

Определение группы крови на основе регистрации упругого рассеяния лазерного излучения методом цифровой фотографии

А.А.Долмашкин, В.А.Дубровский, И.В.Забенков

Демонстрируется возможность определения группы крови человека на основе регистрации рассеяния лазерного излучения методом цифровой фотографии. Экспериментально показано, что действие стоячей ультразвуковой волны приводит к ускорению реакции агглютинации эритроцитов, к формированию более крупных иммунных эритроцитарных комплексов и, как следствие, к ускорению их седиментации. В то же время в отсутствие агглютинации эритроцитов ультразвук не интенсифицировал аналогичные процессы. Такое различие в результатах ультразвукового воздействия на смесь кровь–сыворотка позволяет предложить метод определения группы крови. Теоретическое моделирование техники практического определения группы крови, проведенное на основе теории упругого светорассеяния, хорошо согласуется с экспериментальными результатами, что позволило наметить путь дальнейшего совершенствования предлагаемого метода. Исследования особенностей седиментации эритроцитов и их иммунных комплексов были направлены на оптимизацию подготовки проб, т.е. на поиск таких экспериментальных условий, при которых разрешающие способности метода и устройства для регистрации реакции агглютинации эритроцитов максимальны. Результаты исследования могут быть использованы при разработке приборов для инструментального определения группы крови человека.

Ключевые слова: определение группы крови, агглютинация, рассеяние света, уравнение переноса излучения, метод Монте-Карло.

1. Введение

Определение группы крови по системе АВ0 или Rh (системы резус) является одним из наиболее часто используемых тестов лабораторной диагностики. Например, в США в центрах по переливанию крови ежегодно проводится от 150 до 200 млн подобных тестов [1]. 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 создания специальной аппаратуры – автоматов для определения группы крови (см., напр., [2–10]).

В табл. 1 приведен перечень известных авторам приборов для определения групп крови. К сожалению, мы вынуждены констатировать, что, по нашим сведениям, подобных отечественных приборов для определения групп крови пока не существует. Это делает актуальными исследовательские разработки в данном направлении.

Возможность увеличения разрешающей способности оптических приборов для определения группы крови путем использования ультразвуковых (УЗ) волн рассматривалась в [11–15]. 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

Табл.1. Приборы для инструментального определения группы крови человека.

Прибор	Фирма	Страна
Galileo Echo™	ImmucorGamma	США
PK7200® Automated Microplate System	Olympus Diagnostics	Япония
TANGO Benchtop Blood Bank Analyzer		
ORTHO AUTOVUE Innova/ Ultra System	Ortho-Clinical Diagnostics	США
ORTHO ProVue™ Automated BloodBank Instrument	Johnson & Johnson Company	
Automatic Analyzer WADiana Compact	Diagnostic Grifols S.A.	Испания
Auto Analyzer	Technicon Instrument Corporation	США
Groupamatic	Centre National de Transfusion	Франция
Haemotyper	Tecan	Швейцария

оптического сигнала P_- , соответствующего отрицательной реакции агглютинации (сыворотка не соответствует данной группе крови – агглютинаты не образуются). Очевидно, что увеличение разрешающей способности $K = P_+/P_-$ повышает надежность определения группы крови. Чрезвычайно важно отметить, что ошибка в определении группы крови образца должна исключаться абсолютно. Единственное послабление прибору – в некоторых случаях он может вообще не определить группу крови анализируемой пробы.

Физические принципы приборов для определения групп крови могут быть различными, однако следует отметить, что регистрация оптических сигналов и математическая

А.А.Долмашкин, В.А.Дубровский, И.В.Забенков. Саратовский государственный медицинский университет им В.И. Разумовского, Россия, 410026 Саратов, Б.Казачья, 112; e-mail: alal777@yandex.ru, doubrovski43@yandex.ru, zabenkoviv@gmail.com

их обработка, как правило, проводилась в аналоговом режиме. В то же время метод цифровой фотографии в приложении к определению групп крови является, по нашему мнению, современным и перспективным. Он позволяет проводить соответствующую цифровую математическую обработку результатов, вносить результат обработки в память ПК, представлять результаты в виде медицинских документов. Принципиальная возможность применения цифровой фотографии для регистрации процесса агглютинации и седиментации агглютинатов с целью определения группы крови рассмотрена в [16].

Цель настоящей работы – анализ возможностей, которые предоставляет сочетание рассмотренного ранее авторами УЗ воздействия на реакционную смесь кровь–сыворотка с цифровой регистрацией и обработкой процесса агглютинации эритроцитов, седиментации эритроцитов и их агглютинатов. Особое внимание уделено моделированию предлагаемого метода типирования крови и оптимизации подготовки проб для повышения разрешающей способности при определении групповой принадлежности крови человека.

2. Объект исследования, техника эксперимента

Исследовалась донорская кровь, в основном второй (А(II)) и третьей (В(III)) групп, в сочетании с гемагглютинирующими сыворотками, как правило типов A_{β} (II) и B_{α} (III). Необходимо отметить, что в последние годы станции переливания крови часто поставляют в клиники для трансфузии не цельную кровь, а так называемую эритроцитарную массу, т.е. кровь, из которой после центрифугирования изъято некоторое количество плазмы. Именно эритроцитарная масса донорской крови была объектом исследования. Концентрация эритроцитов в ней примерно вдвое выше, чем в цельной крови. Для краткости ниже такую массу будем называть образцом крови. Напомним, что кровь группы А(II) не агглютинирует с сывороткой A_{β} (II) – отрицательная реакция, но кровь А(II) + сыворотка B_{α} (III) дает агглютинацию эритроцитов – положительная реакция. Аналогично В(III) + B_{α} (III) – отрицательная реакция агглютинации эритроцитов, но В(III) + A_{β} (II) – положительная. Отработка техники эксперимента и оптимизация подготовки проб проводились на этих типах реакций. Реакция агглютинации реализовывалась в различных экспериментальных условиях: изменялись степень разбавления проб исследуемой крови и соотношения объемов крови и сыворотки, а также типы реакции и агглютинации (положительная или отрицательная) и др. Общее количество исследуемых образцов крови (доноров) – 32, или по группам: А(II) – 17 доноров, В(III) – 15. С учетом многообразия экспериментальных условий количество опытов с этими образцами крови достигло нескольких сотен.

