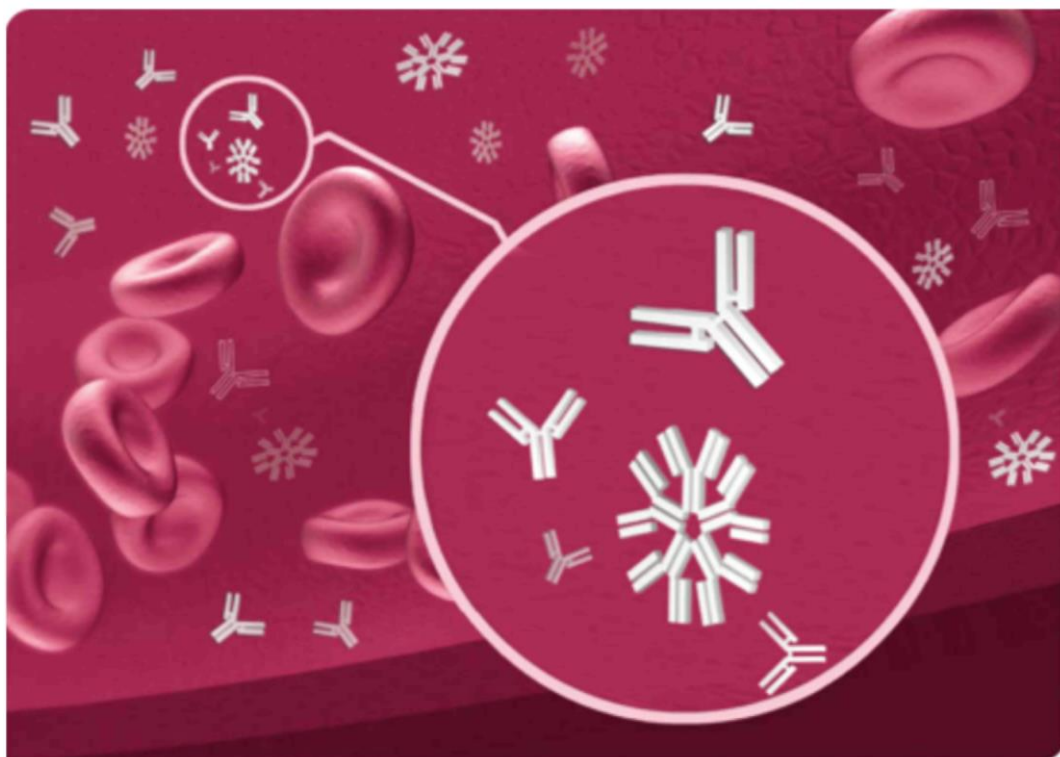

Процедуры титрования

Правила надлежащей лабораторной практики



BIO-RAD

Идентификация

Документ

Процедуры титрования — Правила надлежащей лабораторной практики

Версия 1.0 — 02/2018

Лист регистрации изменений

Версия	Дата	Комментарии
1.0	02/2018	Первое издание



Производитель

DiaMed GmbH

Адрес: Pra Rond 23

1785 Cressier FR

Switzerland (Швейцария)

Справки по техническим вопросам

Тел. +41 (0)26 67 45 111

Факс +41 (0)26 67 45 145

Авторские права и ограничение ответственности

Авторское право: 2018 г., DiaMed GmbH, адрес: Pra Rond 23, 1785 Cressier FR, Switzerland (Швейцария)

Все права защищены.

Запрещается воспроизводить данную публикацию, полностью или частично, в любой форме и любыми средствами без письменного одобрения издателя. Данный документ был подготовлен с максимальной возможной тщательностью, издатель не несет ответственности в отношении ошибок и пропусков,

а также в отношении ущерба, который повлекла информация, приведенная в настоящем документе.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Идентификация	2
Раздел 1	Введение	5
Раздел 2	Надлежащая лабораторная практика	7
	2.1 Приготовление разведений	7
	2.2 Контроли.....	8
	2.3 Выбор реагентов эритроцитов	8
	2.4 Идентификация антител перед титрованием	9
	2.5 Интерпретация результатов	9
	2.6 Количественный анализ и документирование результатов	9
	2.7 Примеры	10
Раздел 3	Часто задаваемые вопросы	17

