

# Перекрестные пробы крови

Перекрестные пробы крови – это быстрый тест для определения совместимости реципиента с донором, который в большинстве случаев позволяет избежать острых трансфузионных гемолитических реакций. Не является заменой определению групп крови.

У животных с известной группой крови так же рекомендуется проводить перекрестные пробы для обнаружения реакции на неидентифицированные агглютинины, такие как например группа Mik у кошек.

Тест основан на макро- и микроскопической оценки наличия иммунологических реакций в виде агглютинации или гемолиза эритроцитов. Агглютинация происходит при связывании антител (агглютинины) с антигенами на поверхности эритроцитов (агглютиногены) вызывающее слипание в беспорядочный комок эритроцитов или их разрыв (гемолиз).

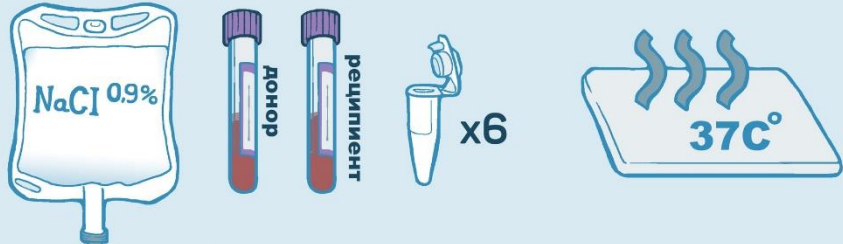
Перекрестные пробы содержат 3 варианта проведения проб: большая перекрестная проба, малая перекрестная проба и аутоконтроль.

- Клинический смысл большой перекрестной пробы заключается в том, что в плазму реципиента помещаются эритроциты донора для того, чтобы понять, существуют ли у реципиента сильные антитела к антигенам на поверхности эритроцита донора и не разрушит ли реципиент эти эритроциты вовремя или сразу после переливания.
- Клинический смысл малой перекрестной пробы заключается в том, что в плазму донора помещают эритроциты реципиента для того, чтобы обнаружить сильные антитела донора по отношению к эритроцитам реципиента. Т.е. малая перекрестная проба – является обратной большой. При использовании компонентов эритроцитарной массы, в человеческой литературе, малой перекрестной пробой пренебрегают по причине небольшого количества плазмы в препарате. При наличии у донора антител к реципиенту – требуется критическая оценка значимости обнаруженного результата, так как антитела в переливаемой плазме не смогут поддерживаться организмом как это происходило бы в организме донора, а также довольно сильно разбавляются кровью реципиента.
- Аутоконтроль – оценка поведения собственных эритроцитов реципиента в собственной плазме. Является удобной мерой для сравнения с результатом малой или большой пробы, а так позволяет обнаружить аутоагглютинацию.

# Проведение перекрестной пробы

## Шаг 1. Подготовка расходных материалов.

**1. Расходные материалы**



1. Кровь в EDTA  
2. 6 эппендорфов  
3. NaCl 0.09%  
4. Источник тепла  
5. Пипетки  
5. Центрифуга

Для проведения перекрестных проб вам понадобится: Центрифуга, предварительно подписанные пробирки или эппендорфы без консервантов, пипетки, физиологический раствор и так же, желательно, стекла и микроскоп для микроскопической оценки.

Вариант теста, который предложен ниже требует использования донорской крови в объеме не менее 0,3 мл и крови реципиента в объеме не менее 0,2 мл в пробирках с консервантом типа EDTA (фиолетовые). Стоит избегать несоответствия консерванта к требуемому объему крови, так как это может разбавить плазму и антитела в ней.

