

*Прив.-доц. Н. И. БЛИНОВ*

## **Простой метод определения групповой принадлежности кровяного пятна**

Из сывороточной лаборатории Ленинградского научно-исследовательского института переливания крови (дир. В. В. Кухарчик)

Для определения групповой принадлежности кровяных пятен существует ряд способов. Одни из них выявляют агглютинины пятна, с помощью вторых определяются агглютиногены. Так как агглютинины являются менее стойкими и могут легко разрушаться в кровяном пятне, то и способы, основанные на их выявлении, не всегда дают возможность определить групповую принадлежность; наиболее точным и наиболее распространенным является способ, устанавливающий наличие агглютиногенов в кровяном пятне путем адсорбции агглютининов из стандартной сыворотки. При этом способе определенные весовые количества ткани вместе с находящимся на ней кровяным пятном измельчаются и смешиваются с определенными количествами стандартной сыворотки группы О или группы А и В, причем сыворотки берутся в постепенно возрастающих разведениях. Так как некоторые ткани сами по себе могут адсорбировать агглютинины из стандартных сывороток, то всегда приходится ставить параллельные контрольные опыты с той же тканью без кровяного пятна.

Этот способ является довольно точным, но громоздким; иногда же он дает весьма неопределенный результат вследствие сильной адсорбции агглютининов самой тканью.

Чтобы устранить неспецифическую адсорбцию агглютининов тканью, мы предлагаем использовать для определения групповой принадлежности кровяного пятна метод задержки агглютинации, при котором ткань не принимает никакого участия в реакции.

Известно, что под действием дистиллированной воды эритроциты разрушаются, а агглютиногены переходят в раствор, лаковая кровь содержит в растворенном виде агглютиноген, иначе говоря, агглютиногены могут легко растворяться в воде.

Если сухую кровь, находящуюся на ткани или каком-либо другом предмете, растворить в физиологическом растворе, то бывшие в этих кровяных пятнах агглютиногены перейдут в раствор, а перешедшие в раствор агглютиногены легко можно определить с помощью метода задержки агглютинации. Таким образом, растворив кровяное пятно, и действуя только указанным раствором, мы полностью устраняем возможную неспецифическую адсорбцию самой тканью.

Определение групповой принадлежности кровяного пятна у нас производилось следующим образом: ткань с кровяным пятном заливалась физиологическим раствором, количество последнего бралось в зависимости от количества имеющейся сухой крови; чем концентрированнее получается раствор, тем лучше с ним работать; однако,

очень густая темная окраска раствора может мешать наблюдению за наступлением реакции агглютинации.

Реакцию задержки агглютинации мы вначале производили в пробирках, а затем начали применять капельный способ на тарелке.

Для производства опыта в пробирках бралась сыворотка группы А и сыворотка группы В в различных разведениях: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. Каждое разведение сыворотки наливалось в две агглютинационные пробирки по 0,1 см<sup>3</sup> в каждую. Одна пробирка для опыта, вторая для контроля. В опытные пробирки добавлялось по 0,1 см<sup>3</sup> экстракта кровяного пятна, а в контрольные по 0,1 см<sup>3</sup> физиологического раствора; затем во все пробирки, в которых находилась сыворотка группы А, прибавлялось по 0,1 см<sup>3</sup> 1<sup>0/10</sup> эмульсии эритроцитов группы В, а в пробирки, где была сыворотка группы В, добавлялась 1<sup>0/10</sup> эмульсия эритроцитов группы А в количестве 0,1 см<sup>3</sup>. Легкими встряхиваниями пробирок эритроциты равномерно смешивались с сывороткой и оставались при комнатной температуре в течение получаса, после чего в них определялось наличие агглютинации; если в кровяном пятне находится какой-либо агглютиноген, то он будет соединяться с агглютинином сыворотки, а в зависимости от количества агглютиногена, начиная с какого-либо разведения, агглютинин сыворотки будет полностью связан, и в этой пробирке агглютинация эритроцитов не произойдет, в то время как в соответствующем контроле агглютинация будет выражена.