ДАННАЯ СТРАНИЦА НАМЕРЕННО ОСТАВЛЕНА ПУСТОЙ

1 ВВЕДЕНИЕ

Титрование антител — это приближённо количественный метод измерения концентрации антител; титрование может проводиться в следующих случаях:

- Мониторинг концентрации антител, играющей важную роль при беременности. В этом случае нередко проводят титрование антител.
- Титрование антител группы крови АВ0 проводится для клинической оценки осуществимости трансплантации при несовместимости с группой крови АВ0 и мониторинга проводимой терапии для снижения титров антител при подготовке к такой трансплантации.
- Изучение так называемых высоких титров антител с низкой авидностью (НТЛА), например, если неизвестно, относятся ли эти антитела к группе крови Knops.
- Определение относительной специфичности аутоантител при аутоиммунной гемолитической анемии с синдромом тепловых агглютининов (WAIHA), например в элюате.
При пароксизмальной холодовой гемоглобинурии (СAS) титрование может использоваться для определения специфичности аутоантиидиотипических антител в широком температурном диапазоне.
- Определение антигенного статуса клеток с положительными результатами прямой пробы Кумбса (DAT), в случае если невозможно или неэффективно использовать реагенты для удаления иммуноглобулина G из типизируемых клеток.
- Определение антигенной плотности реагентов эритроцитов, несмотря на то, что вместо данного метода уже широко используются более точные методы, например проточная цитометрия.
- Определение характеристик новой антисыворотки или сравнение новой партии с предыдущей.

ДАННАЯ СТРАНИЦА НАМЕРЕННО ОСТАВЛЕНА ПУСТОЙ

2 НАДЛЕЖАЩАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА

Титрование нередко характеризуется как “процедура, неизбежно отличающаяся невысокой точностью”.

Как и любой другой метод лабораторного анализа, процедура титрования требует стандартизации для снижения вариативности, стоящей на пути к получению точных и информативных результатов. Сами результаты зависят от постоянной равновесия антител, а также от их концентрации, поэтому контроль параметров испытания играет важную роль. Основные факторы, которые необходимо принимать во внимание:

2.1 Приготовление разведений

При титровании применяется последовательное двукратное разведение пробы из неразведенного состояния, в пропорции 1:2, 1:4 и т. д. до 1:2048 (12 пробирок). Количество разведений можно изменить в зависимости от используемого метода.

Титрование отличается наибольшей точностью, если объем пробы при приготовлении разведения максимальный. Пробирки, закрепленные на штативах ID-системы, должны быть одноразовыми, стерильными и иметь достаточный объем для правильного и тщательного смешивания при каждом разведении.

Для приготовления каждого разведения в серии должен использоваться градуированный дозатор со стерильным наконечником, должным образом откалиброванный и регулярно обслуживаемый.

В системе **ИН-500** используются специальные штативы для титрования. Оборудование, используемое при приготовлении последовательных двукратных разведений, включает в себя “дозатор, должным образом откалиброванный и регулярно обслуживаемый”, а также тщательно промываемые иглы.

2.2 Контроли

Для валидации процедуры титрования рекомендуется выполнять титрование стандартных антител известной концентрации или лучшего качества, т.е. когда известно “ожидаемое” значение титров (см. Таблицы в разделе примеров на страницах ниже). Эти действия также рекомендуется выполнять при стандартном контроле метода с целью снизить вариативность, влияющую на его эффективность.

Если титрование выполняется при ведении беременности, первая проба, отбираемая, как правило, на 12-й неделе, считается базовыми титрами. Последующие пробы отбираются параллельно с предыдущей. Как сказано выше, эти действия снижают вариативность, стоящую на пути к обеспечению высокой точности методики, и позволяют более точно представить состояние антител.

Пробы должны храниться в замороженном виде (при температуре -20°C или ниже). Особое внимание следует уделять разморозке проб: при разморозке образуется перепад концентрации, так как более концентрированная часть раствора оттаивает в первую очередь и стекает по стенкам пробирки вниз. После разморозки необходимо перевернуть пробирку несколько раз. Перед началом испытаний убедитесь, что в пробирках не осталось не растворившегося материала. В противном случае осторожно нагрейте пробу до температуры 37°C ¹.