Сыворотка разводилась физиологическим раствором, в который вносилась проба исследуемой крови. При этом в экспериментах объемное соотношение цельной крови и цельной сыворотки варьировалось от 1:100 до 1:2, а степень разбавления этой смеси изменялась от 1:100 до 1:10. Полученный раствор кровь–сыворотка в кювете размещался на пьезокерамическом преобразователе и облучался ультразвуком. Время облучения («озвучивание») в экспериментах варьировалось от 15 до 240 с. Для возбуждения пьезокерамического преобразователя использовался

генератор ГЗ-112/1 с усилителем, а его выходное напряжение контролировалось осциллографом С1-79. Генератор настраивался резонансно с частотой преобразователя ($\nu = 2.25$ МГц), а его выходное напряжение, подаваемое на пьезокерамику, не превышало 15 В, что обеспечивало УЗ воздействие на эритроциты без их гемолиза.

В работах [11–15] было показано, что при облучении ультразвуком раствора смеси кровь–сыворотка в кювете образовывалась стоячая УЗ волна, которая приводила к группировке эритроцитов и их комплексов в области ее узлов. В результате раствор крови расслаивался с пространственным периодом, равным половине длины УЗ волны ($\lambda/2$). Увеличение концентрации эритроцитов в узловых областях приводило к увеличению вероятности их взаимодействия, а следовательно, к агглютинации в случае положительной реакции. При этом возрастали как скорость реакции агглютинации, так и размеры иммунных эритроцитарных комплексов и, как результат, скорость седиментации агглютинатов при выключении УЗ генератора (окончание левитации эритроцитов и агглютинатов), а исследуемая среда становилась оптически более прозрачной.

При отрицательной реакции агглютинации эритроциты, сгруппированные в узловых областях, формируют «неспецифические» агрегаты, которые рассыпаются на отдельные эритроциты при выключении ультразвука. Естественно, скорость оседания свободных эритроцитов значительно ниже, чем агглютинатов, и среда длительное время остается мутной. Различие в величине оптического коэффициента пропускания исследуемых образцов в случаях положительной и отрицательной реакций несет информацию о том, состоялась реакция агглютинации или нет, что и используется для определения группы крови образца.

Оптическая схема экспериментальной установки представлена на рис.1. Пучок излучения He–Ne-лазера 1 (ЛГН-207Б) расширялся телескопической системой 2. Нейтральные светофильтры 3 ослабляли свет для обеспечения должного режима работы цифровой фотокамеры 7. Свет пропускался через вертикально ориентированную оптическую щель 4 (ширина 2 мм, высота 22 мм) и направлялся в кювету 5 с исследуемой жидкостью. Пучок, прошедший через исследуемый раствор, поступал на полихромную CCD-камеру 7 (Logitech Quick Cam), подключенную к ПК 8. Отметим, что все настройки CCD-камеры (в дальнейшем будем называть ее цифровой камерой) были за-

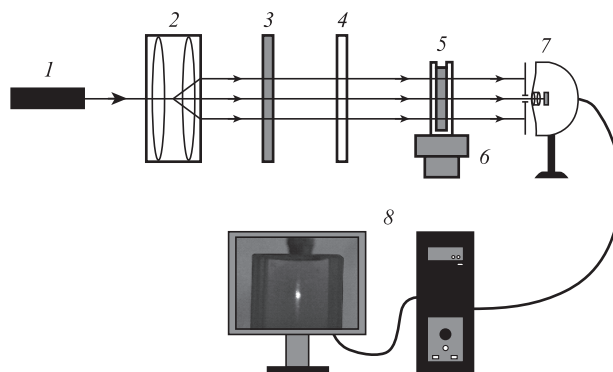


Рис.1. Оптическая схема экспериментальной установки: 1 – He–Ne-лазер; 2 – телескопическая система; 3 – нейтральные светофильтры; 4 – оптическая щель; 5 – кювета; 6 – пьезокерамический УЗ преобразователь; 7 – CCD камера; 8 – компьютер.

фиксированы и при проведении экспериментов не изменялись. Оптическая щель позволяла создавать на кювете световое пятно с размерами $\sim 2 \times 22$ мм, размеры внутренней полости кюветы составляли $18 \times 32 \times 5$ мм (объем ~ 2.8 мл).

Конструкция экспериментальной установки (рис.1) позволяла фотографировать и, следовательно, количественно определять распределение мощности излучения на выходе из кюветы с исследуемой жидкостью по глубине кюветы (рис.2,а), т.е. в направлении седиментации эритроцитов и их иммунных комплексов. В свою очередь это позволяло находить оптимальное положение зондирующего пучка лазера по оси y , при котором разрешающая способность $K = P_+/P_-$ максимальна. Типичные фотографии выходного торца кюветы, сделанные цифровой камерой 7 для случаев положительной и отрицательной реакций агглютинации, представлены на рис.2. Выделенные прямоугольниками полосы лазерной засветки кюветы с исследуемыми образцами D в основном определялись геометрией щели 4 (рис.1); они указывают положение и размеры зоны, выбранной для цифровой статистической обработки видеозображений, а также используемой для решения задач моделирования.

