

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**
«Ставропольский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра Общей хирургии

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЕМ
ПО ДИСЦИПЛИНЕ**

Наименование дисциплины	Общая хирургия
Специальность	31.05.03 Стоматология
Форма обучения	очная
Год начала подготовки	2025
Тема 7	Основы трансфузиологии

Методические указания к практическим занятиям по дисциплине «Общая хирургия»

Разработаны
профессором кафедры
доцентом кафедры
доцентом кафедры

Лаврешиным П.М.
Чотчаевым М.К
Владимировой С.В.

Обсуждена на заседании кафедры «общей хирургии»
Зав. кафедрой

Лаврешин П.М.

Согласованы и рекомендованы к использованию в образовательном процессе для обучающихся по направлению подготовки 31.05.03 Стоматология 2023 года набора очной формы обучения

Руководитель ОПОП ВО, декан факультета

Ивенский Н.И.

Методические указания по дисциплине «Общая хирургия» размещены в ЭИОС университета в авторской редакции

1. Цель Вам необходимо овладеть методикой определения групп крови и резус-фактора и научиться применять полученные знания и умения в своей будущей профессии врача

- 2. Учебные вопросы :**
1. Групповая система АВО и система резус
 2. Методы определения групп крови по системам АВО.
 3. Методы определения резус-фактора.
 4. Показания и противопоказания к гемотрансфузии

3. Теоретическая часть

АННОТАЦИЯ

1. Учение о группах крови человека

Термином группы крови человека обозначают иммунобиологические свойства крови, на основании которых всех людей независимо от пола, возраста, расы и географической зоны можно разделить на строго определенные группы.

Принадлежность к той или иной группе определяется наличием или отсутствием в клеточных и плазменных элементах крови человека соответствующих групповых антигенов. К настоящему времени у человека известно более 300 различных групповых антигенов крови, которые объединены в несколько групповых антигенных систем. Групповые антигены передаются по наследству и в течение жизни не меняются. Сочетание их индивидуально у каждого человека (у однояйцевых близнецов антигены крови идентичны).

Среди существующих групп крови различают групповые антигенные системы эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и плазменных белков. Однако понятие о группах крови, которым пользуются в клинической практике, включает только эритроцитарные антигены системы АВО и резус-фактор, так как они наиболее активны.

Дифференцировка крови на группы по системе АВО основана на четырех различных комбинациях двух агглютиногенов (антигенов) А и В в эритроцитах и двух агглютининов (антител) а и в сыворотке крови. За последние годы доказано, что имеются несколько подгрупп агглютиногенов. Из подгрупп агглютиногена А наиболее важны А₁ и А₂ (так же как и а₁В и А₂В). А₁ - сильный антиген, его находят примерно у 88% людей с А(II) группой крови. Если в эритроцитах имеется А₁ антиген, реакция агглютинации протекает быстро и резко выражена. А₂ - слабый антиген, его удельный вес примерно 12%; реакция агглютинации протекает слабо и труднозаметна. Антигены других подгрупп (А₃, А₄, А_о, А_х и др.) тоже слабые, их находят очень редко, практически их значение ничтожно. Агглютиноген В также имеет несколько подгрупп (В₁, В₂, В₃), их отличие только количественное и в практике они не принимаются во внимание.

Антигены А₁ и А₂ отличаются и по своей антигенной структуре, поэтому в плазме наряду с естественными агглютинидами встречаются и антитела (экстроагглютинины) а₁, которые реагируют только с эритроцитами группы А₁ и а₂, которые реагируют не только с эритроцитами группы А₂, но и с эритроцитами группы О.

У лиц первой группы (38-39%) эритроциты не содержат агглютиногенов А и В, поэтому группу крови обозначают символом 0(I), в сыворотке крови имеются агглютинины а и β. Формула -0(I)а, β.

Вторая группа крови (42-44%) характеризуется наличием в эритроцитах агглютиногена А, а в сыворотке агглютинина β. Формула А(II) β.

В эритроцитах третьей группы крови (12-14%) имеется агглютиноген В, в сыворотке агглютинин а. Формула В(III)а.

Четвертая группа крови (4-6%) является противоположностью первой - в эритроцитах имеются оба агглютиногена А и В, а соответствующие агглютинины в сыворотке отсутствуют. Формула АВ(IV)0.

Агглютинины а вызывают агглютинацию эритроцитов, содержащих агглютиноген А, а агглютинины β агглютинируют эритроциты, имеющие агглютиноген В. Одноименные агглютинины и агглютиногены в крови человека одновременно присутствовать не могут.

Долгие годы придерживались так называемого закона Отенберга, согласно которому агглютинируются только эритроциты перелитой донорской крови (а не эритроциты реципиента), учитывая, что агглютинины донорской крови разводятся в крови реципиента, и не способны агглютинировать его эритроциты. При очень большой кровопотере, когда требуется перелить крови больше, чем осталось в организме больного, агглютинины плазмы вливаемой крови могут агглютинировать эритроциты больного (исключение из правила Отенберга). Согласно этого закона на практике использовалась следующая схема: реципиенту 0(I) группы допустимо переливание донорской крови только 0(I) группы, реципиентам А(II) группы - донорской крови А(II) и 0(I) групп, реципиентам В (III) группы - донорской крови В (III), 0(I) групп, реципиентам АВ (IV) группы - донорской крови всех четырех групп. Доноров с 0(I) группой крови нередко называют "универсальными донорами", а реципиентов с АВ (IV) группой - "универсальными реципиентами".