2.3 Выбор реагентов эритроцитов

По возможности рекомендуется использовать антигены из одного и того же источника из-за высокой гетерогенности при экспрессии антигенов даже в клетках одного и того же фенотипа.

Например, в клетках R^1R^2 (DCcEe, RH:1,2,3,4,5) может быть представлено от 23 000 до 31 000 копий² D-антигена. Поскольку большинство лабораторий не могут использовать одни и те же эритроциты в продолжение всей беременности, рекомендуется использовать пул из трех клеток одного и того же фенотипа потомно. Эти действия, наряду с титрованием, выполняемым параллельно с отбором предыдущей пробы, позволяют снизить вариативность.

Приготовление выбранных клеток должно осуществляться в строгом соответствии с методом испытания, например 0,8% в соответствующем растворе для разведения для ID-системы. Для дозирования соответствующих объемов должны использоваться калиброванные градуированные дозаторы.

Дозировка эритроцитов при титровании, в особенности при беременности, — двойная или одинарная, — является предметом обсуждения. В большинстве стран (но не во всех) рекомендуется использовать одинарную дозировку (гетерозиготная экспрессия). Это объясняется тем, что плод аллоиммунизированной матери никогда не бывает гомозиготным в отношении изучаемого гена. Таким образом, одинарная дозировка клеток ближе всего соответствует состоянию *in vivo*.

Единогласно принимается следующее:

- лаборатории должны использовать клетки согласно рекомендациям местных норм и правил;
- в основе стандартизации лежит использование клеток одного и того же фенотипа в качестве стандартной процедуры, применяемой каждый раз.

1. Young DS. Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests. 2nd ed. Washington, DC: AACC Press; 1997: 4- 180, 181,533.
2. Daniels, G., 2013. Human Blood Groups. 3rd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons

2.4 Идентификация антител перед титрованием

Нет смысла проводить титрование только на основе положительного скрининг-теста на антитела.

Как указано в разделе 2.3 на стр. 8, правильный выбор реагентов эритроцитов можно сделать только при условии правильной идентификации антител.

Антитела могут быть самых разных типов, и если идентификация не проведена должным образом, это может повлиять на результаты титрования.

При наличии нескольких типов антител к выбору реагентов эритроцитов следует подходить с большой осторожностью, а оценка титров каждого типа антител должна проводиться по отдельности.

Например, для смеси анти-K+Fy^a (анти-KEL1+FY1) необходимо провести две независимые операции титрования: первая с использованием эритроцитов K-;Fy(a+b+) (KEL:-1, FY:1,2), а вторая — с использованием эритроцитов K+k+;Fy(a-) (KEL:1.2;FY.-1).

2.5 Интерпретация результатов

При дозировании разведений, приготовленных соответствующим образом, рекомендуется начинать с самого сильного разведения и заканчивать неразведенной пробой, чтобы свести к минимуму возможность смещения, вызываемого большой концентрацией антител.

Необходимо четко обозначить конечные точки титрования. Как правило, последнее разведение, которое дает результат 1+ (+ в ID-системе), считается конечной точкой титрования. Взаимно обратная величина от данного конечного значения будет считаться титрами антител в пробе: разведение 1:32 будет соответствовать значению титров 32 (не 1:32!).

Как правило, за пределами данного разведения наблюдаются более слабые реакции с результатом 1+ (+ в ID-системе): на них обращают внимание при документировании результатов количественного анализа, а не титров (см. Таблицы в разделе примеров на страницах ниже).

2.6 Количественный анализ и документирование результатов

Титрами считается взаимно обратная величина от вычисленной конечной точки, например 64. Однако такой подход не всегда отражает истинную концентрацию антител или указывает на значительное увеличение титров. Для решения этой проблемы проводится количественный анализ реакций. Существуют различные методы количественного анализа, в одних используется шкала от 12 до 0 (чаще всего), а в других от 5 до 0. Используемый метод анализа не имеет значения; используется одна и та же система. Количественный анализ должен быть частью стандартных рабочих процедур лаборатории, наряду с определением значительного увеличения титров, которому должно соответствовать значительное увеличение по шкале.