Математическая обработка фотографий основана на их оцифровке по пикселям и представлении результата в виде статистических выборок [17]. Для используемой нами 8-разрядной цифровой камеры кодирование состояния одного пикселя с помощью одного байта позволяет передавать 256 различных оттенков цвета, например серого – от полностью черного ($B = 0$) до полностью белого ($B = 255$ ед. яркости). Эксперименты с кровью предварялись проверкой линейности световой характеристики цифровой камеры – зависимости яркости изображения B , полученного с помощью цифровой камеры, от мощности падающего на нее светового потока P (в милливаттах), определяемого с помощью калиброванного фотоприемника Newport Power Meter 1815-с.

Полученные экспериментальные результаты аппроксимировались полиномом третьей степени:

$$B(P) = 4 \times 10^{-6} P^3 - 4.2 \times 10^{-3} P^2 + 1.5 P. \quad (1)$$

Найденная функция $B(P)$ с помощью ПК преобразовывалась в зависимость $P(B)$, которая наилучшим образом аппроксимировалась полиномом вида

$$P(B) = 5 \times 10^{-5} B^3 - 7.6 \times 10^{-3} B^2 + B. \quad (2)$$

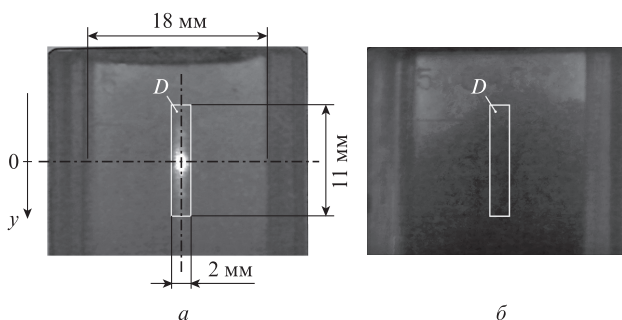


Рис.2. Типичные фотографии засветки кюветы с исследуемым раствором для случаев положительной (а) и отрицательной (б) реакций агглютинации эритроцитов. Прямоугольниками выделены зоны статистической обработки экспериментальных результатов и моделирования эксперимента.

График функции (2) можно рассматривать как калибровочную кривую цифровой камеры. Результаты дальнейших измерений обрабатывались математически с учетом этой зависимости, что позволяет расширить динамический диапазон регистрируемых световых потоков. Действительно, проведение экспериментов с использованием всей световой характеристики $B(P)$ ведет к искажению результатов, а работа лишь на линейном ее участке значительно ограничивает динамический диапазон измерений. Представляется важным отметить, что в экспериментах с биологическими объектами, динамически изменяющимися во времени, когда их коэффициент оптического пропускания изменяется в широких пределах, часто оказывается невозможным заранее предусмотреть, чтобы световые потоки, зондирующие биообъект, находились в пределах линейности световой характеристики цифровой камеры.

3. Результаты экспериментов

Разрешающая способность рассматриваемого здесь метода регистрации реакции агглютинации существенно зависит от выбора области зондирования исследуемой жидкости лазерным пучком. Эксперименты показали, что оптимальная область лежит в пределах 9–13 мм (вдоль оси y) от мениска исследуемой жидкости. Этому положению лазерного зондирующего пучка соответствует максимальное значение разрешающей способности $K = P_+/P_-$. На рис.3 представлена часть экспериментальных результатов в виде зависимостей мощности регистрируемого цифровой камерой лазерного излучения от координаты y для положительной (+) и отрицательной (–) реакций агглютинации. Видно, что разрешение K в точке $y = 0$ превышает 70 единиц. Это свидетельствует о способности данного устройства (рис.1) надежно различать эти два типа реакций.

Подобным образом исследовались образцы и других групп крови. Типичные результаты сведены в табл.2 (условия экспериментов обсуждаются в разд.4).

В табл.2: 1) не приведены экспериментальные результаты с сывороткой четвертой группы крови АВ₀, поскольку известно, что этот тип сыворотки не приводит к агглютинации эритроцитов любой группы крови (подтверждено нашими экспериментами); 2) при расчете K за отрицательную реакцию агглютинации принималась реакция, соот-

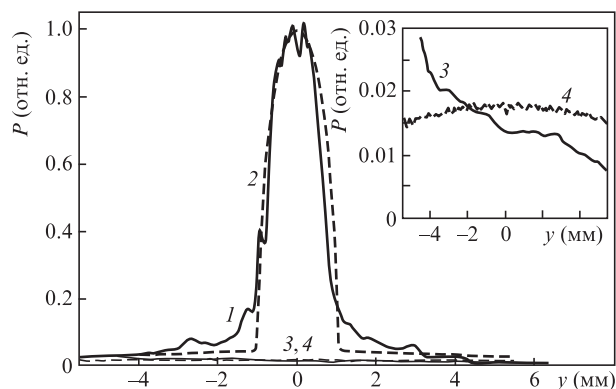


Рис.3. Экспериментальные (1, 3) и теоретические (2, 4) зависимости мощности излучения P , прошедшего через раствор смеси кровь–сыворотка и падающего на фотокамеру, от глубины слоя жидкости y для случаев положительной (1, 2) и отрицательной (3, 4) реакции агглютинации. Все данные нормированы на максимум мощности для положительной реакции агглютинации.

Табл.2. Разрешающая способность устройства при определении группы крови для различных комбинаций кровь–сыворотка.

Группа крови	Тип сыворотки		
	$0_{\alpha\beta}(I)$	$A_{\beta}(II)$	$B_{\alpha}(III)$
0(I)	0.3	0.5	0.5
A(II)	56	3.5	76
B(III)	82	67	2.0
AB(IV)	152	86	85

Примечание: жирным шрифтом выделены значения K для тех комбинаций кровь–сыворотка, при которых агглютинация эритроцитов должна происходить, остальные значения – агглютинация принципиально должна отсутствовать.

ветствующая комбинации кровь анализируемой группы + сыворотка четвертой группы, для которой реакция агглютинации всегда отрицательная.

