Bulletin of Medical Internet Conferences (ISSN 2224-6150)
2013. Volume 3. Issue 3

ID: 2013-03-3930-A-2618 Оригинальная статья

Дубровский В.А., Забенков И.В., Медведева М.Ф., Торбин С.О.

Сравнение турбодиметрического и микроскопического методов регистрации агглютинации эритроцитов in vitro

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, кафедра медбиофизики им. проф. В.Д. Зернова

Ключевые слова: агглютинация эритроцитов цифровая микроскопия турбидиметрия

Введение

Определение группы крови по системе АВ0 или Rh (системе резус) является одним из наиболее часто используемых тестов лабораторной диагностики. Например, в США ежегодно проводится от 150 до 200 млн подобных тестов в центрах по переливанию крови

[1]. Учитывая соотношение населения России и США можно полагать, что в нашей стране количество тестов по типированию крови приближается к 100 млн в год. Естественно, такая частотность тестирования крови на групповую принадлежность требует создание специальной аппаратуры, автоматов для определения группы крови, например [2-10].

К сожалению, вынуждены констатировать, что по сведениям, которыми мы располагаем, отечественные приборы, автоматы для определения групп крови к настоящему времени отсутствуют. Это делает любые разработки данного направления актуальными.

Одной из наиболее важных характеристик такого рода приборов является его разрешающая способность. Авторы различных работ определяют этот параметр по-разному [6,7, 11, 12]. Напомним, что под разрешающей способностью можно понимать отношение оптического сигнала ***P+***, соответствующего положительной реакции агглютинации (сыворотка иммунологически адекватна группе исследуемой крови – агглютинаты образуются), к уровню фото сигнала ***P-*** для отрицательной реакции агглютинации (сыворотка не соответствует данной группе крови - агглютинаты не образуются) [11,12]. Очевидно, что увеличение разрешающей способности ***K***= ***P+***/***P-*** повышает надёжность определения группы крови. Чрезвычайно важно отметить, что ошибка в определении группы крови образца должна исключаться абсолютно, единственное послабление прибору – в некоторых случаях он может не определить группу крови анализируемой пробы.

Один из способов повышения разрешающей способности прибора – использование стоячих ультразвуковых волн, предложенное в [13] и детально рассмотренное в [14,15]. Действительно, применение ультразвука приводит, в частности, к укрупнению формируемых агглютинатов, что облегчает их оптическую регистрацию независимо от наблюдаемых явлений: движение агглютинатов в потоке исследуемой жидкости [11] или их седиментация в кювете [12]. Сочетание ультразвукового действия на исследуемый биообъект с одновременным его зондированием световым излучением будем называть акусто-оптическим методом типирования крови.

Задача настоящей работы – анализ возможностей развития акусто-оптического метода регистрации агглютинации эритроцитов с целью повышения надежности определения групповой принадлежности крови человека. В работе:

1) исследуются возможности метода цифровой фотографии для регистрации усиленной ультразвуком седиментации агглютинатов; оптическое зондирование биообъекта основано на турбидиметрии; проведено сравнение прямого и обратного методов перекрестного определения группы крови;

2) впервые предложено использование метода цифровой микроскопии для типирования крови человека;

3) проведено сопоставление экспериментальных результатов в типировании образцов крови на основе двух методов: турбидиметрического и метода цифровой микроскопии.

Материал и методы

Объектом исследования являлась донорская кровь всех четырех групп по системе АВ0, соответствующие агглютинирующие сыворотки (прямой метод типирования крови) и стандартные эритроциты (обратный метод). Образцы донорской крови подвергались центрифугированию (3000 обор/мин, 5 минут), затем эритроцитарная масса и плазма использовались для определения группы крови образца прямым и обратным методами соответственно. Комплекс предварительных экспериментов выявил оптимальные условия для наблюдения реакции агглютинации эритроцитов. Для прямого метода оптимальными являются: соотношение «стандартная сыворотка»/«исследуемые эритроциты» равное 10: 1, при условии, что эритроцитарная масса разбавляется физиологическим раствором в соотношении 1:60. Для обратного метода оптимальными являются: соотношение «исследуемая плазма»/«стандартные эритроциты» равное 2:1, при условии, что исследуемая плазма разводится физиологическим раствором в соотношении 1 : 4. Для исследований использовалась кювета объемом 2800 мкл прямоугольной формы с внутренней толщиной зазора 5 мм.