Может случиться так, что одногруппная кровь донора и реципиента оказывается все-таки несовместимой. Например, если у реципиента группа крови А₁(II)β₂, а у донора А₂(II)β₁ при переливании крови наступает агглютинация, так как экстраагглютинины а₂ реципиента реагируют с донорским агглютиногеном А₂. Кроме того, в течение жизни индивидуума в результате сенсбилизации могут появиться иммунные агглютинины а и β (анти-А и анти-В антитела). Они могут быть причиной увеличения общего титра агглютининов до 1:152 и больше. В таких случаях агглютинины перелитой крови недостаточно разводятся в крови реципиента.

Цельная кровь и ее компоненты должны переливаться только той группы и той резус-принадлежности, которая имеется у реципиента. В исключительных случаях отсутствия одногруппной крови по системе АВО или ее компонентов и наличии экстренных показаний к переливанию допускается трансфузия крови группы 0(I), резус-отрицательной ("универсальный донор" реципиенту с любой группой крови в количестве до 500 мл, за исключением детей).

2. Резус-фактор, его практическое значение

Резус-фактор - иммунологическое свойство крови людей, обусловленное наличием агглютиногенов, присутствующих в эритроцитах человека независимо от четырех групп крови. Резус-фактор передается по наследству. При отсутствии у родителей резус-фактора его не может быть у детей. Наличие резус-агглютиногена выявляется у 3-4 месячного эмбриона и остается постоянным в течение всей жизни.

В последние годы доказано, что распределение людей на резус-положительных (примерно 85%) и резус-отрицательных (примерно 15%) весьма условно. Представление о резус-факторе не может быть ограничено одним только агглютиногеном Rh. Последний тесно связан с другим агглютиногеном, обозначаемым как Hг и составляет с ним общую систему Rh-Hг включающую три разновидности Rh агглютиногена – Rh₀, rh', rh'' и три разновидности Hг- агглютиногена – hr₀, hr', hr'' (номенклатура Винера). Применяется также номенклатура Фишера-Рейса, в которой агглютиногены Rh обозначаются прописными буквами O, C, E, а агглютиногены Hг - соответствующими строчными d, c, e (табл.3).

Таблица 3

Номенклатура Винера Номенклатура Фишера-Рейса

Rh ₀ - hr ₀	D - d
rh' - hr'	C - c
rh'' - hr''	E - e

Все агглютиногены системы Rh-Hr- являются антигенами: попадая в организм человека, они способны иммунизировать его, вызывая образование Rh-антител и Hr-антител различной активности, и реагировать с этими антителами.

Наибольшее практическое значение при переливании крови имеют агглютиногены Rh₀, rh', rh'' и hr'. Наиболее антигенен и является наиболее частой причиной изосерологических конфликтов антиген D (Rh₀), наиболее слаб - E (rh''). С этой точки зрения резус-принадлежность у реципиентов определяют по наличию антигена D (Rh₀), а другие антигены системы Rh- Hr не учитываются.

Однако оказывается, что в 2-3% случаев резус-отрицательная донорская кровь содержит в эритроцитах антигены C (rh') и E (rh''). В связи с этим к группе доноров с резус-отрицательной кровью должны относиться только лица, в эритроцитах которых нет антигена D (Rh₀), C (rh') и E (rh'').

Все лица с резус-отрицательной кровью одновременно являются RH-положительными, если имеют антиген hr'(c). Наличие антигена Hr заставляет предостеречь от трансфузий резус-отрицательной крови реципиентам с резус-положительной кровью или вообще без определения резус принадлежности больного.

У человека могут быть антигены обеих систем (Rh-Hr) или только одной системы, но нет таких людей, у которых не было бы одной из этих двух антигенных систем.

Несовместимость по резус-фактору при переливании крови даже в малых дозах может вызвать продукцию антител у реципиента. При повторных трансфузиях без учета резус-фактора у реципиента развивается внутрисосудистый гемолиз эритроцитов донора.

Механизм изоиммунизации, возникающий вследствие переливания резус-отрицательному реципиенту резус-положительной крови, таков: после переливания резус-несовместимой крови в сыворотке крови у него появляются антитела. При беременности резус-отрицательной женщины резус-положительным плодом его эритроциты проникают через плацентарный барьер, что приводит к выработке антител антирезус в ретикулярной системе матери и попаданию этих антител в сыворотку ее крови. Между матерью и плодом возникает "резус-конфликт". Затем антитела попадают от матери к плоду и разрушают его эритроциты.

Однако не все резус-отрицательные люди способны к изоиммунизации с последующей выработкой антител. Описаны резус-отрицательные индивидуумы, которым были произведены многократные переливания крови без последующей сенсibilизации. Этим объясняется и тот факт, что гемолитическая болезнь новорожденных может возникнуть у одной из 20 резус-отрицательных женщин, беременных резус-положительным плодом. Титр антител сохраняется 2-5 лет, иногда всю жизнь.

Особенностью резус-реакций является их медленное развитие и позднее проявление (через 1-2 часа после переливания). Как реакции, так и более тяжелые грозные осложнения выражаются той же клинической картиной, что и при трансфузии крови, несовместимой по группе и требуют тех же лечебных мероприятий.

Определение группы крови «простой реакцией»

Для определения группы крови простым методом необходимы 8 глазных пипеток (отдельная для каждой группы серии сыворотки), мелкая тарелка, флаконы с изотоническим раствором хлорида натрия и гемагглютинирующие сыворотки 4 групп двух серий.