Из табл.2 видно, что для сочетаний кровь–сыворотка, когда агглютинация происходит, разрешающая способность K достаточно велика: для разных групп крови она колеблется от 56–152. В то же время при объективном отсутствии агглютинации значения K существенно ниже: от 0.3 до 3.5.

4. Моделирование метода и экспериментальной установки для определения группы крови

Цель моделирования – выявление причин различия регистрируемых оптических сигналов после прохождения лазерного луча через кювету с исследуемыми образцами в случаях положительной и отрицательной реакций, выявление роли поглощения и рассеяния света образцами, конкуренции этих явлений, а также поиск путей дальнейшего совершенствования предлагаемого здесь метода определения группы крови.

Моделирование предварялось рядом оптических спектральных измерений. В качестве образцов для измерений использовались пробы раствора кровь–сыворотка (группа В(III)) после их «озвучивания», инкубации и соответствующих измерений с помощью цифровой камеры. При этом как для положительной, так и для отрицательной реакций агглютинации образцы брались из области объема кюветы, соответствующей середине области D (см. рис.2). Исходное соотношение кровь–сыворотка в смеси составляло 1 : 10, а затем она разбавлялась физраствором в соотношении 1 : 25. Выбор данных соотношений поясняется в разд.5.

4.1. Оптические спектральные измерения

Спектры полного отражения (R) и пропускания (T) исследуемых растворов регистрировались на двухлучевом спектрофотометре Perkin–Elmer Lambda 950 с помощью интегрирующей сферы с коррекцией на отражение эталона. При получении спектров коэффициента коллимированного пропускания U использовались четыре диафрагмы диаметром 1.5 мм с расстояниями между ними 5, 3 и 7 см. Расстояние от последней диафрагмы до фотоумножителя составляло 50 см. Образцы раствора помещались в стеклянную кювету с внутренней толщиной 1 мм. Полученные спектральные характеристики для случаев положительной и отрицательной реакций агглютинации представлены на рис.4.

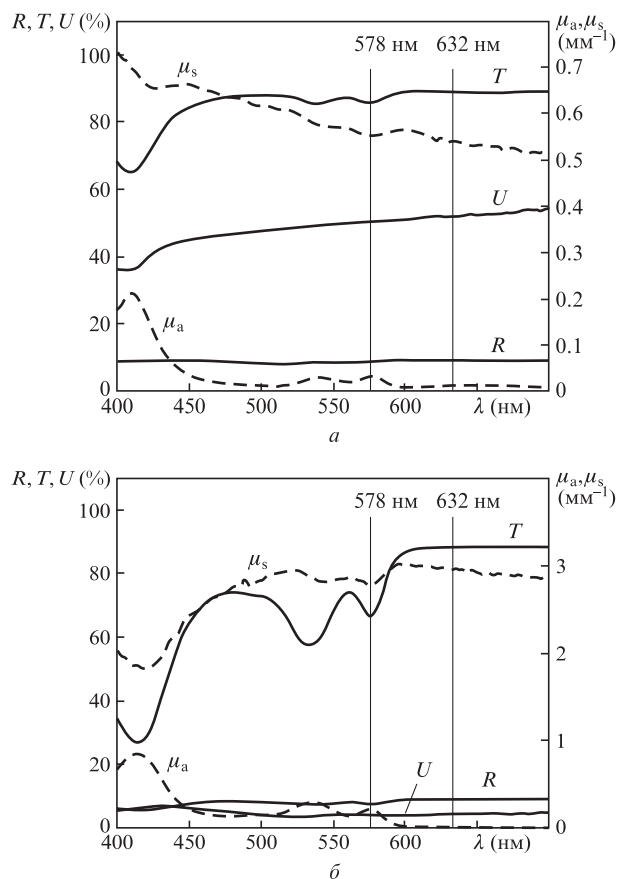


Рис.4. Спектры измеренных величин полного отражения R и пропускания T и коэффициента коллимированного пропускания U исследуемых растворов, а также рассчитанных показателей поглощения μ_a и рассеяния μ_s для положительной (а) и отрицательной (б) реакций агглютинации. Вертикальными линиями отмечены длины волн излучения He–Ne-лазера ($\lambda = 632$ нм) и максимума поглощения гемоглобина в зеленой области спектра ($\lambda = 578$ нм).

Для описания транспорта оптического излучения, а также определения спектральных зависимостей показателей поглощения и рассеяния исследуемых образцов использовалось уравнение переноса излучения [18–20]:

$$\frac{\partial I(r, s)}{\partial s} = -(\mu_a + \mu_s)I(r, s) + \mu_s \int_{4\pi} \rho(s, s') d\Omega'. \quad (3)$$

Уравнение (3) описывает изменение интенсивности $I(r, s)$ светового потока в некоторой точке r и в некотором направлении s как результат уменьшения энергии вследствие поглощения и рассеяния, задаваемых показателями поглощения μ_a и рассеяния μ_s , а также ее увеличения за счет рассеянного света со всех направлений s' . Функция $\rho(s, s')$ описывает индикатрису однократного рассеяния.

Для решения уравнения (3) и нахождения спектральных зависимостей μ_a и μ_s , а также фактора анизотропии рассеяния g использовался метод добавления–удвоения, реализованный программой iad [21]. В качестве входных параметров программы использовались полученные экспериментально спектры R , T и U (рис 4). Показатель преломления стенок кюветы n принимался равным 1.5. Вычисленные таким образом спектральные зависимости показателей поглощения и рассеяния также представлены на рис.4.

4.2. Моделирование транспорта света в образцах и его регистрации цифровой камерой

Поскольку длина волны He–Ne-лазера, использованного в экспериментах, лежит в красной области спектра, то анализу подвергалась лишь Red-компонента RGB-разложения фотокадров. Далее с целью учета нелинейности чувствительности фотоматрицы яркость пикселей переводилась из единиц яркости B в единицы мощности P в соответствии с найденной нами зависимостью (2). Мощность излучения на некоторой фиксированной глубине кюветы u определялась путем усреднения мощности по соответствующей строке в пределах ширины прямоугольника D (см. рис.2).

