

Аглутинационен тест. Бърз тест с центрофугиране. Ензимен едноетапен и двуетапен тест.

Д-р Жанина Йорданова Иванова дм,



Аглутинационен тест

- ▶ Първият етап на хемаглутинацията е свързване на антигена с антитяло и формиране на антиген-антитяло комплекси или сенсibiliзация на еритроцитите от антителата. В кръвногруповата серология антителата най-често са един от двата имуноглобулинови класа - IgM или IgG, но са описани и антитела от IgA клас.
- ▶ Независимо, че молекулата на IgM е малко по-голяма от IgG и двата класа антитела трябва да се свържат с повече от една клетка, за да се реализира втория етап на хемаглутинацията.

Аглутинационен тест

- ▶ IgM молекулите в сравнение с IgG имат 5 пъти по-голяма възможност да предизвикат директна аглутинация на еритроцити. За да може IgG молекулите да предизвикат аглутинация на еритроцити, условията в реакционната среда трябва да се подобрят, така че еритроцитите да се доближат един до друг, за да могат IgG молекулите да се свържат образувайки мостчета между тях или пък да се използват други антитела, които да се присъединят към IgG молекулите и пак да доведат до образуване на аглутинация. Това е вторият етап, който съществува както при директна, така и при индиректна аглутинация.

Бърз тест с центрофугиране

- ▶ Принцип на теста: чрез центрофугиране се създават по-добри условия за фиксиране на антителата от клас IgM (особено, когато са със слаба активност и нисък титър) върху антигенните детерминанти и да се формират видими аглутинати.
- ▶ Предназначение на теста: Откриване на ABO несъвместимост между дарителските еритроцити и серума/плазмата на реципиента.
- ▶ Материали за изследване:
 - серум от изследвания пациент
 - проба от единицата ЕК, която ще се предлага за кръвопреливане

Бърз тест с центрофугиране

- ▶ Необходими разтвори и материали
- 1. Физиологичен разтвор (0,9% NaCl)
- 2. Епруветки прозрачни пластмасови 12/75мм
- 3. Пипети
- 4. Стативи за епруветки
- 5. Центрофуга до 5000 оборота
- 6. Хладилник 4-8 С.

Бърз тест с центрофугиране

► Процедура

1. За всяка единица донорска кръв, която ще се съвместява, се маркира по една епруетка 12/75мм с номера на единицата.
2. Във всяка маркирана епруетка се поставя по 50 мкрл еритроцити от съответната единица кръв.
3. Еритроцитите се промиват три пъти с физиологичен разтвор
4. Приготвя се 5% еритроцитна суспензия във физиологичен разтвор от всяка единица донорски еритроцити.
5. Маркира се по една епруетка 12/75 с номера на единицата и името на пациента

Бърз тест с центрофугиране

► Процедура

6. Постава се във всяка епруетка по 100 мкрл от серума/плазмата на пациента
7. Добавя се по 50 мкрл 5% еритроцитна суспензия във физ. р-р от всяка единица донорски еритроцити в съответната маркирана епруетка
8. Размесва се добре и се инкубира на стайна температура за 5 минути
9. Центрофугира се за 1 минута на 1000 оборота
10. Отчита се и се регистрира резултата

Бърз тест с центрофугиране

- ▶ Документиране на процедурата - резултата се записва в журнал „Проби за съвместимост“ и във фиша за In vitro съвместимост /фиша се попълва в два екземпляра/.
- ▶ Интерпретация на резултата. Наличието на аглутинация показва, че има несъвместимост между серума/плазмата на пациента и съответните дарителски еритроцити. Тази единица кръв не бива да се прелива на изследвания пациент.
- ▶ Възможности за грешки. Некоректни резултати могат да се получат при неправилно изпълнение на теста, бактериално замърсени разтвори, серум/плазма от пациента, неправилно центрофугиране, наличие на антиеритроцитни антитела със студова характеристика от клас IgM, наличие на парапротеини.

ЕНЗИМНИ ТЕХНИКИ

- ▶ В кръвногруповата серология се използват различни ензими (протеази) и най-често използваните са бромелин, папаин и фицин. Те имат широка специфичност и атакуват различни пептидни връзки, а трипсина и химотрипсина притежават по-прецизна специфичност при разграждане на пептидните връзки.
- ▶ Неураминидазата, която разцепва остатъците на сиаловата киселина, е най-ефективният ензим за намаляване на повърхностния електрически заряд на еритроцитите, но създава условия за поява на мембранната повърхност на Т-криптантгена.

ЕНЗИМНИ ТЕХНИКИ

- ▶ В кръвногруповата серология се използват различни ензими (протеази) и най-често използваните са бромелин, папаин и фицин. Те имат широка специфичност и атакуват различни пептидни връзки, а трипсина и химотрипсина притежават по-прецизна специфичност при разграждане на пептидните връзки.
- ▶ Ензимно третирани клетки се използват при скрининг за еритроантитела и най-вече при тяхната идентификация.

Ензимен едноетапен и двуетапен тест

- ▶ Предназначение на теста. Откриване и идентификация на антиеритроцитни антитела (автоеритроантитела и алоеритроантитела).
- ▶ Принцип на теста. Обработването на еритроцитите с протеолитични ензими повишава серологичната реактивност на някои антиеритроцитни антитела. Ензимите отцепват сиалови фрагменти от еритроцитната мембрана, което намалява Z-потенциала на мембраната. Така се намаляват силите на отблъскване между еритроцитите, намалява се разстоянието между тях в реакционната смес. Антителата от клас IgG се фиксират по-лесно върху антигенните детерминанти, формирайки видими аглутинати. Антигенните структури, чиито детерминанти са сиалова киселина се разрушават при ензимната обработка.

