

**ЛЬВІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ФІЗИЧНОЇ КУЛЬТУРИ**



**ЗДОРОВИЙ СПОСІБ ЖИТТЯ**  
**ЗБІРНИК НАУКОВИХ СТАТЕЙ**  
**ВИПУСК 50**



**ЛЬВІВ – 2010**

О.І. МОЛИГОН, П.В. ГРИЗА

**ІНОВАЦІЙНІ ТЕХНОЛОГІЇ ОБСТЕЖЕННЯ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ**

*У статті викладені сучасні інноваційні технології обстеження донорської крові на групову та резус приналежність, рівень вільного гемоглобіну в крові, виявлення гемотрансмісивних інфекцій в сироватці донорської крові.*

*Ключові слова: донорська кров, групи крові, гемоглобін, гемотрансмісивні інфекції, визначення, інновації.*

*В статье изложены современные инновационные технологии обследования донорской крови на групповую и резус принадлежность, уровень свободного гемоглобина в крови, определение гемотрансмиссивных инфекций в донорской крови.*

*Ключевые слова: донорская кровь, уровень свободного гемоглобина, гемотрансмиссивные инфекции, определение, инновации.*

*In the article modern innovative technologies of inspection of donor blood are expounded on a group and rhesus belonging, level of free haemoglobin in blood, determination of transfusion infections in donor blood.*

*Key words: donor blood, level of free haemoglobin, transfusion infections, determination, innovations.*

В закладах служби крові, лікувально-профілактичних установах України постійно впроваджуються інноваційні технології обстеження крові, розроблені на основі сучасних досягнень науки. Сьогодні визначення груп крові та резус-фактору в донорів та реципієнтів проводиться за допомогою групових і антирезусних сироваток, моноклональних реагентів анти-А, анти-В, антирезус Д, С, Е. Встановлення групової та резус-приналежності крові потребує тривалого часу для їх визначення (підготовчі процедури, застосування контрольних реагентів, стандартних еритроцитів, потреба в зберіганні при відповідних температурних режимах, тощо). Інноваційна технологія „SERAFOL ABO+D” (Німеччина) визначення групи крові та резус-фактору у донорів представляє собою картки з нанесеними моноклональними антитілами анти-А, анти-В, антирезус Д з відповідним маркуванням. Картка „SERAFOL ABO+D” має 4 реакційних поля: одне з них покрите реагентом анти-А (клон А 003  $\geq$  200 МО/мл), друге - реагентом анти-В (клон В 005  $\geq$  200 МО/мл), третє – реагентом анти-Д (клон BS 226 титр  $\geq$  1: 32), четверте поле використовується для контролю. Нанесені на картку антитіла мають високу активність і специфічність.

В основі визначення групи крові та резус-фактору є реакція гемаглютинації типоспецифічних антитіл з антигенами еритроцитів. При наявності в досліджуваних еритроцитах донора відповідних антигенів настає реакція гемаглютинації.

Термін придатності картки „SERAFOL ABO+D” становить 2 роки при температурі зберігання 18-20°C. Після відкриття фольгової упаковки картка може бути використана протягом 7 діб.

Для визначення групи крові та резус фактору D необхідно мати:

- ізотонічний розчин натрію хлориду;
- піпетки разового використання;
- капілярну, венозну кров, консервовані донорські еритроцити.

Нами були проведені визначення групи крові та резус-фактору у 50 зразках крові хворих та донорів різних серологічних груп за системою АВО та резус-фактором. Дослідження проводились в лабораторії серології ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України». Досліджувані зразки крові були розділені на 4 серії. Порівняльні дослідження проводились наступними методами:

- стандартними груповими і антирезусною анти-D сироватками;
- моноклональними анти-А, анти-В, анти Rh D реагентами (антитілами);

- «SERAFOL ABO+D» картками.

Результати тестування представлені в таблиці 1.

Таблиця 1.