Условия пригодности сывороток. Чтобы быть пригодной для определения группы, сыворотка должна удовлетворять определенным требованиям, а именно:

- 1) она должна быть специфичной, т. е. содержать только один определенный агглютинин - а или в, или оба вместе, и не должна давать никаких побочных реакций (панагглютинации);
- 2) сыворотка должна быть активной, т. е. агглютинины должны быть достаточно сильны и иметь титр не менее 1 : 32 с эритроцитами А₁ и В и не ниже 1 : 16 с эритроцитами А₂;
- 3) сыворотка должна быть светлой и прозрачной;
- 4) сыворотка должна иметь точную паспортизацию;
- 5) сыворотка должна быть хорошо предохранена от гниения либо абсолютно стерильным приготовлением, либо прибавлением консервирующих средств.

Определение крови с помощью стандартных сывороток называется «простой реакцией». Определение производится на тарелке, на которой восковым карандашом наносят обозначения групп сывороток. Сначала на тарелку наносят по 1—2 капли стандартных сывороток соответственно сделанным надписям в 2 ряда для двух различных серий. В каждую каплю сыворотки добавляют испытуемую кровь, взятую из пальца или из вены, и перемешивают покачиванием. Количество крови должно быть в 10—15 раз меньше, чем сыворотки. За реакцией наблюдают не более 5 минут, после чего делают заключение о группе крови по наличию агглютинации.

Агглютинация, образование «песка» в капле со смесью свидетельствуют о наличии группового антигена.

Двойная перекрестная реакция в сыворотке крови больного

Простой метод определения группового антигена (группы крови) уточняется в изосерологической лаборатории с помощью двойной перекрестной реакции — определением групповых антител а и в в исследуемой сыворотке. Они выявляются с помощью стандартных эритроцитов А и В, заготовленных от доноров, имеющих соответственно А (II) и В (III) группы крови.

В 2 отдельные капли сыворотки, нанесенные на тарелки, добавляют стандартные эритроциты групп А и В. Через 5 минут определяют результат по наличию агглютинации, которая выявляет агглютинин а в крови В (III) группы, агглютинин в в крови А (II) группы, агглютинины а и в в крови О (I) группы и отсутствие агглютинации в крови АВ (IV) группы.

Определение группы крови стандартными сыворотками капельным способом

Самым распространенным способом остается определение на плоскости. По этому способу можно производить реакцию агглютинации на любой плоскости - на простом стекле, фарфоровой или костяной пластинке, тарелке и т. д. Этот способ называется также капельным по характеру производства реакции в капле сыворотки. Для лучшего определения результатов реакции необходим белый фон, поэтому под стекло надо подкладывать белую бумагу. Белые фарфоровые пластинки и тарелки сразу дают нужный фон. Большие мелкие тарелки являются наиболее подходящей и доступной плоскостью для производства реакции агглютинации по капельному способу. Тарелки надо отбирать без рисунков, с хорошей ровной поверхностью внутреннего круга. Шероховатые, с волнистыми неровностями и покатостями тарелки не годятся.

Для производства реакции по капельному способу нужны следующие предметы:

Реактивы: а) стандартные сыворотки групп 0, А и В, б) 0,85% раствор NaCl.

Материалы: а) предметные стекла или тарелки, б) пипетки для сывороток и солевого раствора, в) пипетки для взятия крови, г) стеклянные палочки.

Кроме того, для взятия крови нужны: а) игла для взятия крови или заменяющий ее инструмент, б) эфир или денатурированный спирт, в) вата.

Прежде считалось, что для определения группы крови достаточно двух сывороток - А и В. Теоретически это верно, но практически в целях контроля оказалось необходимым

ввести еще одну сыворотку группы 0, так как возможность панагглютинации или, наоборот, слишком слабый титр эритроцитов иногда может дать повод к ошибкам с сыворотками А и В, и требуется контроль, который выполняется сывороткой 0.

Рекомендуется при определении группы крови пользоваться стандартными сыворотками группы 0, А и В двух различных серий, причем результаты реакции с одной серией и результаты с другой должны быть одинаковы.

Мы полагаем, что по вскрытии ампулы всякая сыворотка должна быть проверена в своей групповой принадлежности. Без этого ни одна сыворотка не может быть допущена к непосредственному употреблению. Эта проверка необходима не только во избежание ошибок, могущих произойти при разливе, но и потому, что титр сыворотки может настолько снизиться, что сделает ее негодной к употреблению. Проверку производят по стандартным эритроцитам или по цельной крови лиц с известной группой крови. Эти лица всегда должны быть в распоряжении лаборатории.

Пипетки для сыворотки и солевого раствора должны быть типа глазных, выпускающие каплю объемом 50-60 мм³. Каждая сыворотка имеет свою пипетку и смешение их не должно допускаться. Пипетки для взятия крови - типа пастеровских, с более узким капилляром, выпускающие каплю 5-6 мм³. Стекланные палочки имеют длину 12-15 см, концы их вытянуты конусом и слегка закруглены на огне.

На стол ставится деревянная колодка или штатив с углублениями, в которые вкладываются ампулы или пробирки с сыворотками 0 (слева), А (в середине) и В (справа). Вместо штатива сосуды с сыворотками можно ставить в отдельные стекланные стаканчики. В каждый сосуд с сывороткой опускается чистая сухая пипетка, которая остается там до конца исследования или истощения запаса сыворотки. Тут же устанавливают флакон с соевым раствором, денатурированный спирт, вата, в отдельном стакане - пипетки для крови и палочки. Перед исследующим на стол ставят тарелку или кладут предметные стекла, под которыми находится белая бумага.