Сразу после приготовления каждая проба подвергалась воздействию стоячей ультразвуковой волны. Кювета с исследуемой смесью располагалась на пьезопреобразователе, волна ориентировалась в вертикальном направлении. Для возбуждения пьезокерамического преобразователя использовался генератор Г3-112/1 с усилителем, а его выходное напряжение контролировалось осциллографом С1-79. Генератор настраивался резонансно по отношению к преобразователю ***ν***=2,25 МГц, а его выходное напряжение, подаваемое на пьезокерамику, не превышало 15 В, что обеспечивало ультразвуковое действие на эритроциты без их гемолиза.

Предварительные эксперименты позволили подобрать оптимальное время действия ультразвука на смесь «стандартная сыворотка»/«исследуемые эритроциты» - 60 с. Это же время использовалось и для смеси «исследуемая плазма»/«стандартные эритроциты».

 © Bulletin of Medical Internet Conferences, 2013

Турбидиметрия

Действие стоячей ультразвуковой волны приводило к группировке эритроцитов в ее узлах, взвесь эритроцитов расслаивалась, эритроциты и их агглютинаты левитировали в исследуемой жидкости. При выключении ультразвука крупные агглютинаты быстро седиментировали (положительная реакция агглютинации), а среда значительно просветлялась. При отрицательной реакции выключение ультразвука приводило к рассыпанию эритроцитарных агрегатов в силу их слабых (не иммунных) связей, среда оставалась мутной, менее прозрачной.

В момент выключения ультразвука включалась CCD и в течение 1,5 минут снималось видео оседания агглютинатов. Типичные фото кадры для положительной и отрицательной реакций агглютинации эритроцитов представлены на рис.1.

Биообъект зондировался коллимированным излучением светодиода типа LXHL-G1S, спектр которого соответствовал спектру поглощения гемоглобина в зеленой области (рис.2).

Луч, прошедший исследуемый раствор, поступал на полихромную веб-камеру Logitect-Quick Cam, подключённую к ПК. Отметим, что все настройки веб-камеры были зафиксированы и не изменялись при проведении экспериментальных работ. Для 8-разрядной цифровой камеры кодирование состояния одного пикселя с помощью одного байта позволяет передавать 256 различных оттенков, например, серого цвета от полностью черного (B=0 ед. яркости) до полностью белого (B=255 ед. яркости)

При компьютерной обработке видеоизображений седиментации агглютинатов осуществлялось разложение каждого из фото кадров на RGB компоненты, а статистическому анализу подвергалась лишь G составляющая. На рис.1 показаны области, по которым производилось усреднение величин яркости изображений. Средние величины яркостей для положительной и отрицательной реакций агглютинации сравнивались между собой для различных образцов донорской крови и различных сывороток.

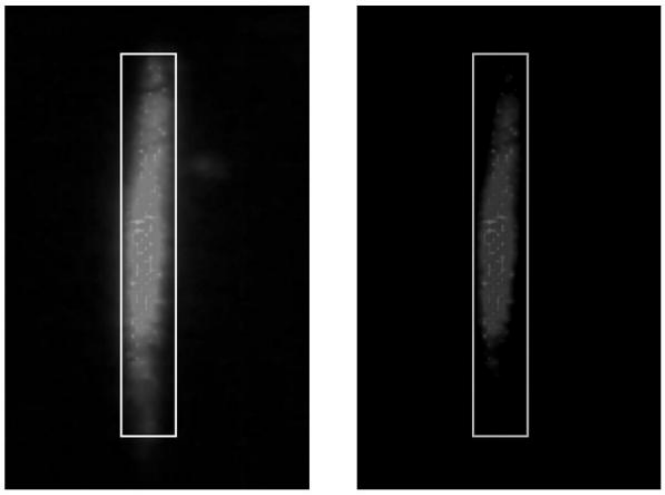

Рис. 1. Типичные фотографии засветки кюветы с исследуемым раствором для: а) положительной и б) для отрицательной реакций агглютин