**Результати порівняльного тестування зразків донорської крові на групу крові і резус фактор**

№ Серії	Кількість визначень за допомогою стандартних групових та антирезус D сироваток	Порівняльні методи визначення		Група крові	Резус фактор	Співпадіння, %
		Моноклональні анти-А, анти-В, анти Rh D реагенти	«SERAFOL ABO+D» картки			
1.	17	17	17	12 0(I)	Rh +	100
				5 0(I)	Rh -	100
2.	18	18	18	14 A(II)	Rh +	100
				4 A(II)	Rh -	100
3.	10	10	10	8 B(III)	Rh +	100
				2 B (III)	Rh -	100
4.	5	5	5	3 AB(IV)	Rh +	100
				2 AB(IV)	Rh -	100
Всього	50	50	50	50	37 Rh + 13 Rh -	100

Отримані дані показали 100% співпадіння результатів тестування (табл 1). Крім цього були встановлені причини, які могли б вплинути на якість визначення груп крові та резус фактору за допомогою карток «SERAFOL ABO+D». Встановлено, що деякі проби крові можуть давати хибнопозитивну аглютинацію, причинами якої можуть бути:

- нанесення краплі досліджуваної крові безпосередньо на реакційне поле картки без попереднього нанесення ізотонічного розчину хлориду натрію.
- малі, або надто великі краплі досліджуваної крові;
- низька концентрація еритроцитів у краплі крові (менше 40% в еритрозависині);
- кров з гематокритом нижче 15%;
- протермінованість картки «SERAFOL ABO+D» та її неналежне зберігання.

Формування хибної аглютинації може бути у хворих на плазмацитому, онкозахворювання, порушення системи зсідання крові, або в випадках коли хворий отримував гепарин, плазмозамінники (декстран, гідроксиетилмодифікований крохмаль), наявність холодних аутоантитіл з високотемпературною амплітудою.

Позитивним моментом застосування даного методу є те, що він не потребує підготовчих процедур, скорочується термін тестування крові, одномоментність визначення групи крові і резус фактору D. Швидка і виразна гемаглютинація (30- 60 сек), яка не потребує застосування контрольних реагентів, гігієнічність процедури (результат дослідження покривається захисною плівкою), під'єднання картки з результатами дослідження крові до історії хвороби та іншої медичної документації, достатній термін придатності (2 роки), зберігання при кімнатній температурі. На підставі проведеного дослідження нами підготовлено інформаційний лист з рекомендацією застосування картки «SERAFOL ABO+D» як експрес-метод визначення груп крові та резус-фактору D в закладах служби крові та лікувальних установах України.

Однією із основних проблем в службі крові є виявлення маркерів гемотрансмісивних інфекцій. В закладах служби крові, лікувально-профілактичних установах України визначення маркерів вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ 1/2), гепатовірусів В, С, сифілісу проводиться за допомогою реакції імуноферментного аналізу (ІФА).

ІФА – високочутливий та специфічний метод дослідження, який добре зарекомендував себе впродовж останніх років. Але для його застосування необхідна спеціалізована лабораторія, дороге обладнання, апаратура та медичний персонал з відповідною кваліфікацією. Оскільки дослідження одиночних сироваток донорської крові

методом ІФА економічно не вигідно, імунологічні лабораторії проводять накопичення зразків сироваток для їх одночасного дослідження, що часто збільшує терміни отримання результатів. За таких умов застосування експрес-методу діагностики гемотрансмісивних інфекцій в донорській крові має низку переваг:

- термін дослідження становить 15-20 хвилин;
- відсутність потреби дорогого обладнання;
- простота і зручність у застосуванні;
- можливість тестування одного зразка донорської крові.

Метою нашого дослідження було вивчення ефективності та можливості застосування швидких імунохроматографічних (ІХА) тестів фірми «Фармаско» з визначення маркерів ВІЛ 1/2, гепатовірусів В (ВГВ), С (ВГС) у порівнянні з імуноферментним методом (ІФА).



Схема виконання ІХА – тесту.