В условиях поставленного нами эксперимента по регистрации реакции агглютинации и при использовании решения уравнения (3) расчет транспорта света осуществлялся методом Монте-Карло, который заключается в моделировании прохождения фотонов в дисперсной среде. При этом свет представлялся в виде набора N баллистических частиц (фотонов), каждая из которых имеет статистический вес $1/N$ и может претерпевать поглощение или рассеяние в некотором направлении (N было выбрано равным 10^8). Акты рассеяния, поглощения, а также выбор направления распространения фотонов разыгрываются при помощи генератора случайных чисел. Число актов рассеяния одиночного фотона возрастает с увеличением μ_s по сравнению с μ_a , а также с толщиной среды. Интегральные спектральные характеристики образца получаются путем статистического усреднения по большому числу фотонов. Для того чтобы учесть многослойную структуру образца, т. е. стенки кюветы и сам исследуемый раствор, мы использовали вариант метода Монте-Карло, описанный в работе [22]. В расчетах толщина каждой из стенок кюветы полагалась равной 1 мм, а ее внутренняя толщина (полость) – 5 мм. Показатель преломления стекла, из которого изготовлена кювета, принимался равным $n = 1.5$, а раствора $n_{sol} = 1.34$. Используя полученные показатели поглощения μ_a и рассеяния μ_s для длины волны излучения He–Ne-лазера $\lambda = 632$ нм и фактор анизотропии рассеяния g образцов раствора для положительной и отрицательной реакций представлены в табл.3. В ней же приведены оптические характеристики тех же образцов для $\lambda = 578$ нм (соответствует максимуму поглощения света гемоглобином в зеленой области спектра), для которой осуществлено аналогичное моделирование. Причина выбора данной длины волны заключается в следующем.

В эксперименте с образцами, освещаемыми излучением He–Ne-лазера, фотографии в случаях положительной и отрицательной реакций сильно отличаются друг от друга (см. рис.2). При этом, как видно из рис.4, на длине волны 632 нм μ_s превышает μ_a более чем в 200 раз (отрицательная реакция) и более чем в 50 раз (положительная

реакция), т.е. ослабление светового потока в образцах связано прежде всего с рассеянием света. В то же время на длине волны 578 нм показатель поглощения существенно больше, чем в красной области спектра, так что для отрицательной реакции μ_s превышает μ_a всего примерно в 10 раз для обоих образцов при сохранении уровня рассеяния близким к уровню рассеяния в красной области спектра. Таким образом, в максимуме поглощения с учетом многократности рассеяния существенный вклад в дополнительное ослабление образцом светового потока должно вносить поглощение света. Это означает, что на его длине волны $\lambda = 578$ нм уместно ожидать большего разрешения $K = P_+/P_-$, чем на $\lambda = 632$ нм.

Для получения распределения по глубине кюветы у мощности излучения, принятого фотоприемником, в моделировании учитывались геометрические параметры эксперимента – расстояние от кюветы до фотоприемника (70 мм) и апертура последнего (2 мм). Присутствие в оптической схеме щели размером 2×22 мм, пространственно фильтрующей падающее на кювету излучение, потребовало задания в модели функции источника света. Поскольку вид пространственной зависимости интенсивности света в пучке неизвестен, в расчетах использовано допущение о равномерности освещения области образца размером 2×22 мм. Результаты расчетов ($D = 11$ мм) наряду с экспериментальными данными представлены на рис.3. Видно, что результаты вычислений достаточно хорошо согласуются с экспериментальными результатами. Для положительной реакции виден четкий пик шириной ~ 2 мм, совпадающий с размером апертуры цифровой камеры. Это говорит о том, что он вызван той долей света, которая прошла через образец без рассеяния и поглощения; доля рассеянного светового потока обуславливает наличие небольших лепестков на крыльях пика.

Для отрицательной реакции (рис.3), как показывают расчеты, практически весь свет рассеялся и дал почти равномерную засветку объектива фотокамеры со всех областей зоны D . Небольшое различие между экспериментальной и расчетной кривыми связано с тем, что в эксперименте после некоторого периода инкубации часть эритроцитов осела и таким образом пропускание верхней части кюветы с раствором оказалось больше, чем нижней. Однако при моделировании эффект седиментации эритроцитов не учитывался. Тем не менее тот факт, что теоретическая и экспериментальная кривые для отрицательной реакции находятся на одном уровне, также свидетельствует о хорошем количественном соответствии результатов моделирования и эксперимента.

При моделировании метода и экспериментальной установки для определения группы крови в качестве параметра, позволяющего отличать положительную реакцию агглютинации от отрицательной, как и в разд.2, был взят коэффициент $K = P_+/P_-$ (разрешение), где P_+ – мощность в максимуме кривой для положительной реакции и P_- – мощность в центре исследуемой области D (см. рис.3). Величины K , рассчитанные для $\lambda = 632$ и 578 нм, составляют 56.5 и 604 соответственно, а экспериментальное значение K для $\lambda = 632$ нм равно 73.5. Обращает на себя внимание удовлетворительное согласие теоретических и экспериментальных значений K для $\lambda = 632$ нм. Кроме того, как показывает теория, имеются хорошие перспективы повышения разрешающей способности при использовании зондирующего светового пучка с длиной волны в зеленой области спектра ($\lambda = 578$ нм).

Табл.3. Оптические характеристики растворов крови, измеренные на длинах волн $\lambda = 632$ и 578 нм для случаев положительной и отрицательной реакций агглютинации.