## Шаг 2. Разделение фракций крови.

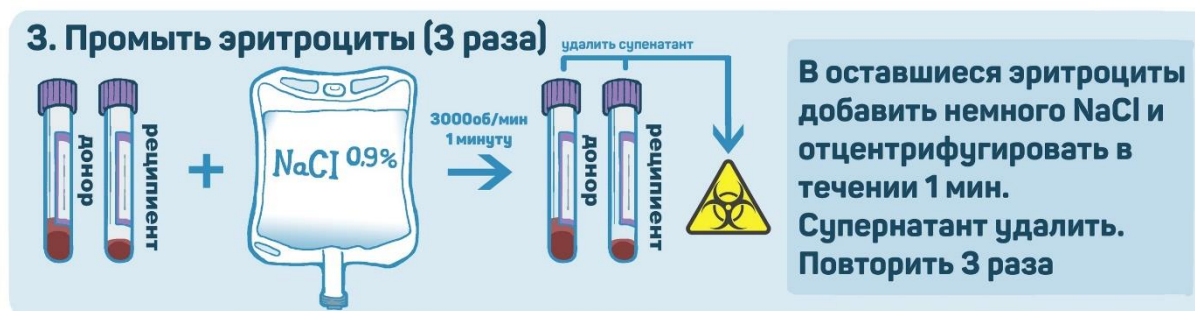
**2. Разделить кровь**



Отцентрифугировать кровь на 3000 оборотах 3 минуты и отделить плазму в эппендорфы

Кровь донора и реципиента центрифугируется на 3000 об/мин 3 минуты. Затем плазма донора и реципиента отделяется в отдельную, предварительно подписанную тару без консерванта (пробирка, эппендорф).

### Шаг 3. Промывание эритроцитов.



Затем происходит процесс «отмывки» эритроцитов. Это требуется для того, чтобы уменьшить количество белковых остатков плазмы между эритроцитами, которые могут влиять на агрегацию или быть самостоятельными антигенами, помимо самих эритроцитов. Данный процесс заключается в разведении эритроцитов физиологическим раствором и коротким центрифугированием с удалением супернатанта (надосадочная жидкость, в которой содержатся остатки плазмы после центрифугирования). Проводится несколько раз.

### Шаг 4. Приготовление эритроцитарной суспензии.



Создание эритроцитарной суспензии в отдельной, предварительно подписанной таре без консерванта, производится из «отмытых» эритроцитов с физиологическим раствором в соотношении 1:40 – например 50 мкл : 2000 мкл (2мл).

## Шаг 5. Проведение перекрестной пробы.

### 5. Проведение перекрестной пробы

Тест	Эритроциты 1ч	Плазма 2 части
пациент контроль	реципиент	реципиент
большая проба	донор	реципиент
малая проба	реципиент	донор
донор контроль	донор	донор

Инкубация 10-15мин при 37С, далее оценить  
(можно предварительно отцентрифугировать 15сек)

### Гемолиз, агглютинация или все нормально



Имея необходимые компоненты – плазма и эритроцитарная суспензия обеих сторон можно начать проводить непосредственно пробы в отдельных, предварительно подписанных тарах:

– **Большая перекрестная проба**

1 часть эритроцитов донора + 2 части плазмы реципиента

– **Малая перекрестная проба**

1 часть эритроцитов реципиента + 2 части плазмы донора

– **Аутоконтроль**

1 часть эритроцитов реципиента + 2 части плазмы реципиента

Инкубация пробы при 37С° (можно держать в руках) 10-15минут.

### Макрооценка результата

Всегда лучше начинать оценку с аутоконтроля, так как в нем менее вероятна реакция агглютинации или монетных столбиков и далее сравнивать с ним.

При негативном тесте (нет иммунологических реакций) образцы имеют ровный розоватый оттенок без комков и осадка, без лакового оттенка или изменения цвета.

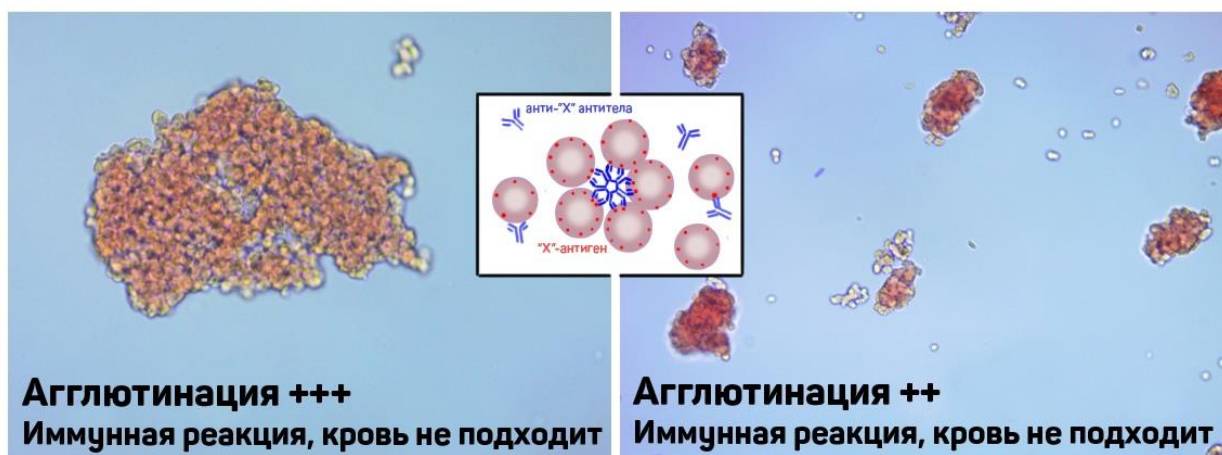
Образование осадка или хлопьев говорит о положительном результате теста. При подозрении на гемолиз – следует открутить пробку и сравнить цвет супернатанта с цветом плазмы, применимой в данной пробе, если ранее там не наблюдался гемолиз.