2.7 Примеры

Пример 1 — Титры и количественный анализ

Таблица 1

Разведение пробы		Без разведения	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	Титры	Конечная точка	Балл
Проба 1	Концентрация	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	+/-	+/-	-	64		
	Балл	10	10	10	8	8	8	5	3	2	0		1:256	64
Проба 2	Концентрация	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	+/-		128		
	Балл	12	12	12	10	10	10	8	5	3	0		1:256	80
Проба 3	Концентрация	1+	1+	1+	1+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	0	8		
	Балл	5	5	5	5	3	3	3	3	2	0		1:256	34

На примере выше показаны значения для всех трех проб до разведения 1:256 включительно.

Последнему разведению соответствует значение 1+, которое отличается для каждой пробы, и, соответственно титры для каждой пробы разные.

При назначении баллов для каждой конкретной реакции получаются три разных результата.

Пример 2 — Интерпретация: Значительное увеличение титров, например при беременности

Таблица 2

	Титры “сегодняшней” пробы	Титры “вчерашней” пробы	Титры стандартной пробы, ожидаемые титры = 32	Выводы
a	4	4	32 → ✓	Увеличения титров нет Титры: 4
b	32	4	32 → ✓	Значительное увеличение титров с 4 до 32
c	16	16	64 → ✓	Увеличения титров нет Титры: 16
d	8	4	32 → ✓	Увеличения титров нет 1 шаг - увеличения титров нет

Лаборатория должна определить базовые титры с использованием ожидаемых титров стандартной пробы, специфичных для используемого метода.

На примере выше ожидаемые титры стандартной пробы — 32; воспроизводимость данного значения должна составлять ± 1 для разведения, т.е. приемлемыми титрами считаются 16-32-64, как показано на рисунке. Примечание: “Предыдущая” проба, которая хранилась в замороженном виде, подвергалась титрованию повторно параллельно с впервые отобранной пробой (например, 2 недели спустя).

Проба a: Стандартная проба демонстрирует титры 32 → ✓; как предыдущая, так и впервые отобранная проба демонстрируют титры 4
Вывод: Увеличения титров нет.

Проба b: Стандартная проба демонстрирует титры 32 → ✓; предыдущая проба демонстрирует титры 4, впервые отобранная проба демонстрирует титры 32.
Вывод: Значительное (более 2 разведений) увеличение титров.

Проба c: Стандартная проба демонстрирует титры 64 → ✓; как предыдущая, так и впервые отобранная проба демонстрируют титры 16.
Вывод: Увеличения титров нет.

Проба d: Стандартная проба демонстрирует титры 32 → ✓; предыдущая проба демонстрирует титры 4, впервые отобранная проба демонстрирует титры 8.
Вывод: Увеличение на 1 шаг не является значительным, увеличения титров нет.

ПРИМЕЧАНИЕ: В Великобритании³ проводится количественный анализ некоторых типов антител (МЕ/мл), а не титрование!

- Реагент Anti-D ниже 4 МЕ/мл → Гемолитическая болезнь плода и новорожденных маловероятна
- Реагент Anti-D в диапазоне 4-15 МЕ/мл → Умеренный риск гемолитической болезни плода и новорожденных
- Реагент Anti-D выше 15 МЕ/мл → Высокая вероятность отека синдрома новорожденных
- Реагент Anti-C ниже 7,5 МЕ/мл → Продолжать наблюдение
- Реагент Anti-C в диапазоне от 7,5 до 20 МЕ/мл → Риск гемолитической болезни плода и новорожденных в умеренной форме, обратиться к специалисту
- Реагент Anti-C выше 20 МЕ/мл → Риск гемолитической болезни плода и новорожденных в острой форме, обратиться к специалисту

Пример 3 — Титрование в контексте трансплантации органов, несовместимых с группой крови АВ0 (AB0i) (почки и др.). Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, несовместимых с группой крови АВ0 — Гемолитическая болезнь плода и новорожденных, связанная с группой крови АВ0

Большинство стран сталкивается с недостатком почек для трансплантации. В качестве решения предлагаются почки, несовместимые с группой крови АВ0: в целом, совместимость с антигеном лейкоцитов человека имеет большую важность, чем совместимость с группой крови АВ0, и, по общему мнению, *“Трансплантаты почек (ТП), несовместимых с группой крови АВ0, сопоставимы с ТП, совместимыми с АВ0”*⁴. Важнейшее значение для ТП, несовместимых с группой крови АВ0, имеет оценка титров анти -А/В антител. Она позволяет обеспечить эффективность подготовительных действий и определить период, в течение которого выдается разрешение на трансплантацию. Кроме этого, мониторинг состояния после трансплантации помогает на ранней стадии обнаружить отторжение трансплантата, обусловленное антителами.