Длина волны (нм)	Положительная реакция			Отрицательная реакция		
	μ_a (мм ⁻¹)	μ_s (мм ⁻¹)	g	μ_a (мм ⁻¹)	μ_s (мм ⁻¹)	g
632	0.0107	0.5417	0.9306	0.0135	2.9316	0.9839
578	0.0343	0.5500	0.9051	0.2238	2.7951	0.9629

5. Оптимизация подготовки образцов кровь – сыворотка

С целью оптимизации техники эксперимента и повышения разрешающей способности $K = P_+/P_-$ отрабатывались вопросы подготовки проб. Хорошо известно, что при «ручном» определении группы крови общепринятое в медицинской практике соотношение кровь – сыворотка составляет 1 : 10. Однако для инструментального типирования крови это соотношение может не быть оптимальным и нуждается в проверке. С этой целью была получена зависимость величины разрешающей способности K от соотношения кровь – сыворотка при степени разбавления смеси 1 : 50 и времени ее «озвучивания» 60 с. При этом время инкубации биообъекта t_{inc} варьировалось как параметр и составляло 0, 30, 90 или 120 с. (Время инкубации – это время от момента выключения ультразвука (начало процесса седиментации эритроцитов и комплексов) до момента фотографирования биообъекта.)

Из рис.5 видно, что оптимальное соотношение кровь – сыворотка составляет 1 : 5 – 1 : 10. Выбор такого соотношения дает существенный выигрыш в величине разрешающей способности регистрации реакции агглютинации. В дальнейших экспериментах выдерживалось соотношение кровь – сыворотка, равное 1 : 10. Отметим, что кривые на рис.5 по форме аналогичны известным в иммунологии кривым преципитации. Это позволяет полагать, что область соотношений кровь – сыворотка от 0.1 до 0.2 соответствует зоне эквивалентности [23, 24].

Представляет интерес анализ зависимости разрешения K от времени ультразвукового воздействия t_{us} на раствор смеси кровь – сыворотка. Результаты представлены на рис.6. Видно, что оптимальным является время «озву-

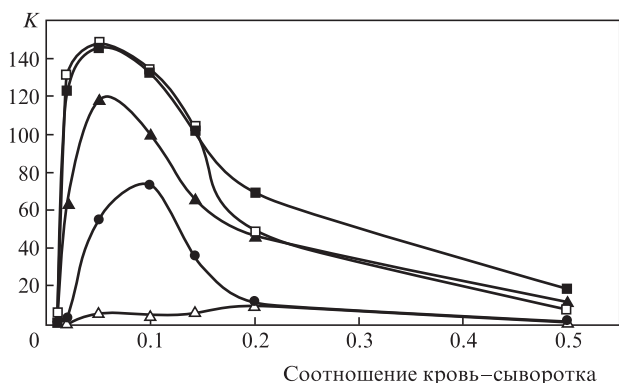


Рис.5. Зависимости разрешения K от соотношения кровь – сыворотка при t_{inc} , равном 0 (Δ), 30 (●), 60 (▲), 90 (□) и 120 с (■).

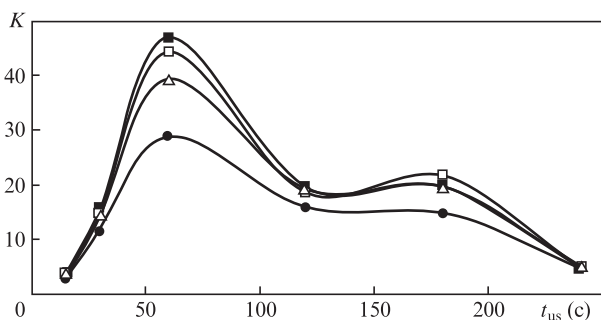


Рис.6. Зависимости разрешения K от времени ультразвукового воздействия на раствор смеси кровь – сыворотка при t_{inc} , равном 0 (●), 30 (■), 60 (□) и 120 с (Δ).

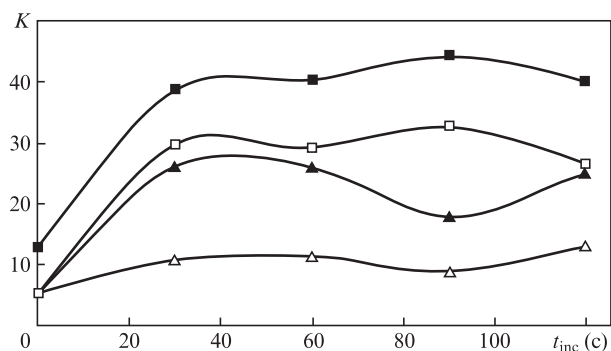


Рис.7. Зависимости разрешения K от t_{inc} раствора смеси кровь – сыворотка при степенях разбавления смеси физраствором 0.01 (Δ), 0.02 (▲), 0.04 (■) и 0.08 (□).

чивания» 60 с. Дальнейшее увеличение t_{us} снижает разрешающую способность K . Это обусловлено тем, что при отрицательной реакции большее время «озвучивания» раствора приводит к формированию более крупных, «неспецифических» эритроцитарных агрегатов, а следовательно, к увеличению скорости их седиментации и, как результат, к просветлению жидкости (увеличению мощности P_-) и снижению K .

На рис.7 представлены зависимости разрешения K от времени инкубации раствора смеси кровь – сыворотка t_{inc} при варьировании степени разбавления смеси физраствором от 1 : 100 до 8 : 100. Пределы варьирования степени разбавления и времени инкубации продиктованы результатами ранее выполненных работ [11–14]. Из рис.7 видно, что разрешающая способность возрастает до $t_{inc} = 40-60$ с, а затем зависит от времени инкубации весьма слабо.

Такое поведение зависимостей объясняется тем, что увеличение времени инкубации для положительной реакции приводит к большему просветлению раствора смеси, т.е. к возрастанию P_+ , в то время как P_- практически не меняется – «свободные» эритроциты оседают медленно. В результате значение K увеличивается. Однако к 60-й секунде инкубации основная масса крупных иммунных эритроцитарных комплексов уже осела, поэтому с этого момента величина P_+ стабилизируется, а разрешение K практически перестает изменяться.