Принцип методу ІХА для визначення антигенів вірусів полягає в тому, що при розміщенні досліджуваної сироватки крові в вікні планшетки вона починає мігрувати уздовж смужки за принципом тонкошарової хроматографії (рухлива фаза). Якщо в сироватці крові присутній досліджуваний антиген (антитіло) відбувається зв'язування його з типоспецифічними антитілами (антигенами) і барвником. У зоні контролю ІХА-смужки завжди появляється яскраво червоне забарвлення. Антигени (антитіла), які не зв'язалися з барвником, продовжують мігрувати далі уздовж смужки і неминуче взаємодіють із антитілами (антигенами), які сконцентровані в зоні тесту, де появляється друга червона смуга. У зв'язку з таким розподілом, на планшетці, з'являються забарвлені смужки (у зоні контролю – завжди, у зоні тесту – лише при позитивному результаті). Результати дослідження визначаються візуально, або за допомогою комп'ютерної обробки сканованого зображення планшетки. Дані порівняльного тестування представлені в табл.2.

Результати порівняльного тестування сироватки крові

Таблиця 2

Назва інфекції	Всього обстежень	ІХА (швидкі тести)		ІФА		Співпадіння результатів %
		позитивні	від'ємні	позитивні	від'ємні	
НІВ	10	0	10	0	10	100,0
ВГВ	113	5	108	5	108	100,0
ВГС	114	2	112	6	108	99,97

Проведене порівняльне тестування сироватки донорської крові показало 100% співпадіння результатів при визначенні маркерів ВІЛ 1/2, ВГВ і на 99,97% маркерів ВГС. застосування в закладах служби крові та лікувально-профілактичних установах швидких імунохроматографічних тестів фірми «Фармаско» для визначення маркерів ВІЛ 1/2, гепатовірусів В,С. Одержані, методом ІХА, позитивні результати повинні бути підтверджені в ІФА за допомогою діагностичних тест-систем.

Відомо, що вільний гемоглобін – це гемоглобін еритроцитів, які закінчили свій життєвий цикл. Вміст вільного гемоглобіну в плазмі крові змінюється в залежності від інтенсивності руйнування еритроцитів. Так, при гемолітичній анемії відбувається масова загибель і розпад еритроцитів, що і викликає гемоглобінемію. Такий стан може виникнути при інших станах (отруєння, гемолітична хвороба новонароджених, переливання людині крові іншої групи, ДВЗ-синдром тощо).

Вільний гемоглобін не має токсичної дії, але при його переході в метгемоглобін під дією деяких гемолізуючих факторів виникає метгемоглобінемія і метгемоглобінурія, які викликають важкі порушення тканинного дихання, функції нирок внаслідок гемоглобінурійного нефрозу. За аналогією з гемоглобінемією і гемоглобінурією спостерігається міоглобінемія і міоглобінурія з такими ж наслідками. Найчастіше це виникає при травматичних ушкодженнях великих м'язових масивів. Міоглобінурія може спостерігатись при дифузних запальних процесах, хронічних інтоксикаціях, міолізі (дерматоміозит, алкоголізм тощо).

Вільний гемоглобін консервованої донорської крові, ЕМ при проведенні масивних гемотрансфузій може давати патологічний ефект, аналогічний тому, що виникає при внутрішньосудинному гемолізі. При трансфузії еритроцитів в кров'яне русло реципієнта може потрапляти значна деяка кількість вільного гемоглобіну. Так, при трансфузії ЕМ у дозі до 1500,0 мл в кров'яне русло хворого може бути введено від 0,3 до 1,2 г вільного гемоглобіну. У здорових людей вміст вільного гемоглобіну становить до 0,1 г/л.

Гемоглобінемія в концентрації 2 г/л і більше може бути встановлена візуально за інтенсивністю забарвлення плазми досліджуваної крові. Для кількісного визначення низької концентрації гемоглобіну у зразках плазми, сироватки крові, водних розчинах, зразках еритроцитарної маси застосовується аналізатор HemoCue Plasma/Low Hb (виробник фірма HemoCue, Швеція). Аналізатор зареєстрований в Україні (Наказ МОЗ України від 03 грудня 2009 р. № 917. Свідоцтво про державну реєстрацію № 9164/2009). Аналізатор HemoCue Plasma/Low Hb може використовуватись тільки з мікрокуветами HemoCue Plasma/Low Hb виключно для *in vitro* діагностики.