В различных центрах трансплантации органов в разных регионах и странах используются различные протоколы трансплантации. В настоящее время ведутся работы по определению минимального значения титров для органов, претендующих на трансплантацию, в отношении совместимости с группой крови АВ0. Общие титры находятся в диапазоне от 32 до 128 (метод Геля). Если титры превышают установленные пределы, пациентам назначается медикаментозная терапия по снижению чувствительности к группе крови АВ0, антиген-специфическая иммуноадсорбция, замещение плазмы или плазмоферез с двойной фильтрацией.

При титровании антител для группы крови АВ0 важно понимать, что в пробах всегда содержится смесь иммуноглобулинов М и G. Большинство лабораторий выполняют титрование как при комнатной температуре, (прямая агглютинация при комнатной температуре, DRT), так и при непрямом антиглобулиновом тесте.

В первую очередь необходимо учитывать следующее:

- Для обнаружения иммуноглобулина М в первую очередь используется прямая агглютинация при комнатной температуре, но в агглютинации неизбежно участвует некоторое количество иммуноглобулина G.
- Для обнаружения иммуноглобулина G в первую очередь используется непрямой иммуноглобулиновый тест, но в агглютинации неизбежно участвует некоторое количество иммуноглобулина М.

Некоторые лаборатории стремятся к высокоточному измерению иммуноглобулина G. В этом случае в пробу добавляется дитиотреитол (или 2-меркаптоэтанол), который инактивирует иммуноглобулин М, не оказывая влияния на иммуноглобулин G. В качестве недостатка следует отметить, что сам по себе метод является еще одной причиной вариативности, вносимой в систему.

3. <https://www.transfusionguidelines.org/red-book> (доступ: 24 января 2018 г.)

4. Muramatsu M et al., 2014. ABO incompatible renal transplants

Отчеты по опытам, проводимым в Великобритании (ссылка NEQAS на семинар в октябре 2014 г.), демонстрируют следующее:

- Рекомендуется стандартная методика с использованием ID-карт: непрямой иммуноглобулиновый тест и тест на нейтральные антитела
 - для получения наиболее воспроизводимых результатов;
 - результаты демонстрируют более узкий диапазон, т.е. более близкий к медианному значению метода;
- Непрямой иммуноглобулиновый тест демонстрирует большую воспроизводимость, чем прямая агглютинация при комнатной температуре;
- Прямая агглютинация при комнатной температуре отличается большей вариативностью результатов;
- Рекомендуется учредить соответствующий стандарт.

Такой стандарт был разработан Национальным институтом биологических стандартов и контроля (NIBSC) (высокие титры анти-А и анти-В в сыворотке — референсный реагент ВОЗ 14/300⁵).

Рекомендуется выполнить серию разведений реплик как 14/300, так и проб, для учета межлабораторной вариативности при повторном титровании.

Наконец, важно убедиться, что был проведен тест на обнаружение антител. Любые аллогенные антитела, присутствующие в пробе, могут повлиять на результаты титрования, если антиген, к которому специфичны антитела, присутствует в клетках, участвующих в титровании.

Например, если в пробе присутствует реагент alloanti-K (KEL1), необходимо убедиться, что используются реагенты эритроциты K-, если выполняется титрование при непрямом иммуноглобулиновом тесте:

Например, если в пробе присутствует холодовой реагент alloanti-P1 (P1PK1), необходимо убедиться, что используются реагенты эритроциты P1- (P1PK:-1), если выполняется титрование при агглютинации при комнатной температуре:

Пример 4 — НТЛА (высокие титры антител с низкой авидностью)

Под сокращением НТЛА чаще всего подразумеваются, “очень примерно”, серологические результаты данной группы антител без указания их специфичности (цитируется по недавней публикации JJ Moulds).

Общие характеристики: слабая реакция с высокой вариабельностью при непрямом иммуноглобулиновом тесте, и в некоторых случаях низкая воспроизводимость. Поскольку антигены обладают высокой частотностью, идентификация почти всегда демонстрирует слабые реакции при иммуноглобулиновом тесте со всеми клетками, поэтому делать выводы становится затруднительно.