Для производства реакции кровь берут обычным способом посредством легкого укола пальца или ушной мочки иглой для взятия крови. Из выступившей капли малой пипеткой или краем предметного стекла переносят три капли крови, величиной с булавочную головку (4-6 мм³), на поверхность стекла или тарелки, располагая эти капли подряд, на расстоянии 2-3 см одна от другой. Вслед за этим около или поверх левой капли выпускают на поверхность большую каплю (50-60 мм³) сыворотки 0, около или поверх средней капли крови - каплю сыворотки А и около или поверх правой - каплю сыворотки В. Сверху каждой капли следует обозначить соответствующую группу сыворотки. Каждую сывороточную пипетку после нанесения капли немедленно опускают в свой флакон.

Затем перемешивают кровь с сывороткой (в том же порядке) стеклнной палочкой или краем предметного стекла 10-15 секунд, пока смесь не примет равномерно розовый цвет. Для каждой капли надо брать чистую палочку или бывшую в употреблении, предварительно смочив ее в воде и высушив. Отмечают время начала реакции. После смешивания тарелку (или стекло) покачивают, но делают это осторожно и слегка, ни в коем случае не толчками.

Агглютинация проявляется обычно в первые секунды после смешения. Появляются мелкие кучки, которые при покачивании склеиваются в более крупные агрегаты, иногда в одну большую кучу в середине капли.

Независимо от результатов реакции через 2 минуты от начала смешения крови с сывороткой к каждой капле смеси прибавляют по большой капле (50-60 мм³) физиологического раствора хлористого натрия и покачивают при соблюдении приведенных выше правил. При покачивании надо наблюдать, чтобы смесь не растекалась по поверхности, а оставалась на своем месте.

Особенно нужно следить, чтобы две соседних смеси не приходили в соприкосновение. В противном случае реакцию приходится начинать сначала.

При положительной реакции еще до прибавления солевого раствора эритроциты склеиваются сначала в мелкие, а затем в более крупные кучки и хлопья диаметром 1 мм и более, по большей части неправильной формы. Сыворотка при этом совсем обесцвечивается. От прибавления солевого раствора кучки не должны исчезать. Исчезновение кучек в этом случае указывает на панагглютинацию, а не на истинную агглютинацию.

При отрицательной реакции смесь остается мутной и окрашенной в розовый цвет, без признаков скупивания. Иногда, вследствие слишком энергичного покачивания, вызывающего волнообразные колебания смеси, эритроциты теряют равномерность в распределении и образуют мраморный узор, но это явление исчезает от прибавления солевого раствора или от помешивания.

При работе с тремя сыворотками возможны восемь комбинаций положительных и отрицательных реакций, но из них только четыре истинных, определяющих группу.

При наличии одной из этих комбинаций реакцию надо повторить с новыми сыворотками. При производстве реакции на стекле надо предварительно надписать около каждой капли группу сыворотки - 0, А, В. Если стекло случайно и незаметно будет перевернуто, что нередко случается в руках, то надписи предохраняют от ошибок и недоразумений. Кроме того, на стекле пишут фамилию испытуемого.

Результаты реакции немедленно по выяснении заносятся в соответствующий документ - журнал, карточку, список, историю болезни и т. д. Запись группы отдельного лица в его документе сопровождается обозначением времени и места определения и скрепляется подписью врача, определявшего группу.

Определение группы крови стандартными сыворотками пробирочным способом

Описанный капельный метод при соблюдении всех правил и предосторожностей дает в опытных руках точные результаты и, будучи наиболее простым, является и наиболее распространенным. Однако при несоблюдении правил он легко может повести к ошибкам, почему некоторые исследователи считают его недостаточным и рекомендуют определение группы в пробирках. В некоторых лабораториях пробирочный метод введен в качестве основного.

Пробирки употребляются так называемые агглютинационные - диаметром 6-8 мм, высотой 8-10 см. Для производства реакции в штатив ставят рядом три пробирки. На каждой отмечается номер исследования и группа стандартной сыворотки, для которой пробирка предназначена. Затем в первую пробирку наливают 0,1 см³ (2 капли) сыворотки 0, во вторую пробирку - столько же сыворотки А и в третью - сыворотку В. Затем в каждую пробирку наливают по 0,2 см³ (4 капли) предварительно приготовленной 2% взвеси испытуемых эритроцитов. Каждую пробирку сильно встряхивают и через 3-5 минут подвергают центрифугированию. Последнее не обязательно, результаты реакции можно видеть и после простоя пробирок, но это требует больше времени.

Если производят центрифугирование, то оно должно продолжаться не менее двух минут при 2 000 оборотов в минуту. При наличии в центрифуге только малых гильз агглютинационную пробирку помещают в центрифужную, в которую перед тем налито немного воды, заполняющей свободное пространство и придающей малой пробирке необходимую устойчивость. Если же центрифуга имеет широкие гильзы, в каждую такую гильзу непосредственно можно поместить 4-6 агглютинационных пробирок. Понятно, что при таком способе пробирки должны быть хорошо отмечены во избежание путаницы в дальнейшем. Если центрифугирования не производят, пробирки оставляют стоять два часа. После центрифугирования или стояния пробирки осторожно встряхивают, тогда сразу бывает видно, образовались ли кучки или эритроциты распределились равномерно, образуя мутную взвесь, как вначале. Наличие кучек указывает на положительную реакцию, равномерная взвесь - на отрицательную. При сильной агглютинации, нередко проявляющейся вполне ясно до центрифугирования, эритроциты скупиваются на дне в

один большой комок, который при умеренном потряхивании всплывает в прозрачной жидкости. При сильном встряхивании этот комок распадается на несколько более мелких комочков. При менее сильных степенях агглютинации в пробирке видны различной величины кучки, из которых более крупные после потряхивания быстро опускаются на дно пробирки, а сама сыворотка светлеет. Во всяком случае, положительный результат резко отличен от результата отрицательного, при котором после несильного встряхивания смесь делается мутной и следов кучек не видно.

