: анти-А, анти-В, анти-АВ или используйте планшет с маркированной наклейкой.
4. Нанесите примерно по 0,1 мл соответствующего моноклонального реагента в каждую из трех подписанных лунок.
5. Добавьте приблизительно по 0,03 мл анализируемых эритроцитов рядом с каждой каплей диагностикума.
6. Смешайте реагент с эритроцитами в лунках отдельными индивидуальными стеклянными палочками.
7. Покачивайте планшет около трех минут.
8. Проверьте наличие агглютинации в лунках.

Обычно реакция обнаруживается уже в первые секунды после смешивания. При этом слабые варианты антигенов А и В могут давать более позднюю агглютинацию.

Непрямой метод типирования: алгоритм действий

Методика определения основана на взаимодействии эритроцитов от предварительно типированных лиц групп 0, А, В или смеси эритроцитов от нескольких одnogруппных доноров с изогемагглютиниными α и β в исследуемой сыворотке.

При работе с каждым типирующим реагентом используйте сухие чистые пипетки. Промывание палочек для перемешивания и пипеток осуществляйте в 0,9 % растворе NaCl.

- Подготовьте пластину или планшет. Обеспечьте хорошее освещение помещения.
- Выполните забор 3 – 5 мл крови без стабилизатора в пробирку. Дайте сыворотке отстояться 1,5 – 2 часа при комнатной температуре.
- Отмойте тест-эритроциты в 0,9 % физиологическом растворе. Подготовьте 5 % взвесь.
- Промаркируйте секции на планшете: 0(I), A(II), B(III).
- Поместите по 2 капли (приблизительно 0,1 мл) анализируемой плазмы в каждую из трех лунок.
- Добавьте в лунки примерно по 0,03 мл тест-эритроцитов.
- Отдельными палочками смешайте типированные эритроциты с сывороткой.
- Аккуратно покачивайте планшет в течение 5 минут.
- Проведите визуальную оценку результатов реакции агглютинации в проходящем свете.

Система Резус

Levine и Stetson обнаружили антигены системы Резус в 1939 году. Ученые изучали причины развития гемолитических реакций у рожениц при трансфузиях женщинам идентичных по системам АВ0, MN и Р. эритроцитов мужей. Годом позже Landsteiner и Wiener продуцировали выработку антител посредством иммунизации кроликов эритроцитами обезьян макака-резус. Антитела получили название анти-RH антитела. Полученные агглютинины вступали в реакцию агглютинации с эритроцитами макак-резус и с эритроцитами 85 % граждан Нью-Йорка белой расы. Вызвавший образование антител антиген получил название RH-фактор (D-фактор).

Система Резус объединяет 45 антигенов. Агглютиногены передаются по наследству и остаются неизменными на протяжении жизни. Иммуногенность убывает в следующем порядке: $D > c > E > C > e$. Каждый агглютиноген кодируется одним из двух тесно связанных генов: RHD отвечает за выработку D-антигена, RHCE – за продукцию антигенов Cc и Ee. Резус-положительными донорами считают лиц с антигенами D, C или Ee.

Е на поверхности эритроцитов. При отсутствии вышеперечисленных агглютиногенов доноров считают резус-отрицательными.

В редких случаях эритроциты людей не содержат ни одного антигена резус. Фенотип обозначают Rh_{null} . Ген Xr_0 в этом случае представлен в гомозиготной форме и подавляет продуцирование всех антигенов. Обладатели фенотипа Rh_{null} не проявляют агглютиногенной активности, но имеют возможность передавать антигены по наследству.

Среди европейцев частота резус-положительных по антигену D лиц составляет 85 %. На мембране красных кровяных телец обычно расположено около 10 000 – 30 000 молекул D. При этом существуют два особых типа D-положительных лиц: D^u (слабый) и $D^{partial}$ (частичный). Иммунная система D^u и $D^{partial}$ способна вырабатывать анти-D-антитела.