Большинство антител в данной “группе” не имеют клинической значимости. Специфичность: анти-Ch, анти-Rg, анти-JMH, анти-Csa, анти-Yka и др.

Титрование помогает понять, демонстрирует ли антитело характеристики НТЛА, т.е. реакции 1+ (низкая avidность) при непрямом антиглобулиновом тесте и титры >32.

Таблица 3

Разведение	Без разведения	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Низкие титры, низкая avidность	+/-	0	0	0	0	0	0	0
Низкие титры, высокая avidность	2+	2+	1+	0	0	0	0	0
Высокие титры, низкая avidность	1+	1+	1+	+/-	+/-	+/-	+/-	0
Высокие титры, высокая avidность	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	+/-

В данной таблице четко прослеживаются характеристики НТЛА (серый): можно “неожиданно” видеть, что антитела с еженедельной реакцией сохраняют способность к реакции вплоть до разведения 1:64.

Пример 5 Аутоантитела⁶ — Реакции типичных аутоантиидиотипических антител, связанных с пароксизмальной холодовой гемоглобинурией

Таблица 4

Температура	Источник клеток	Титры											
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
4°C	взрослый	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0
	пуповина	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0	0
Комнатная	взрослый	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	0.5+	0	0	0	0
	пуповина	1+	1+	0.5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37°C	взрослый	1+	0.5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	пуповина	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

В данном примере рассматриваются 6 операций титрования, выполненных при 3 различных температурах, с использованием клеток взрослого организма (I^{+s} , i^{+w}) и пуповинных клеток (I^{+w} , i^{+s}).

Для обоих типов клеток титры были максимальными при 4°C, пониженными при комнатной температуре и минимальными при 37°C. При каждой из температур титры для клеток взрослого организма выше по сравнению с титрами для пуповинных клеток.

6. Petz, LD and Garratty G, 2004. Immune Hemolytic Anemias. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone

Пример 6 — Реакции элюата или сыворотки/плазмы, демонстрирующие “относительную специфичность” реагента Anti-e (RH5)

Таблица 5

Фенотип Rh	Титры							
	2	4	8	16	32	64	128	256
dce/dce rr RH:-1,-2,-3,4,5	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0
DCe/DCe R1R1 RH:-1,-2,-3,4,5	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0
DcE/DcE R2R2 RH:-1,-2,3,4,-5	3+	2+	1+	0	0	0	0	0

В данном примере рассматривается титрование пробы для клеток E-e+ (rr и R₁R₁) и E+e- (R²R²). Результаты можно интерпретировать как демонстрирующие “относительную специфичность” для реагента Anti-e (RH5). Реакцию необходимо подтвердить тестированием с привлечением большего числа примеров, в данном случае, клеток e+ и e-.

Пример 7 — Фенотипирование клеток эритроцитов DAT+ при использовании реагентов для непрямого антиглобулинового теста

На первом этапе лаборатории пытаются диссоциировать аутоантитела, специфичные к иммуноглобулину G, используя хлорохин. В случаях, когда такой подход оказывается неудачным, типирование можно выполнить, измеряя количество специфичных антител, оставшихся в реагенте для типирования после адсорбции эритроцитами пациента, и сравнивая полученное значение со значениями при адсорбции эритроцитов в одинарной и двойной дозировке.

Таблица 6

Эритроциты, адсорбирующие реагент anti-Fy ^a	Разведения реагента anti-Fy ^a после адсорбции							Балл
	Без разведения	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32		
Fy(a+b+)	2+	1+	1+	+/-	0	0	21	
Fy(a+b-)	1+	1+	0	0	0	0	10	
Fy(a-b+)	3+	3+	2+	2+	1+	0	41	
Пациент	2+	1+	0	0	0	0	13	

Данные результаты свидетельствуют о наличии Fy(a+) у пациента.

Пример 8 — Микротитрование реагента Anti-D (RH1), экспрессия в нг/мл

Микротитрование реагента anti-D позволяет отличить реагент allo-anti-D от реагента anti-D, полученного пассивным методом после инъекции иммуноглобулина, специфичного к реагенту anti-D (профилактика).