Ензимен едноетапен и двуетапен тест

- ▶ Материали за изследване. Кръв, взета с или без антикоагулант
- ▶ Необходими реагенти и разтвори
 - Физиологичен разтвор с рН=6,9-7,4
 - Реагент бромелин
 - Тест-еритроцити от кр. Група О, чиято комбинация от антигени да бъде пълна по отношение на Rh фенотипа
 - Тест-еритроцити от кр. Група О Rh/-/ отр.
 - Кръв от изследваното лице взета с или без антикоагулант
 - Епруветки прозрачни пластмасови 12/50 и 12/75
 - Плаки и гел карти
 - Термостат на 37 С
 - Центрофуга за плаки и гел карти
 - Хладилник 4-8 С

Ензимен едноетапен тест

- ▶ Процедура
- ▶ Промиват се трикратно с физиологичен разтвор тест-еритроцитите и еритроцитите от пациента
- ▶ Приготвя се 3% суспензия във физиологичен разтвор от всеки вид еритроцити
- ▶ В предварително маркирани на брой за всеки пациент гнезда на плаката се накапва по 50мкрл от изследвания серум/плазма.
- ▶ Добавя се в едната епруветка 50мкрл 3% суспензия във физиологичен разтвор от еритроцитите на пациента, а в другите две епруветки по 50 мкрл 3% суспензия във физ. Разтвор от тест-еритроцитите от кр.гр O /+/ пол. И O /-/ отр.
- ▶ Размесва се добре и се инкубира за 15 минути на 37 C
- ▶ Центрофугира се автоматична и се отчита резултата
- ▶ Инкубира се отново за 15 минути на 4-8 градуса
- ▶ Автоматично се размесва и се отчита резултата

Ензимен едноетапен тест

- ▶ Интерпретация на резултатите: наличието на аглутинация показва, че в изследвания серум/плазма има антиеритроцитни антитела от клас IgM. Необходимо е да се следи за степента на аглутинация при различните температури, което дава информация за температурната характеристика и температурния диапазон на съответното антитяло.

Ензимен двуетапен тест

► Ензимна обработка на еритроцитите

1. Поставят се по 2-5 капки от всеки вид тест-еритроцити и от еритроцитите на изследваното лице в предварително маркирани епруветки 12/75
2. Промиват се трикратно с физиологичен разтвор всеки вид еритроцити
3. Поставят се в обозначена с етикет епруветка: 1 (един) обем бромелин и 2 (два) обема 2-3% суспензия тестови червени кръвни клетки.
4. Смесват се добре и се инкубират на 37 С в продължение на 8 минути.
5. Промиват се трикратно и след това се ресуспендира до 2-3% разтвор.

Ензимен двуетапен тест

► Изпълнение на метода

1. Маркират се предварително нужните плаки
2. Накапва се по 50 мкрл от изследвания серум/плазма.
3. Накапва се по 50 мкрл 3% суспензия във физиологичен разтвор от ензимообработените еритроцити в съответната маркирана епруветка
4. Размесва се добре и се инкубира за 15 минути на 37 С
5. Центрофугира се автоматично и се отчита резултата
6. Инкубира се отново за 15 минути на 4-8 градуса
7. Автоматично се размесва и се отчита резултата

Ензимен двуетапен тест

Контроли на ензимната обработка на еритроцитите

Положителна контрола:

1. Накапва се в предварително маркирана плака 50 мкрл тест-серум съдържащ известно по специфичност антиеритроцитно антитяло от клас IgG (анти-D или анти-c), кореспондиращо със съответния антиген на използваните тест-еритроцити.
2. Добавя се по 50 мкрл 3% суспензия от ензимообработените еритроцити в съответната маркирана плака
3. Инкубира се на 37C в продължение на 15 минути
4. Центрофугира се, отчита се и се регистрира резултата

Ензимен двуетапен тест

Контроли на ензимната обработка на еритроцитите

Отрицателна контрола:

1. Накапва се в предварително маркирана плака 50 мкрл тест-серум (AB серум), който не съдържа антиеритроцитни антитела.
2. Добавя се по 50 мкрл 3% суспензия от ензимообработените еритроцити в съответната маркирана плака
3. Инкубира се на 37C в продължение на 15 минути
4. Центрофугира се, отчита се и се регистрира резултата

Ензимен двуетапен тест

- ▶ Интерпретация на резултатите. Наличието на аглутинация показва, че в изследвания серум/плазма се съдържат антиеритроцитни антитела от клас IgG. Трябва да се има предвид, че някои антитела от клас IgM засилват активността си в ензимен тест (антителата от системите ABO, P, Lewis).
- ▶ Възможности за грешки
 1. Фалшиво положителни резултати се наблюдават при неправилна ензимна обработка на еритроцитите, при наличие на патологични белтъци в изследвания серум, при бактериално замърсяване.
 2. Фалшиво отрицателни резултати се наблюдават при недостатъчна ензимна обработка, при еритроцити с изтекъл срок на годност, при неправилен подбор на тест-еритроцитите по отношение на антигенната формула, при грешки в техническото изпълнение, при инактивиране на бромелинов разтвор в следствие на неправилно съхранение.

БЛАГОДАРЯ

ЗА ВНИМАНИЕТО