Группу определяют по той же табл., которая применяется для капельного способа. Несоответствие результатов, указанное в последующей таблице, также указывает на недочеты реакции и на необходимость провести реакцию вновь.

Дополнительное определение группы крови стандартными эритроцитами

Для этого применяют те же самые методы, с той лишь разницей, что на стекло или в пробирку помещают не стандартные сыворотки, а одну и ту же сыворотку испытуемой крови - 3 капли на стекло или по 0,2 см³ в каждую из трех пробирок. К первой порции сыворотки прибавляют стандартные эритроциты группы О, ко второй - эритроциты группы А, к третьей - эритроциты группы В. Все эритроциты прибавляют в описанном выше виде и количестве, т. е. при капельном способе - по 4-5 мм³ неразведенной крови, при методе в пробирках - по 0,2 см³ 2% взвеси. Наблюдение за реакцией производят совершенно так же, как описано выше.

Наличие признаков положительной реакции с эритроцитами группы О имеет важное значение: оно может указывать на панагглютинирующую способность сыворотки, но скорее указывает на неправильность выбора эритроцитов или на допущенную ошибку. При малейших признаках агглютинации с эритроцитами группы О всю реакцию надо повторить сначала с эритроцитами других лиц и точно установить причины образования кучек.

При оценке этой пробы нельзя забывать о возможности отсутствия изоагглютининов или об очень слабом титре их, что может служить источником ошибок. Поэтому определение группы крови только по одной сыворотке испытуемой крови никогда не может быть достаточным для выявления групповой характеристики.

Если нужно определить группу по сыворотке (или плазме) человека, то кровь можно взять из места укола в количестве 1 см³ в пробирку, где ее оставляют свертываться. При таком небольшом количестве кровь свертывается через 1-2 часа.

Центрифугирование облегчает дальнейшее отсасывание сыворотки, которую пипеткой переносят прямо на стекло, тарелку или пробирку для реакции. Эритроциты для реакции можно брать из оставшегося свертка другой пипеткой.

Если взять кровь в смеси с цитратно-солевым раствором, то слой плазмы, образовавшийся после отстаивания или центрифугирования, вполне пригоден для всех реакций.

Определение подгрупп А₁ и А₂

Такое определение может быть произведено только после того, как определена основная группа (А или АВ). Правда, иногда по слабости и медленности основной реакции можно предположить о наличии подгруппы А₂ или А₂В, но все же надежных методов для быстрого определения подгруппы «сразу» нет. Чтобы определить подгруппу, надо иметь специальную сыворотку. Наилучший способ ее получения - это абсорбирование сыворотки В эритроцитами подгруппы А₂, которые поглощают излишек а-агглютинина, необходимый для агглютинирования эритроцитов А₂. После центрифугирования сыворотка отсасывается и служит для определения подгрупп. Такая сыворотка называется анти-А₁, так как агглютинирует только эритроциты А₁. Отсутствие агглютинации означает, что кровь группы А или АВ принадлежит к подгруппе А₂ или соответственно А₂В. Этот способ следует считать наилучшим, но для него необходимо иметь точно установленное и проверенное донора подгруппы А₂.

ИНСТРУКЦИЯ
работы с картами «DiaClon ABO/D+reverse grouping»
(карты для определения группы крови по системам ABO перекрестной реакцией
и резус-фактора), каталожный номер 001234 с моноклональными антителами

В данных картах ДиаМед находится 6 микропробирок, заполненных гелем.

Состав:

- в первых трех микропробирках «А», «В» и «D» содержится гель с антисыворотками и они предназначены для определения антигенов А, В, и резус-фактора (D).
- cтl – контроль качества карт (всегда должен быть отрицательный, т.е. без агглютинации)
- в последних двух микропробирках «A₁» и «B» содержится нейтральный гель, в которые необходимо добавить стандартные эритроциты.

Предназначены для перекрестной реакции – определения естественных антител анти-А и анти-В.

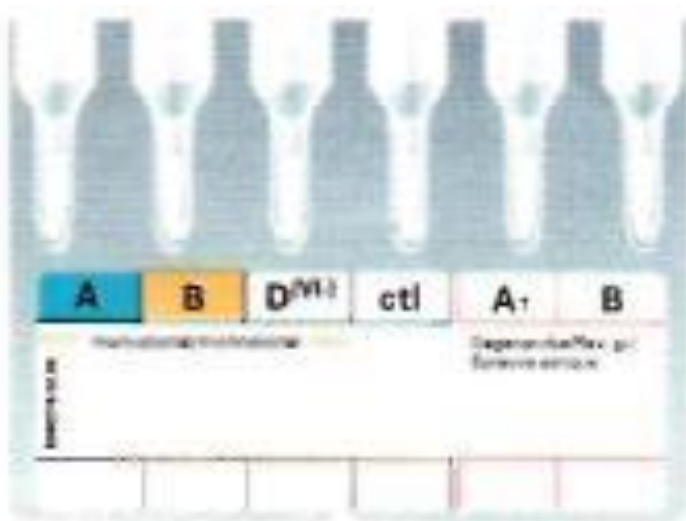


Рис. 1 Карта ДиаМед

Работа с картами.