Данный способ микротитрования, в частности во Франции, используется для беременных женщин или женщин после родов в следующем состоянии:

- нет уменьшения интенсивности реакции между двумя последовательно проведенными тестами на обнаружение антител (скрининг-тест на антитела);
- нет информации о возможной пренатальной инъекции иммуноглобулина, специфичного к реагенту anti-D;
- Некогерентная интенсивность реакции относительно даты инъекции иммуноглобулина, специфичного к реагенту anti-D (например, >3+, если после инъекции прошел месяц и более; >2+, если прошло 50 дней; >1+, если прошло более 70 дней).

Согласно данному методу, как правило, выполнялось титрование 28 нг/мл стандартного реагента, а также пробы. Расчеты выполнялись согласно Brossard et al.⁷.

Таблица 7

					Расчеты		
Разведения		1:4	1:8	1:16	A	x B	= C
Стандартный реагент 28 нг/мл	Концентрация (нг/мл)	7	3.5	1.75	Взаимно обратная величина от последнего разведения пробы (<++++)*	Концентрация стандартного реагента, указывающая на ту же интенсивность реакции, что и в случае (A)	Концентрация реагента anti-D (RH1) в пробе
	Концентрация	++++	+++	+			
Проба	1	+	0	0	4	1.75	7 нг/мл
	2	++++	++++	+++	16	3.5	56 нг/мл
	3	++++	++++	++++	>16	7	> 112 нг/мл
	4	+++	+	0	8	1.75	14 нг/мл

- Примечание: Согласно данной процедуре, титрование стандартных реагентов не выполняется до конечной точки +; интенсивность реакции последнего разведения пробы связана с концентрацией разведения стандартного реагента, указывающей на ту же интенсивность реакции.
 - **Проба 1:** кратность “последнего” разведения составляла 1:4 при интенсивности реакции +; концентрация разведения стандартного реагента, указывающая на ту же интенсивность реакции +, составляет 1.75 нг/мл. Можно логически заключить, что концентрация реагента в пробе составляет $4 \times 1.75 \text{ нг/мл} = 7 \text{ нг/мл}$.
 - **Проба 3:** Интенсивность реакции при разведении пробы +++. Чтобы получить реакцию < +++, необходимо продолжить разведение пробы. Это не было выполнено; в выводах указано значение >16, и, таким образом, расчеты дают $>16 \times 7 \text{ нг/мл} = > 112 \text{ нг/мл}$.
- Интерпретация вычисленных значений осуществляется по таблицам, в которых указана ожидаемая концентрация реагента anti-D (RH1), принимая во внимание:
 - концентрацию инъекции реагента anti-D, например 200 мкг или 300 мкг;
 - количество доз инъекции;
 - задержку (в днях) между датой инъекции и датой отбора пробы.

7. Brossard, Y, 2002. M. Diagnostic et suivi prénatals des allo-immunisations érythrocytaires. Feuill Biol, 43, 11-17

- На графике ниже (рис. 1) показаны ожидаемые значения после инъекции 1 дозы реагента anti-D (RH1) — 200 мкг (оранжевый) и 300 мкг (зеленый).
- Возможная интерпретация:
 - Если концентрация реагента anti-D (RH1) в пробе явно < ожидаемого значения, весьма вероятно, что реагент anti-D (RH1) — это антитело, полученное пассивным методом;
 - если концентрация реагента anti-D (RH1) в пробе явно > ожидаемого значения, необходимо провести тестирование новой пробы через несколько недель (как правило, 2 недели), так как может иметь место аллоиммунизация в присутствии реагента anti-D (RH1).

При отсутствии информации о точной дате инъекции профилактической дозы обратите внимание на документирование результатов. В идеале необходимо провести тестирование новой пробы с указанием соответствующей информации о датах.