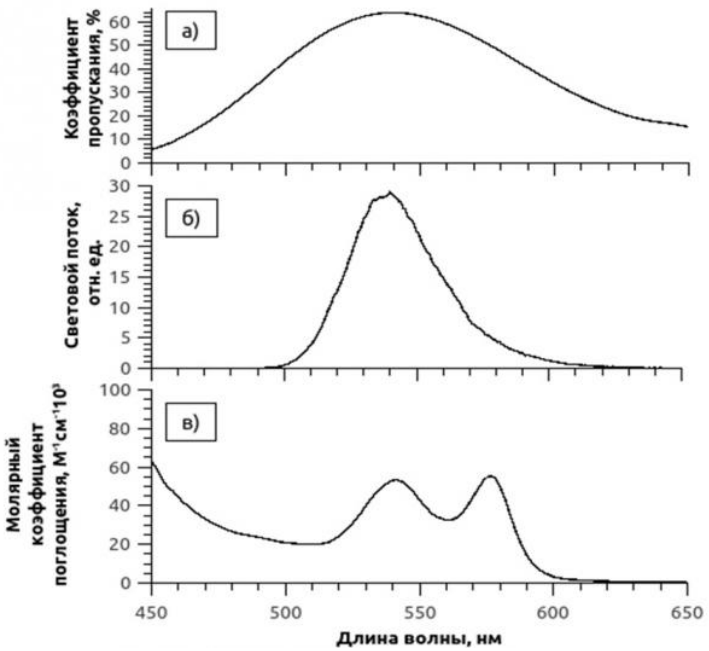

Рис. 2. Спектры: а) светофильтра цифрового микроскопа; б) излучения светодиода; в) спектр поглощения гемоглобина.

Bulletin of Medical Internet Conferences (ISSN 2224-6150)
2013. Volume 3. Issue 3

Цифровая микроскопия

Турбидиметрические измерения для каждой из проб крови сопровождались параллельно измерениями на основе метода цифровой микроскопии. Однако, заметим, что микроскопические исследования выполнялись по окончании турбидиметрических измерений последовательно для каждой из проб крови. Агглютинаты объемом 20 мкл набирались со дна кюветы с помощью дозатора и разбавлялись в 400 раз в физиологическом растворе. Из полученной смеси отбиралась капля объемом 20 мкл, которая располагалась на предметном стекле. С помощью микроскопа ЛОМО БИОМЕД изготавливалось 15 фотографий в различных областях изображения капли. Коэффициент увеличения объектива оптического микроскопа 10^x, окуляра 10^x. Величина поля зрения 0,8 мм. На пути светового луча (подсветка микроскопа) устанавливался светофильтр с максимумом пропускания света на длине волны 540 нм, т.е. в области поглощения света гемоглобином. К окуляру микроскопа подключалась полихромная цифровая камера Logitect-Quick Cam с разрешением 2 Мега пикселя. Отметим, что изготовление 15 фото изображений в различных областях одной капли образца вызвано желанием получить достаточную базу данных для достоверной статистической обработки экспериментальных результатов с данным образцом смеси, например, «кровь-сыворотка». На рис.3 представлены типичные фото изображения эритроцитов (отрицательная реакция, рис 3а) и эритроцитарных иммунных комплексов (положительная реакция агглютинации: 3б – без применения ультразвука и 3в – с применением ультразвукового действия на смесь, например, «кровь-сыворотка»).

Из рис.3а легко видеть, что при отрицательной реакции агглютинации даже в присутствии ультразвуковой волны, наблюдаются лишь одиночные эритроциты, агглютинаты, естественно, отсутствуют. При положительной реакции агглютинаты, сформированные ультразвуковой волной (рис.3в), значительно превышают по размерам подобные же эритроцитарные образования, полученные без участия ультразвука (рис.3б).

При компьютерной обработке изображений, подобных рис.3а.в, фотокадры раскладывались на RGB компоненты, а затем подвергались бинаризации. Последняя процедура облегчала определение площадей, занимаемых агглютинатами.