Система HemoCue Plasma/Low Hb складається з одноразових мікрокувет, що містять сухі реагенти, та фотометра. Мікрокувета приладу використовується як реакційна ємність та вимірювальна кювета. Вимірювання здійснюється в аналізаторі, після чого результат дослідження з'являється на дисплеї. Система відкалібрована виробником аналізатора за допомогою гемоглобінціанідного методу, що є загальноприйнятим для визначення концентрації гемоглобіну (ICSH). Система вимірює показник у межах 0,3-30,0 г/л (0,03-3,00 г/дл; 30-3000 мг/дл; 0,02-1,90 ммоль/л). Прилад автоматично коригує мутність, зумовлену наявністю ліпідів або лейкоцитів і не потребує додаткового калібрування.

Аналізатор опробований у лабораторії технології трансфузійних препаратів ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України».

***Аналізатор застосовується для:***

- визначення рівня гемоглобіну в іригаційних розчинах при хірургічних процедурах та оперативних втручаннях з можливістю визначення крововтрати, що дозволяє прийняти адекватне рішення щодо проведення гемотрансфузії під час оперативного втручання;

- кількісна оцінка внутрішньосудинного гемолізу у хворих опікового, гематологічного, токсикологічного, травматологічного, інфекційного профілів, тощо;

- визначення ступеня гемолізу донорської крові, її компонентів для оцінки придатності для проведення гемотрансфузії;
- вимірювання рівня гемоглобіну в сечі при гемоглобінурії;
- визначення концентрації гемоглобіну в плазмі після фізичних навантажень, стресів, голодування (космічна, військова, спортивна медицина).

**Принцип методу вимірювання на аналізаторі HemoCue Plasma/Low Hb полягає в наступному:** еритроцити крові під дією натрію дезоксихолату піддаються гемолізу, в результаті якого вивільняється гемоглобін, який під дією нітриту натрію перетворюється в метгемоглобін та, контактуючи з азидом, утворює азидметгемоглобін. В аналізаторі застосовується двоххвильовий метод (довжина хвилі 570 та 880 нм) вимірювання коефіцієнту пропускання і абсорбції, що дозволяє уникнути впливу каламутності крові на результат аналізу.

Детальна характеристика приладу та повна інструкція щодо роботи на ньому викладені в паспорті до аналізатора HemoCue Plasma/Low Hb.

**Результати досліджень.** Були проведені вимірювання концентрації вільного гемоглобіну в плазмі крові донорів та її гемолізаті різних концентрацій (від 0,5 г/л до 8,0 г/л).

Було здійснено 10 повторних досліджень одного і того ж зразка гемолізату. В таблиці 3 наведені результати метрологічної експертизи запропонованої методики.