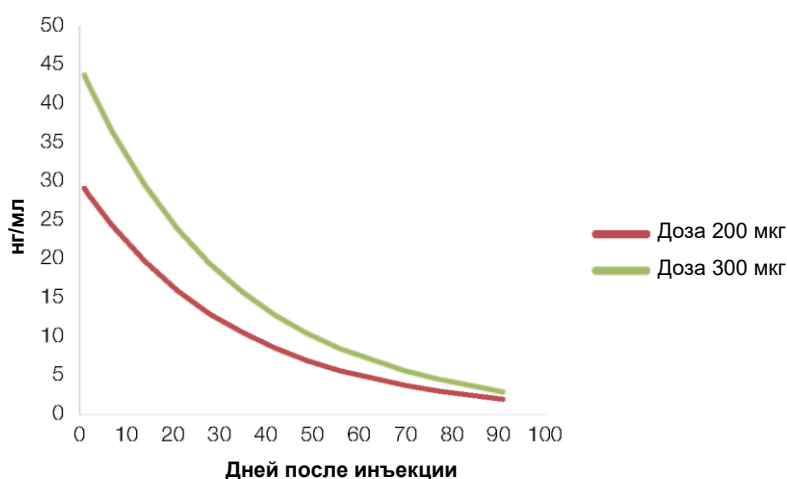


Рис.1.

3

ЧАСТО ЗАДАВАЕМЫЕ ВОПРОСЫ

В: Будут ли получены разные титры, если проводить титрование при использовании системы ИН-500 с разведением проб для ID-титрования?

О: Надлежащая лабораторная практика рекомендует пересмотреть и заново определить “нормальные” значения в случае значительного изменения процедуры тестирования. В противном случае могут возникнуть затруднения для врачей, принимающих решения о назначении терапии.

Эти решения зависят, в том числе, от результатов титрования,

иначе говоря, критические титры для антител, обнаруженных при беременности, или титры для группы крови АВ0 при несовместимости с этой группой крови, должны быть пересмотрены и переданы клиническим специалистам.

В: Почему, в отношении беременности, так важно сравнивать титры предыдущей и новой проб?

О: Титрование предыдущей пробы параллельно с предыдущей призвано подтвердить, что изменение титров не вызвано вариативностью, свойственной методу.

В: Почему два значения титров, полученных при тестировании в разных условиях, нельзя сравнивать?

О: Как указывалось выше, вариативность при титровании должна оцениваться и между методами, и в пределах одного метода. Титры, полученные для разных тестов, дают недостоверные результаты и не могут сравниваться друг с другом.

В: Почему необходимо обновить пороговые значения при изменении метода титрования?

Применяемая технология влияет на результаты титрования; поскольку титры, полученные разными методами, нельзя сравнивать, необходимо заново установить пороговые значения титров (критические титры).

В: Какие действия необходимо выполнить, чтобы установить новые пороговые значения титров?

Титрование должно выполняться при значительном количестве антител с использованием старого и нового методов. Необходимо тщательно выбрать антитела по классу иммуноглобулина (G или M, что особенно важно при трансплантации органов, несовместимых с группой крови АВ0). Также важно включить антитела с титрами, близкими к пороговым значениям.

В: Почему необходимо проводить новую идентификацию антител для каждой новой пробы?

Иммунизированные пациенты более склонны к тому, чтобы в их организме возникали новые антитела. Эти новые антитела могут повлиять на результаты титрования, как указано в разделе [2.4 на стр. 9](#); таким образом, важно подтвердить или исключить их присутствие или отсутствие.



Компания
Bio-Rad Laboratories

Группа клинической
диагностики

Веб-сайт www.bio-rad.com/diagnostics США 61-2-9914-2800 Австралия 43-1-877-8901 Австрия 43-1-877-8901 Бельгия +32 (3)710-53-00 Бразилия 710-53-00
Канада 1-514-334-4372 Китай 86-21-61698500 Чехия 3689-6600 Дания 1-514-334-4372 Финляндия 86-21-61698500 Франция 420-241-430-532 Германия 45-4452-1000
Греция 358-9-804-22-00 Гонконг 33-1-47-95-60-00 Венгрия +36-1-459-6100 Индия 1800-180-1224 Израиль 89-318-840 Италия 30-210-7774396 Япония 852-2789-3300
Корея 36-1-459-6100 Малайзия 1800-180-1224 Мексика 972-3-9638050 Нидерланды 39-02-216081 Новая Зеландия 81-3-6361-7070 Норвегия 82-2-3473-4460
Польша 48-22-3319989 Португалия 351-21-472-7700 Россия 9488-7670 Сингапур 31-318-540666 Южная Африка 64-9-415-2280 Испания 47-23-38-41-30
Швеция 48-22-3319999 Швейцария 351-21-472-7700 Тайвань 7-495-721-1404 Таиланд 65-6415-3170 Соединенное Королевство 020 8328 2000