Слабый антиген встречается у 1,5 % резус-положительных лиц и характеризуется низким числом (100 – 500) молекул D на мембране. Является иммуногенным для резус-отрицательных лиц. При этом переливание D-положительных эритроцитов больным со слабым D может вызвать сенсibilизацию кровяных телец донора. Эритроциты с D^u слабо агглютинируются или совсем не вступают в прямую реакцию агглютинации с полными анти-резус антителами. Определение резус-принадлежности производят в непрямом антиглобулиновом тесте. Носителей D^u считают резус-положительными донорами и резус-отрицательными реципиентами.

Частичный D имеет дефицит одного или нескольких эпитопов белковой молекулы. Иммунная система людей с $D^{partial}$ способна продуцировать антитела к недостающим эпитопам. Среди носителей частичного антигена выделяют семь групп лиц. Наибольшее клиническое значение имеет носительство D^{VI} (присутствует только эпитоп Z): обладатели данной категории продуцируют антитела к неизмененному антигену и к частичным антигенам $D^I - D^V$, D^{VII} . Техника выявления резус-фактора D^{VI} заключается в последовательном применении двух диагностикумов: моноклональных IgM анти-D-антител (целиклона Анти-D-Супер или Анти-D IgM) и поликлональных или моноклональных IgG антител анти-D (стандартного универсального реагента или целиклона Анти-D). Отрицательный результат реакции на первом и положительный результат на втором этапе исследования свидетельствует об обнаружении D^{VI} . Обычно категории D^{VI} соответствует генотип CcDee. Беременным женщинам с D^{VI} при вынашивании плода с полным D назначают антирезусный иммуноглобулин.

Антитела против антигенов резус являются иммунными. Возникают вследствие изосенсибилизации. Специфичность определяется спровоцировавшими образование антител антигенами. Выделяют полные и неполные антитела.

Полные являются IgM антителами. Отличаются большим молекулярным весом, обнаруживаются реже по сравнению с неполными антителами. Способны агглютинировать резус-положительные эритроциты. Имеют меньшее значение при трансфузиях.

Неполные преимущественно относятся к классу IgG. Закрепляются на поверхности резус-положительных эритроцитов без образования агглютинатов. Склеивание кровяных телец осуществляется при наличии коллоидных растворов и протеолитических ферментов или после обработки антиглобулиновой сывороткой. Обладают меньшим в сравнении с полными антителами молекулярным весом. Способны проходить через плаценту. Во время сенсибилизации сперва продуцируются полные антитела, далее в большей мере вырабатываются неполные (иммуноглобулины IgG) антитела.

Свыше 90 % осложнений при гемотрансфузиях обусловлено несовместимостью донора и реципиента по антигену Rh₀(D). Большое значение также имеет антиген hr'(c). Агглютиноген присутствует у 80 – 82 % населения. Оставшиеся 18 – 20 % лиц попадают в группу повышенного риска ввиду высокой вероятности несовместимости по hr'(c) с донорами и развития посттрансфузионных осложнений.

Техника выявления резус-фактора с использованием цоликлона Анти-D-Супер

Цоликлон Анти-D-Супер - это полные анти-D IgM антитела человека. Для получения достоверных результатов анализируемый образец должен содержать достаточное количество эритроцитов.

1. Обеспечьте хорошее освещение и комнатную температуру воздуха в помещении.
2. Поместите одну большую каплю (приблизительно 0,1 мл) Анти-D IgM на пластину.
3. Рядом расположите одну маленькую каплю (примерно 0,03 мл) исследуемых эритроцитов.
4. Перемешайте две капли стерильной палочкой.
5. Спустя 10 – 15 секунд плавно покачивайте пластинку на протяжении 20 – 30 секунд.
6. Проверьте наличие агглютинации спустя три минуты после перемешивания.

В случае наступления реакции кровь оценивается как резус-положительная (Rh+), при отсутствии реакции – как резус-отрицательная (Rh-). При отрицательной либо слабо выраженной агглютинации необходимо повторно провести исследование с неполными анти-D IgG антителами с целью выявления слабого или частичного антигена D.