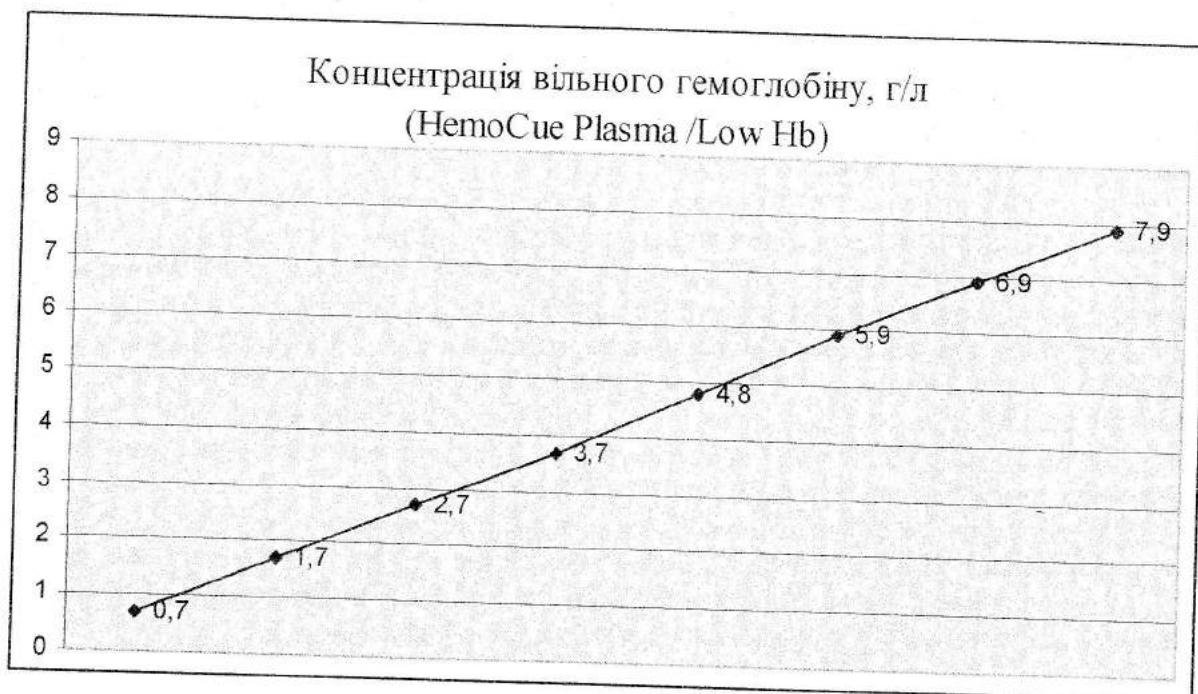
Таблиця 3

**Метрологічна експертиза методу визначення з використанням приладу Plasma/Low Hb (виробник HemoCue, Швеція).**

Метод аналізу	Статистичні показники							
	Число ступенів свободи	Середній показник вибірки	Дисперсія	Стандартне відхилення	Дов. ймовірність	Критерій Стьюдента	Дов. інтервал	Відносна похибка середнього результату
	f	x	s <sup>2</sup>	s	P	t (P,f)	Δ x	ε
Вміст вільного гемоглобіну, г/л	10	7,91	0,0016	0,0399	90 %	1,89	0,0239	0,3 %

Отримані результати свідчать, що за відтворюваністю вказана методика не обтяжена систематичною похибкою і має невелику відносну похибку середнього результату, яка становить - 0,3 %.

Оцінка параметрів лінійної залежності запропонованої методики була здійснена при визначенні концентрації вільного гемоглобіну у пробах, отриманих шляхом розведення базового зразка. Із рисунка видно, що отримані результати повністю відповідають значенням вільного гемоглобіну у кожній з проб, що містили вільний гемоглобін у концентраціях від 1,0 г/л до 8,0 г/л.



**Висновок:**

1. Проведені дослідження показали:

- аналізатор зручний для роботи і простий у використанні;
- не потребує контакту з реактивами та досліджуваними зразками;
- має високий ступінь достовірності.
- використовуються одноразові кювети, які легко утилізуються;

Таким чином, результати апробації інноваційних методів обстеження донорської крові можуть бути впроваджені в науково-дослідних установах медичного профілю, закладах служби крові та лікувально-профілактичних закладах практичної охорони здоров'я.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Аналізатор HemoCue Plasma/Low Hb. //Інструкція до застосування. Швеція - 2009. - 6 с.
2. Минеева Н.В. Антигены эритроцитов. Методы определения групп крови и резус-принадлежности//Пособие для врачей - лаборантов.- СПб.-1999.- 39с.
3. «SERAFOL ABO+D» SIFIN. Institut fur Immunpreparate und Nahrmedien GmbH /- Berlin-2008. Інструкція. - 8 с.
4. Ширококов В.П., Дзюблик С.Г., Вороненко С.Г. та співавт. Застосування швидких тестів у лабораторній діагностиці інфекційних хвороб.// Методичні рекомендації.-Київ.- 2004.- 32 с.