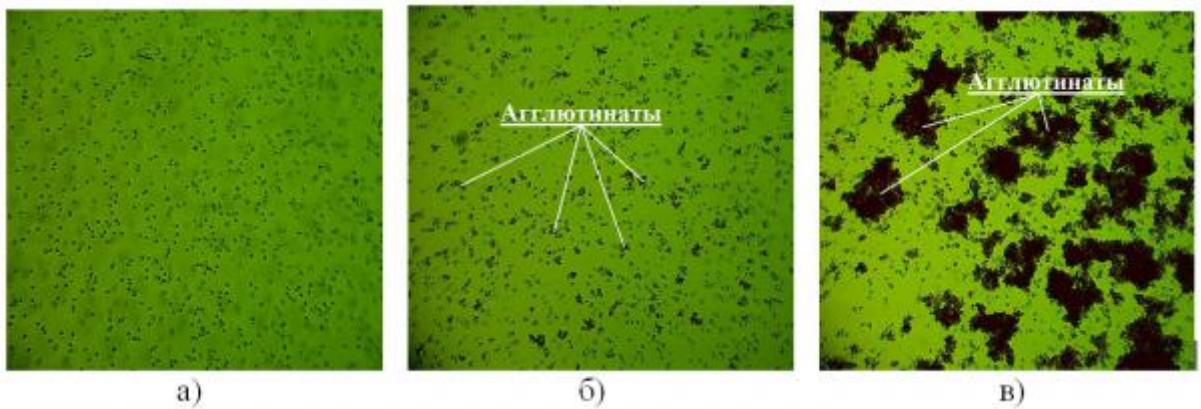

Рис. 3. Оригинальные изображения растворов кровь-сыворотка: а) отрицательная реакция агглютинации; б) положительная реакция агглютинации без применения ультразвука; в) положительная реакция агглютинации с применением ультразвукового действия

Результаты

Как отмечалось в предыдущем разделе, эксперименты по перекрестному определению группы крови проводились на одних образцах донорской крови как прямым, так и обратным методами. Для каждого из них турбидиметрические исследования параллельно сопровождались микроскопическими. Результаты сведены в таблицы 1 и 2.

Введенные в таблицы обозначения:

1) S – суммарная площадь, занимаемая агглютинатами эритроцитов (положительная реакция) или некоторыми эритроцитарными образованиями не иммунологической природы (отрицательная реакция);

2) B – среднее значение яркости изображения в областях, выделенных для обработки результатов (рис.1);

3) серым цветом выделены ячейки таблиц, которые принципиально соответствуют условиям для отрицательных реакций агглютинации.

4) эксперименты со «стандартными эритроцитами» АВ(IV) не выполнялись в связи с отсутствием их производства в центрах крови.

Обсуждение

Из таблиц 1 и 2 .видно следующее.

Для прямого метода величины разрешающей способности K составляют от единиц и десятков до сотни для турбидиметрического метода ($K=B_+/B_-$, где B_+ и B_- - средние значения яркостей для положительной и отрицательной реакций соответственно). В то же время метод микроскопии дает $K=S_+/S_-$ от десятков до тысяч в зависимости от пары «стандартная сыворотка» - «исследуемые эритроциты».

Для обратного метода турбидиметрии соответствуют значения $K=B_+/B_-$ в десятки единиц, а микроскопии $K=S_+/S_-$ от десятков до тысяч единиц.

© Bulletin of Medical Internet Conferences, 2013

Таблица 1. Прямая реакция

Группа крови	0(I)		A(II)		B(III)		AB(IV)	
Сыворотка	S, мкм^2		S, мкм^2		S, мкм^2		S, мкм^2	
0(I)	2870	1,3	1023980	147,2	2176873	65,0	1045379	143,9
A(II)	1874	6,5	1026	4,4	3497490	33,8	45975	5,8
B(III)	2164	1,0	2595797	95,4	2219	1,6	52828	23,7
AB(IV)	2141	6,4	1114	2,8	1506	3,1	1568	3,1

Таблица 2. Обратная реакция

Группа крови	0(I)		A(II)		B(III)		AB(IV)	
. Стандарт эритроциты	S, мкм^2		S, мкм^2		S, мкм^2		S, мкм^2	
0(I)	1583	3,4	1003	1,9	1902	3,5	2105	2,7
A(II)	7638121	53,1	2156	1,2	4440494	59,8	1856	1,4
B(III)	533777	48,7	481144	32,2	1466	0,9	1319	1,4

Применение турбидиметрического метода исследования не всегда давало однозначный ответ на вопрос о группе крови образца, в то время как результаты метода цифровой микроскопии отличались своей однозначностью, хотя его разрешающая способность также варьировалась для разных образцов крови, сывороток и стандартных эритроцитов.