Зависимости на рис.8, основанные на результатах рис.7, демонстрируют оптимальные значения степени разбавления смеси кровь – сыворотка для разных времен инкубации биообъекта. Видно, что величина K существенно зависит от особенностей подготовки проб: для

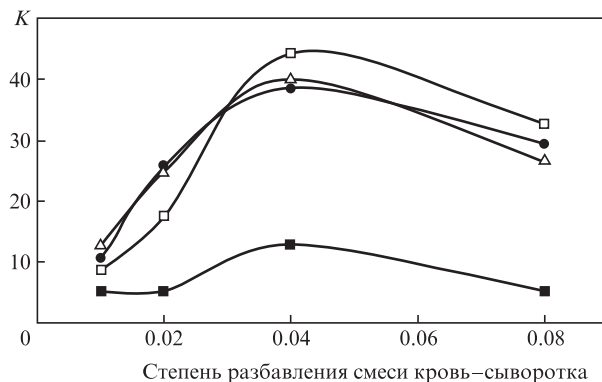


Рис.8. Зависимости разрешения K от степени разбавления смеси кровь – сыворотка физраствором при t_{inc} , равном 0 (■), 30 (●), 90 (□) и 120 с (Δ).

Табл.4. Рекомендуемые значения параметров, при которых разрешающая способность определения группы крови рассмотренным «акустооптическим» методом в данной его реализации максимальна.

Условие эксперимента для смеси кровь–сыворотка	Рекомендуемая величина
Соотношение компонентов	1:5–1:10
Время действия УЗ на раствор смеси	60 с
Степень разбавления смеси	1:25
Время инкубации облученной смеси	90 с

условий эксперимента оптимальным уровнем разбавления оказалось 1 : 25, что близко к результатам [11–14], полученным с использованием не цифровой, а аналоговой регистрации.

Проведенные экспериментальные исследования (см. рис.5–8) позволяют выбрать оптимальные условия (табл.4), при которых разрешающая способность определения группы крови рассмотренным «акустооптическим» методом в данной его реализации максимальна. Отметим, что экспериментальные результаты, представленные на рис.3, были получены в условиях эксперимента, приведенных в табл.4.

6. Обсуждение

Прежде всего полезно обсудить вопросы точности измерений и надежности определения группы крови. Эти вопросы взаимосвязаны, однако между ними нельзя поставить знак равенства. Так как в экспериментах с биологическими объектами, как правило, отсутствуют какие-либо эталоны, в биомедицине часто точность измерений связывают с воспроизводимостью результатов для одного и того же объекта при одинаковых экспериментальных условиях. Именно таким образом в [25] проводилось испытание и сопоставление результатов определения групп крови с помощью приборов РК-7200 Olymр Group и Olymр Group II. Аналогичным образом с целью определения повторяемости результатов нами было проведено по пять опытов для положительной (A(II) + B_α(III)) и отрицательной (A(II) + A_β(III)) реакций с определением величины разрешающей способности *K*. Среднеквадратичное отклонение $\sigma(K)$ от среднего значения $K_{av} = 50$ составило ± 7 , что представляется вполне удовлетворительным при работе с биологическими объектами.

Вопрос о достоверности определения группы крови более сложен, что обусловлено чрезвычайно широкой специфичностью образцов крови различных доноров, даже если это образцы одной и той же группы. Естественно, достоверность определения группы крови возрастает с увеличением разрешающей способности метода *K*. Однако данная величина зависит от многих факторов, например от агглютинационной активности эритроцитов, концентрации эритроцитов в образце, от содержания гемоглобина, вязкости анализируемой крови, титра гемагглютинирующей сыворотки и др. Это обусловило определенные отклонения разрешения *K* от среднего значения K_{av} при проведении экспериментов по оптимизации методики типирования крови (рис.5–8). Заметим, что экспериментальные точки на этих рисунках получены путем усреднения 14–18 результатов измерений *K* по образцам крови различных доноров (разд.2). Анализ показал, что при оптимальных условиях, соответствующих значениям табл.4, относительное отклонение разрешения *K* от среднего по донорам составляет $\Delta K/K_{av} \approx 20\%$. В то же время встреча-

ются такие редкие образцы крови, для которых величины *K* оказываются значительно ниже приведенных в табл.2. Как правило, это обусловлено слабой агглютинационной активностью эритроцитов данного образца, а также другими причинами. Вот почему на практике разработчики приборов для определения группы крови, помимо максимально возможного увеличения разрешения *K* в результате технических и медико-биологических испытаний, устанавливают определенные пороговые значения *K*; в нашей работе это K_{th}^{max} и K_{th}^{min} , в других, например в [6, 7] – иные пороговые параметры. Если для исследуемого образца крови $K > K_{th}^{max}$, то реакция агглютинации признается состоявшейся и она положительна, если же $K < K_{th}^{min}$, то реакция отрицательна. Тогда группа анализируемой крови устанавливается по совокупности подобных экспериментов с данным образцом крови, но с иными сыворотками. Если же измеренная величина разрешения *K* в эксперименте хотя бы с одной из четырех сывороток оказывается в зоне «неопределенности» $K_{th}^{min} \leq K \leq K_{th}^{max}$, то сделать вывод о реакции агглютинации невозможно. В этом случае группа крови не устанавливается, а прибор, и это чрезвычайно важно, должен дать ответ «группа крови не определена». Такой подход общепринят, т.к. ошибка в определении группы крови при трансфузии может привести к летальному исходу.

Приведем некоторые примеры подобного подхода. Результаты испытаний разработанного авторами [26] прибора для определения группы крови по системам АВ₀ и Rh сопоставлялись с результатами параллельного типирования крови прибором Technicon AutoAnalyzer, а также, в некоторых случаях для контроля, «ручным» (не инструментальным) методом. Сравнение показало, что в 97.3% случаев оба прибора однозначно определили группу крови 10042 образцов, и лишь в 266 случаях ответ приборов был «группа не определена». В этих случаях группа крови уточнялась вручную, причем методом обратного тестирования.