В зависимости от того, с какими эритроцитами произойдет задержка, можно будет судить об агглютиногене кровяного пятна. Если задержка наступает с эритроцитами группы А, то в пятне находился агглютиноген А, то же самое по отношению к агглютиногену В; если задержка наступила и с эритроцитами А и с эритроцитами В, кровяное пятно принадлежит к группе АВ; если задержки не получилось, то пятно будет нулевой группы. Так как в кровяном пятне могут содержаться и агглютинины, то этот же экстракт можно использовать для их определения обычным методом, т. е., смешивая экстракт пятна со стандартными эритроцитами группы А и группы В. Но специально эту пробу при разбираемом методе делать не приходится, потому что при добавлении экстракта пятна, если он не подвергался кипячению, к разведению нулевой сыворотки мы вводим некоторое количество агглютинина и тем самым усиливаем сыворотку, поэтому в одном из разведений сыворотки с кровяным экстрактом агглютинация стандартных эритроцитов может наступить, в то время как в соответствующем контроле агглютинации не будет.

Таким образом, предлагаемым методом при постановке одной пробы мы сразу можем выявить и агглютиногены и агглютинины пятна. Агглютиногены будут давать задержку агглютинации с эритроцитами, содержащими одноименный фактор, а агглютинины дадут усиление агглютинации эритроцитов, имеющих соответствующий агглютиноген.

При работе с этим методом оказалось, что можно группу пятна определить и капельным способом, производя реакцию на тарелке. Удалось выяснить, что наиболее подходящими разведениями сыворотки для этой реакции будет разведение 1:20; вместо сыворотки группы А и группы В можно брать сыворотку группы О, имеющую одновременно оба агглютинина  $\alpha$  и  $\beta$ .

Техника производства реакции капельным методом такова: на тарелку наносится в четырех разных углах по две капли одного какого-либо разведения сыворотки группы О, лучше всего начинать с разведения 1:20, затем в сыворотку, находящуюся в двух верхних углах, добавляется по две капли физиологического раствора, а в нижние—по две капли испытуемого экстракта пятна. Все капли должны наноситься с одинаковой высоты одной и той же пипеткой, чтобы размер их был одинаков. Удобнее брать все указанные выше вещества градуированными пипетками в количестве 0,1. Затем к полученным каплям смеси одновременно добавляют по 0,05 см<sup>3</sup> или по одной капле 1% эмульсии эритроцитов; в левые капли (т. е. в сыворотку с физиологическим раствором и в сыворотку с экстрактом пятна) вносится эмульсия эритроцитов группы А, в правые—эмульсия эритроцитов группы В. После этого, покачивая тарелку, наблюдают наступление агглютинации.

При наличии в кровяном пятне агглютиногенов с соответствующими эритроцитами происходит задержка агглютинации на 30—40 секунд, иногда на 2—3 минуты или же агглютинации не наступает вовсе. Очень часто агглютинин пятна вызывает ускорение агглютинации соответствующих эритроцитов. Если в сыворотке с экстрактом пятна наблюдается задержка агглютинации эритроцитов одной группы и усиление агглютинации эритроцитов другой группы, то сразу же можно сделать точный вывод о групповой принадлежности исследуемого пятна. При отсутствии задержки агглютинации или при наличии ее с эритроцитами обеих групп или вообще при неясности полученных результатов, пробу необходимо переделать с другим разведением сыворотки, т. е. с разведением 1:10 и 1:40.

Экстракт кровяного пятна всегда имеет коричневую окраску, на фоне которой можно просмотреть наступающую агглютинацию и сделать неверный вывод. Для устранения этого недостатка мы предлагаем прокипятить экстракт в течение полуминуты. В результате этого образуются коричневые хлопья свернувшегося белка, плавающие в прозрачном растворе агглютиногена. Фильтрованием или центрифугированием хлопья отделяются, и получается прозрачный раствор агглютиногена, с которым задержка агглютинации происходит так же, как и с некипяченым раствором, потому что кипячение в течение полуминуты не оказывает на агглютиноген никакого влияния. Агглютиногены и при более длительном кипячении не разрушаются. Этот метод нами проверялся много раз с пятнами заведомо известной крови; группу крови удавалось определить всегда точно.

Кроме того, мы, совместно с доктором А. П. Петровым, несколько раз определяли групповую принадлежность кровяных пятен на вещественных доказательствах, результат всегда совпадал с результатами, полученными с помощью других методов.

Предлагаемый нами метод обладает рядом преимуществ: 1) является технически более простым, чем метод адсорбции агглютининов, несколько не уступая ему в точности; 2) для определения групповой принадлежности пятна требует немного времени; 3) полностью устраняет влияние самой ткани или другого субстрата на течение реакции; 4) может производиться с весьма небольшим количеством материала.