1. Включить центрифугу.
2. Подготовить отцентрифугированную кровь, без сгустка.
3. Промаркировать карту (ФИО пациента или номер пробирки с кровью).
4. Снять фольгу со всех микропробирок.
5. Пробы вносить пипеткой на край пробирки, не затрагивая гель.
6. Внести по 50 мкл (по 1 капле из пипетки по флакончиках) стандартных эритроцитов (каталожный номер 003624) из флакончиков анти-А и анти-В в последние две микропробирки.
7. Внести по 50 мкл сыворотки или плазмы в эти же микропробирки.
8. Внести в простую пробирку на 5-10 мл (центрифужная, любая стеклянная, пластиковая) 500 мкл раствора ID-Diluent (каталожный номер 009260) и добавить 50 мкл цельной крови (или 25 мкл эритроцитарной массы). Это рабочая суспензия.
9. Рабочую суспензию по 12,5 мкл внести в первые 4 микропробирки.

10. Карты поставить в центрифугу, уравновесить, если есть необходимость (например, одна карта), нажать на «старт».
11. Центрифугирование длится 10 мин и после автоматического отключения необходимо оценить степень агглютинации в геле.

Интерпретация результатов.

При наличии антигена А, В, D на эритроцитах на поверхности геля образуются агглютинаты, т.к. не проходят через гель из-за большого размера (положительный результат).

При отсутствии антигена в исследуемом образце эритроциты не образуют агглютинатов с антисывороткой, при центрифугировании легко проходят через гель и оседают на дне.

На рис. 1 в нижних ячейках обозначена степень агглютинации от 1 до 4. В основном данные ячейки заполняются «+» или «-» в связи с тем, что степень агглютинации в клинике не важна.

I группа	II группа	III группа	IV группа
Отсутствуют антигены А и В, присутствуют естественные антитела анти-А и анти-В.	Есть антиген А, отсутствует антиген В, естественные антитела анти-А отсутствуют, анти-В присутствуют.	Есть антиген В, отсутствует антиген А, естественные антитела анти-А присутствуют, анти-В отсутствуют.	Есть антиген А и антиген В, естественные антитела анти-А и анти-В отсутствуют.
В первых двух микропробирках «А» и «В» агглютинаты на дне микропробирки. В последних двух микропробирках анти А ₁ и анти В агглютинаты остаются на поверхности геля	В микропробирке «А» агглютинаты наверху, в «В» - внизу. В последних анти А ₁ – внизу, анти-В - наверху	В микропробирке «А» агглютинаты внизу, в «В» - наверху. В последних анти А ₁ – наверху, анти-В - внизу	В первых микропробирках «А» и «В» агглютинаты наверху. В последних микропробирках анти А ₁ и анти-В - агглютинаты внизу
A B D ctl A ₁ B	A B D ctl A ₁ B	A B D ctl A ₁ B	A B D ctl A ₁ B
- - + - + +	- + - + - - +	- + + - + -	+ + + - - -

Рис. 1 Степени агглютинации

3.ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗУС-ФАКТОРА

Определение резус-фактора методом конгломинации

Существует несколько методов определения Rh-фактора. Наиболее распространен метод конгломинации на чашках Петри. Для этого исследования, кроме глазных пипеток и флакона с изотоническим раствором хлорида натрия, необходимо иметь чашки Петри, водяную баню с постоянной температурой 46—48°C и стандартные ан-тирезусные сыворотки всех групп системы АВО. Для анализа берут антирезусную сыворотку двух серий, одногруппную по системе АВО с исследуемыми эритроцитами. В чашку Петри наносят по 2 капли антирезусной сыворотки, слева — одной серии, справа — другой в 3 ряда для 3 исследований. В каждую серию прибавляют по капле эритроцитов (исследуемые, контрольные Rh-положительные и контрольные Rh-отрицательные). После

перемешивания чашку Петри помещают в водяную баню на 10 минут, после чего рассматривают в проходящем свете.

Наличие агглютинации свидетельствует о положительном результате, отсутствие ее - об отрицательном. Для контроля в этом методе используют заведомо Rh-отрицательные и Rh-положительные эритроциты.

Определение резус-фактора экспресс-методом

В последнее время для определения резус-принадлежности применяют экспресс-метод. Реакцию проводят в пробирках без подогрева. Для этого необходима специальная, универсальная для всех групп крови системы АВО сыворотка, приготовленная особым способом на полиглюкине.

В пробирку помещают 1 каплю сыворотки, добавляют 1 каплю исследуемых эритроцитов и после 3-минутного покачивания заливают 3-5 мл изотонического раствора хлорида натрия, трижды переворачивают пробирку и определяют результат в отраженном свете. Наличие агглютинации свидетельствует о наличии Rh-антигена.

Определение резус-фактора желатиновым экспресс-методом

Широко применяется также желатиновый экспресс-метод, основанный на добавлении к крови 1 капли 10 % раствора желатина и 10-минутной инкубации пробирок при +37°C и добавлении теплого изотонического раствора хлорида натрия; производят перемешивание содержимого пробирки. Желатин способствует исчезновению неспецифической агглютинации.

На этом же принципе основан метод определения Rh с папаином.

Любой из этих методов может быть использован в экстренных случаях. Независимо от результатов проведенных исследований и имеющихся данных об идентичности групп крови донора и реципиента перед переливанием крови необходимо провести пробы на индивидуальную совместимость.