В [27] испытанию, подобному проведенному в [26], был подвергнут прибор Inverness Blood Grouping System (IBG System). Результаты, полученные с его использованием, сопоставлялись с данными «ручного» метода. Лишь в трех случаях из 2051 результат определения группы крови системами IBG System отличался от результатов ручного типирования крови. В 86.1% случаев результаты IBG System были получены без какого-либо дополнительного технологического вмешательства [27].

Естественно, увеличение разрешающей способности устройства для типирования крови увеличивает отклонение результата измерений *K* от выбранного «коридора» $K_{th}^{min} - K_{th}^{max}$. Следовательно, повышается надежность определения группы крови, а число образцов крови неустановленной группы снижается.

Из приведенных примеров [26,27] видно, что для установления интервала $K_{th}^{min} - K_{th}^{max}$ и проведения соответствующих испытаний необходимо выполнить тысячи, а иногда и десятки тысяч экспериментов, что, естественно, не было задачей настоящей работы. В то же время хочется отметить, что ее цель достигнута. Действительно, нами показано, что сочетание рассмотренного ранее авторами [11–15] ультразвукового воздействия на реакционную смесь кровь–сыворотка с цифровой регистрацией и обработкой процессов агглютинации эритроцитов, седиментации эритроцитов и их агглютинатов дает обнадеживающие значения разрешающей способности «акустоопти-

ческого» метода и устройства. Кроме того, выполненные исследования привели к нахождению оптимальных условий экспериментов, при которых разрешающая способность устройства в данной его реализации максимальна. Проведенное моделирование наметило путь к существенному повышению разрешающей способности устройства.

7. Заключение

Сочетание ультразвукового воздействия на реакционную смесь кровь–сыворотка с цифровой регистрацией седиментации эритроцитов и их агглютинатов позволяет получить большие значения разрешающей способности при регистрации реакции агглютинации эритроцитов. Определены оптимальные условия типирования крови предложенным «акустооптическим» методом. Моделирование техники экспериментов на основе анализа светорассеяния позволило количественно определить перспективы развития метода, направленного на дальнейшее повышение разрешающей способности, а следовательно, надежности определения группы крови. Результаты исследования могут быть использованы при разработке прибора для инструментального определении группы крови человека.

Авторы выражают признательность В.И.Кочубею за предоставление возможности работы со спектральной аппаратурой и ценные советы.

- Vyas G.N. et al. United States Patent 5,776,711, July 7, 1998.
- Sturgeon P. *Immunohematology*, **17**, 4 (2001).
- Kline T.R., Runyon M.K., Pothiawala M., Ismagilov R.F. *Anal. Chem.*, **80** (16), 6190 (2008).
- Muranyi I. et al., United States Patent 4,533,638, August 6, 1985.
- Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., Щербакова И.В., Балаев А.Э. *ИТЭ*, **42** (2), 111 (1999).
- Steven R.A. *A Simplified Visible/Near-Infrared Spectrophotometric Approach to Blood Typing for Automated Transfusion Safety*. Thesis presented to North Carolina State University (Raleigh, North Carolina, USA, 2005).
- Lambert J.B. *Miniaturized Device for Blood Typing Using a Simplified Spectrophotometric Approach*. Thesis submitted to North Carolina State University (Raleigh, North Carolina, USA, 2006).
- Monchamont P., Plantier A., Chirat V., Rigal D. *Immunohematology*, **19** (2), 54 (2003).
- Goldfinger D. et al., United States Patent 4,650,662, March 17, 1987.
- Battrell C.F. et al., United States Patent application 20100112723, Publication date: 05/06/2010.
- Алипов А.Н., Ванинский В.З., Денисов Л.Б., Донсков С.И., Дубровский В.А., Завьялов Э.Н., Князьков Н.Н. Авт. св. на изобретение № 1683760 с приоритетом от 04.06.1987.
- Doubrovski V.A., Kirichouk V.F., Scherbakova I.V. *Abstr. Intern. Conf. Biomed. Opt. Europ. 94* (Lille, France, 1994, с. 60).
- Дубровский В.А., Дворецкий К.Н. *Оптика и спектроскопия*, **89** (1), 109 (2000).
- Doubrovski V.A., Dvoretzki K.N. *Ultrasound in Medicine & Biology*, **26** (4), 655 (2000).
- Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., Балаев А.Э. *Акустический журн.*, **50** (2), 184 (2004).
- Гонсалес Р., Вудс Р. *Цифровая обработка изображений* (М.: Техносфера, 2005).
- Дубровский В.А., Долмашкин А.А. *Оптика и спектроскопия*, **109** (2), 1346 (2010).
- Чандрасекар С. *Перенос лучистой энергии* (М.: ИЛ, 1953).
- Исимацу А. *Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах* (М.: Мир, 1981, т. 1, 2).
- Тучин В.В. *Оптическая биомедицинская диагностика* (М.: Физматлит, 2007, т. 1).
- Prahl S.A., van Gemet M.J.C., Welch A.J. *Appl. Opt.*, **32** (4), 559 (1993).
- Wang L., Jacques S.L., Zheng L. *Comp. Meth. Progr. Biol.*, **47**, 131 (1995).
- Бойд У. *Основы иммунологии* (М.: Мир, 1969).
- Ройт А. *Основы иммунологии* (М.: Мир, 1991).
- Monchamont P., Plantier A., Chirat V., Rigal D. *Immunohematology*, **19** (2), 54 (2003).
- Chung A., Birch P., Ilagan K. *Transfusion*, **34** (1), 88 (1994).
- Mintz P.D., Anderson G., Barasso C., Sorenson E. *Immunohematology*, **10** (2), 60 (1994).