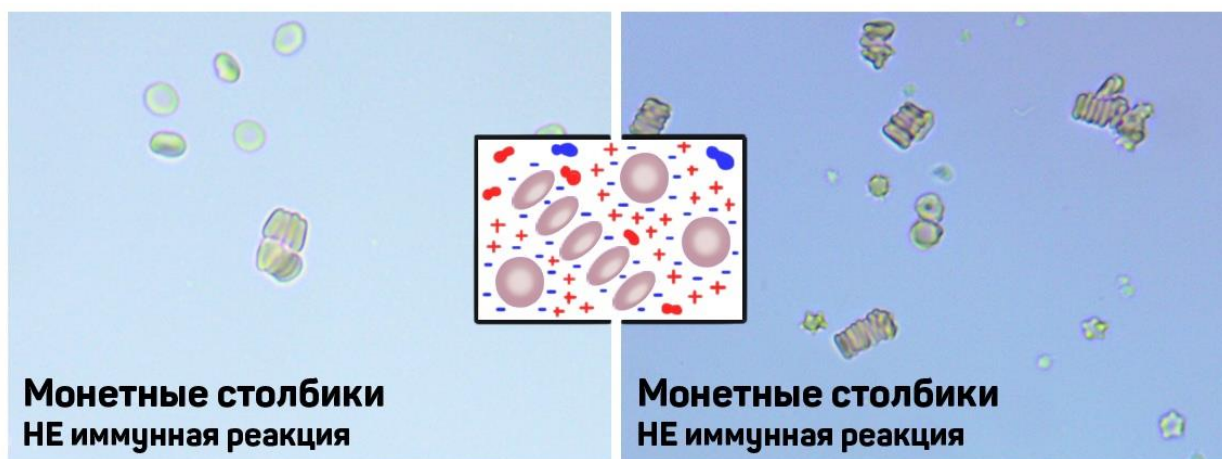
### Микроскопическая оценка результата

Наносится капля препарата на подписанное предметное стекло и покрывается покровным стеклом. Далее под увеличением объектива 40x (синий объектив) оценивается в нескольких полях зрения наличие агглютинации (беспорядочные конгломераты эритроцитов), монетных столбиков или их отсутствие.

При наличии агглютинации тест является положительным и донор не допускается к переливанию.



«Монетные столбики» распространенное явление в норме у кошек и при воспалительных заболеваниях у собак. В норме эритроциты несут отрицательный заряд и отталкиваются друг от друга по причине кулоновских сил. Помимо собственного заряда, эритроциты так же окружены существенным количеством положительно заряженных ионов (катионов), что еще больше увеличивает электрическое пространство между эритроцитами. При существенном повышении глобулинов, например, при воспалении, или при смещении электронейтральности плазмы по другим причинам (ацидоз, электролитные нарушения) – электрическое пространство между эритроцитами уменьшается и возникает агрегация в виде монетных столбиков (не путать с агглютинацией). За счет отмывания эритроцитов в ходе проведения перекрестной пробы данный фактор значительно реже будет влиять на макроскопическую оценку проб.



При отсутствии агглютинации в пробе тест является негативным и донор допускается к переливанию.



Негативный тест не является гарантией того, что у реципиента не произойдет трансфузионных реакций, но сильно снижает риск острых гемолитических реакций, связанных с несовместимыми группами крови.