4. Показания и противопоказания к гемотрансфузии

Для определения показаний к гемотрансфузии необходимо знать механизм влияния на организм пациента перелитой крови.

Механизм действия перелитой крови

Биологические эффекты гемотрансфузии обусловлены сложнейшими регуляторными механизмами. Перелитая кровь действует на элементы нервной рецепции, а также ферментные и гормональные системы обмена, изменяя его на всех уровнях: от молекулярного до органно-тканевого.

Перелитая кровь оказывает на организм реципиента следующие эффекты:

- заместительный;
- гемодинамический;
- иммунологический;
- гемостатический;
- стимулирующий.

Заместительный эффект

Заместительное действие заключается в возмещении утраченной организмом части крови. Введенные в организм эритроциты восстанавливают объём крови и её газотранспортную функцию. Лейкоциты повышают иммунные способности организма. Тромбоциты корректируют систему свёртывания крови. Плазма и альбумин обладают

гемодинамическим действием. Иммуноглобулины плазмы создают пассивный иммунитет. Факторы свёртывания крови и фибринолиза регулируют агрегатное состояние крови. Вводимые вместе с кровью питательные вещества (жиры, белки и углеводы) включаются в цепь биохимических реакций.

Эритроциты перелитой крови функционируют в сосудистом русле реципиента до 30 сут и более. Клетки белой крови покидают сосудистое русло вскоре после переливания, белки плазмы донорской крови циркулируют в сосудистом русле реципиента 18—36 дней.

Гемодинамический эффект

Переливание крови оказывает всестороннее воздействие на сердечно-сосудистую систему. У больных с острой кровопотерей и травматическим шоком оно приводит к стойкому увеличению ОЦК, увеличению венозного притока к правым отделам сердца, усилению работы сердца и повышению минутного объёма крови.

Улучшается микроциркуляция: расширяются артериолы и вены, раскрывается сеть капилляров, в них ускоряется движение крови, сокращаются артериовенозные шунты, в результате чего редуцируются в сосудистом русле реципиента 18-36 дней.

минутного объёма крови.

Улучшается микроциркуляция: расширяются артериолы и вены, раскрывается сеть капилляров, в них ускоряется движение крови, сокращаются артериовенозные шунты, в результате чего редуцируется утечка крови из артериальной системы в венозную. Через 24—48 ч после переливания крови у реципиента начинается усиленный приток тканевой лимфы в кровеносное русло, что также увеличивает ОЦК. Поэтому иногда после трансфузии прирост ОЦК превосходит объём перелитой крови.

Иммунологический эффект

Гемотрансфузия усиливает иммунологические свойства организма реципиента. За счёт введения гранулоцитов, макрофагов, лимфоцитов, компонентов комплемента, иммуноглобулинов, цитокинов, различные антибактериальных и антитоксических антител возрастает фагоцитарная активность лейкоцитов, активизируется образование антител.

Особенно высоким иммунобиологическим действием обладают гипериммунные препараты плазмы, полученные от иммунизированных доноров, — антистафилококковая, антисинегнойная и противоожоговая плазма, иммуноглобулины направленного действия (анти-стафилококковый, противокклюшный, противостолбнячный иммуноглобулины и др.).

Гемостатический эффект

Переливание крови оказывает стимулирующее действие на систему гемостаза реципиента, вызывая умеренную гиперкоагуляцию, обусловленную увеличением тромбопластической и снижением антикоагулянтной активности крови. Переливание небольших доз (обычно 250 мл) тёплой крови или крови с малым сроком хранения (до 3 сут) оказывает гемостатическое действие благодаря активности вводимых с ней тромбоцитов и прокоагулянтов — факторов свёртывающей системы.

Особым гемостатическим действием обладают специальные виды плазмы (например, антигемофильная) и гемостатические препараты (фибриноген, криопреципитат, протромбиновый комплекс, тромбоцитарная масса и плазма, обогащённая тромбоцитами).

В то же время переливание массивных доз донорской крови в отдельных случаях может нарушить гемостатический баланс вплоть до развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови (ДВС-синдрома).

Стимулирующий эффект

После переливания крови в организме развиваются изменения, аналогичные стрессу. Происходит стимуляция гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, что подтверждается увеличением содержания кортикостероидов в крови и моче реципиентов в посттрансфузионном периоде. У реципиентов повышается основной обмен, увеличивается дыхательный коэффициент, усиливается газообмен. Переливание крови оказывает стимулирующее действие на факторы естественного иммунитета: повышаются фагоцитарная активность гранулоцитов и образование антител в ответ на действие тех или иных антигенов.

Абсолютные и относительные показания к гемотрансфузии

Все показания к переливанию крови и её компонентов можно разделить на абсолютные и относительные.

Абсолютные показания

К абсолютным показаниям относят случаи, когда выполнение гемотрансфузии обязательно, а отказ от неё может привести к резкому ухудшению состояния больного или его смерти.

К абсолютным показаниям относят следующие:

- острая кровопотеря (более 21% ОЦК);
- травматический шок I—III степени.
- обширные операции с большой интраоперационной кровопотерей.

Относительные показания

Все остальные показания к гемотрансфузии, когда переливание крови играет лишь вспомогательную роль среди других лечебных мероприятий, считают относительными.

Основные относительные показания к гемотрансфузии:

- анемия;
- заболевания воспалительного характера с тяжёлой интоксикацией;
- продолжающееся кровотечение;
- нарушения свёртывающей системы крови;
- снижение иммунного статуса организма;
- длительные хронические воспалительные процессы со снижением регенерации и реактивности;
- некоторые отравления.