Оценка коэффициентов корреляции Rs результатов определения группы крови для образцов представленных в таблицах 1 и 2 для турбидиметрического и микроскопического методов (по Спирмену) указывает на определенное их соответствие: для прямого метода Rs=0.65 и Rs=0.74 для обратного метода. Представляется, что не высокие значения коэффициентов корреляции Rs обусловлены в большей степени неоднозначностью типирования крови турбидиметрическим методом в связи с его многофакторностью.

Заключение

Проведенные экспериментальные исследования позволяют сделать следующие выводы.

1) Подобранные условия для определения группы крови образца обратным методом позволяют достичь приемлемых величин разрешающей способности типирования крови. В то же время следует продолжить проработку вопросов по их оптимизации. Сочетание прямого и обратного методов перекрестного определения групповой принадлежность крови повысит надежность инструментального ее типирования.
2) Предложенный здесь метод цифровой микроскопии позволил получить высокие значения разрешающей способности в определении группы крови, он является чрезвычайно перспективным методом для создания соответствующих приборов.

Метод цифровой микроскопии является прямым методом исследования в отличие от турбидиметрического, который зависит от многих факторов. Поэтому можно полагать метод цифровой микроскопии как эталонный для определения группы крови образцов. В то же время этот метод является статическим, он не позволяет отслеживать динамику процесса агглютинации эритроцитов, их седиментацию, такие исследования целесообразно проводить турбидиметрическим методом.

Литература

1. Vyas G.N. et al. (San Francisco, CA), Simultaneous human ABO and RH(D) blood typing or antibody screening by flow cytometry, United States Patent 5,776,711 July 7, 1998.
2. Sturgeon P. *Immunohematology,* 17, 4 (2001)
3. Kline T.R., Runyon M.K., Pothiawala M., Ismagilov R.F. *Anal Chem.*, 80(16) 6190-7 (2008)
4. Muranyi I. et al. (Budapest, HU)**,** Blood typing apparatus,United States Patent 4533638, US Patent Issued on August 6, 1985
5. Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., Щербакова И.В., Балаев А.Э., *Приборы и техника эксперимента*, 42(2), 111-115 (1999),
6. Steven R.A. A Simplified Visible/Near-Infrared Spectrophotometric Approach to Blood Typing for Automated Transfusion Safety, a thesis presented to North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA, (2005).
7. Lambert J.B. A miniaturized device for blood typing using a simplified spectrophotometric approach, a thesis submitted to North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA, (2006)
8. Moncharmont P., Plantier A., Chirat V., Rigal D. *Immunohematology*, 19(2), 54-6 (2003)
9. Goldfinger Dennis, et al. (Encino, CA)**,** Portable blood typing apparatus and method United States Patent 4650662, US Patent Issued on March 17, 1987
10. Battrell, C.F. et al., Microfluidic apparatus and methods for performing blood typing and crossmatching, United States Patent, Patent application number: 20100112723, Publication date: 05/06/2010
11. Yu. A. Ganilova, V.A. Doubrovski, I. V. Zabenkov, The resolving power of the flowing method to register the process of human erythrocytes agglutination in vitro on the base of correlation analysis of microphotographs, // Proc.SPIE. 2011 V7999. 799903
12. Дубровский В. А. , Долмашкин А. А. , *Опт. и спектр*., 109(2), 1346-50 (2010)
13. Алипов А.Н., Ванинский В.З., Денисов Л.Б., Донсков С.И., Дубровский В.А., Завьялов Э.Н., Князьков Н.Н. Способ определения реакции агглютинации Авторское свидетельство изобретения. №1683760, приоритет от 04.06.1987, опубликовано Бюл. №38 от 30.10.1991
14. Doubrovski V.A., Dvoretski K.N. *Ultrasound in Medicine & Biology*., 26(4), 655 (2000).
15. Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., Балаев А.Э. *Акустический журнал,* 50(2), 184 (2004).