Учитывая распространённость кровезамещающих препаратов, выполняющих большую часть функций крови, в настоящее время основным относительным показанием к гемотрансфузии считают анемию. Считают, что переливание крови становится методом выбора при снижении содержания гемоглобина ниже 80 г/л, а гематокрита — ниже 30%.

Противопоказания к гемотрансфузии

Гемотрансфузия связана с введением в организм значительного количества продуктов распада белков, что приводит к увеличению функциональной нагрузки на органы дезинтоксикации и выделения. Введение дополнительного объёма жидкости в сосудистое русло существенно увеличивает нагрузку на сердечно-сосудистую систему.

Гемотрансфузия приводит к активизации всех видов обмена в организме, что может привести к обострению и стимуляции патологических процессов (хронических воспалительных заболеваний, опухолей и пр.).

Выделяют абсолютные и относительные противопоказания к переливанию крови.

Абсолютное противопоказание к гемотрансфузии — острая сердечно-лёгочная недостаточность, сопровождающаяся отёком лёгких.

Однако при массивной кровопотере и травматическом шоке II— III степени абсолютных противопоказаний для переливания нет, и кровь следует переливать всегда.

Относительные противопоказания: свежие тромбозы и эмболии, тяжёлые расстройства мозгового кровообращения, ишемическая болезнь сердца, септический эндокардит, пороки сердца, миокардиты с недостаточностью кровообращения I-II степени, гипертоническая болезнь III стадии, тяжёлые функциональные нарушения печени и почек, серьёзные аллергические заболевания (бронхиальная астма, поливалентная аллергия), остротекущий и диссеминированный туберкулёз, ревматизм, особенно с ревматической пурпурой. При указанных заболеваниях прибегать к гемотрансфузии следует с особой осторожностью.

Задание 1

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Вы определяете группу крови больного двумя сериями стандартных сывороток I (0), II (A) и III (B) групп. Во всех трех парах капле получена агглютинация.

Какая группа крови у больного? Какая может быть допущена ошибка? Как этой ошибки избежать?

Задача 2

У больного в процедурной производится определение группы крови по системе ABO. В помещении довольно холодно: температура воздуха около + 15° С. Испытуемая кровь дала реакцию изогемагглютинации со стандартными сыворотками I (0), II(A) и III(B) групп.

Какая группа крови у данного больного? Какая может быть в данных условиях допущена ошибочная трактовка групповой принадлежности крови? Какими способами можно исключить все ошибки при определении группы крови в данном конкретном случае?

Задача 3

При определении группы крови больного студент VI курса взял по 2 серии стандартных гемагглютинирующих сывороток I, II и III групп, добавил к ним по капле исследуемой крови, размешал, обнаружил наличие агглютинации с сыворотками I, II и III групп.

Какая группа крови у больного? Докажите, насколько правомерно Ваше заключение.

Задание 2

ТЕСТЫ

1. Какая группа крови у пациента, если при определении с ЦОЛИКЛОНОМ отмечается агглютинация с сыворотками «анти-A» и «супер-D»

1. II Rh⁺ * 2. II Rh⁻ 3. IV Rh⁺ 4. IV Rh⁻ 5. I Rh⁻

2. Агглютинины α и β содержатся в

1. Нормобластах. 2. Плазме.* 3. Тромбоцитах.

4. Лейкоцитах. 5. Эритроцитах.

3. Агглютиногены содержатся в

1. Лейкоцитах. 2. Эритроцитах.* 3. Тромбоцитах.
4. Нейтрофилах. 5. Плазме.

4. Группы крови открыты

1. В. Дэвидсом и С. Хелингом. 2. В. Юревичем и М. Розенгартом.
3. К. Ландштейнером и Я. Янским * 4. И. Буяльским.
5. Н.И. Пироговым.

5. Какая группа крови при агглютинации с 0(I) и А (II) сыворотками

1. Первая. 2. Вторая. 3. Третья.* 4. Четвертая.
5. Ошибка при определении.

6. Какая группа крови при агглютинации с 0(I) и В (III) сыворотками

1. Первая. 2. Вторая.* 3. Третья. 4. Четвертая.
5. Ошибка при определении

7. При определении группы крови исследуемая кровь и сыворотка берутся в соотношении

1. 1:1 2. 1:2 3. 1:3 4. 1:10* 5. 1:20

8. Третья группа крови содержит

1. Агглютинины α и β . 2. Агглютиногены А и В. 3. Агглютиноген В и агглютинин α .*
4. Агглютиноген А и агглютинин β .
5. Не содержит агглютининов и агглютиногенов.

9. Холодовая панагглютинация может наступать при температуре

1. 24-25°C 2. 17-18°C 3. 13-14°C* 4. 20-22°C

10. При определении группы крови с помощью стандартных гемагглютинирующих сывороток, если исследуется кровь В (III), агглютинация наблюдается в каплях с сывороткой

1. 0(1), А (II), В (III), АВ (IV) 2. 0(1), АВ (IV)
3. 0(1), А (II), АВ (IV) 4. 0(1), А (II) * 5. В (III)

4. Вопросы для собеседования

1. Что такое реакция гемагглютинации?
2. Что такое псевдоагглютинация, панагглютинация?
3. Контроль стандартных сывороток на годность?
4. Как определить группу крови?
5. Как определить резус-фактор?
6. Техника п/к и в/м инъекций?
7. Техника в/в инъекций?
8. Техника заполнения системы для переливания?
9. Существует ли «универсальный» донор и реципиент?