

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Министерства здравоохранения
Российской Федерации
09.01.1998 г. № 2

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач

ГБУЗ «Свердловская областная станция

переливания крови»

А.Ф. Соловьев

2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуногематологических исследований Свердловской областной станции переливания крови

(стандартные изогемагглютинирующие сыворотки АВ0; стандартные эритроциты АВ0, универсальные реагенты: анти-D, анти-CD, анти-DE, анти-С, анти-с, анти-Е, анти-Келл, стандартные эритроциты АВ0, фенотипированные эритроциты O(I) группы CCDee, ccDEE, ccddK; сыворотка для контроля реакции при выявлении антиэритроцитарных антител; 33 % раствора полиглюкина; 10 % раствор желатина)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для иммуногематологических исследований предназначен для комплексного исследования крови доноров и больных.

Эта методика включает в себя определение группы крови системы АВ0 перекрестным методом, определение групповых антигенов и групповых антител, определение резус и Kell принадлежности, фенотипирование крови доноров и больных, а так же выявление антиэритроцитарных антител.

Набор рассчитан на 50 исследований, включая контрольные образцы.

Определение группы крови системы АВ0 производится методом прямой агглютинации на плоскости. Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки АВ0 выявляют групповые антигены, а стандартные эритроциты АВ0 выявляют групповые антитела анти-А и анти-В. Определение группы крови производится на плоскости при комнатной температуре. Определение резус и Kell принадлежности, фенотипирование (т.е. определение антигенной формулы крови донора и больного) проводится экспресс-методом. Исследование наличия или отсутствия антиэритроцитарных антител производится методом конгломинации с 10 % раствором желатина.

Правильное определение группы крови, резус и Kell принадлежности, а так же наличие или отсутствие антиэритроцитарных антител имеет большое значение при необходимости гемотрансфузий больным, так как обеспечение совместимости крови донора и реципиента является профилактикой посттрансфузионных осложнений.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ:

При взаимодействии антител с соответствующим антигеном происходит агглютинация (склеивание) эритроцитов. Если эритроциты не содержат антигена, то агглютинации не происходит. Определение группы крови системы АВ0 производится на плоскости в реакции

прямой агглютинации. Когда встречаются одноименные антигены и антитела, происходит реакция агглютинации, т.е. их склеивание.

2.2. СОСТАВ НАБОРА:

2.2.1. Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки АВ0 изготавливаются из сыворотки или плазмы доноров, содержат групповые антитела анти-А и анти-В.

Стандартные сыворотки АВ0 представляют собой прозрачную или слегка опалесцирующую жидкость, окрашенную в соответствии с групповой принадлежностью.

В состав набора входят 2 серии стандартных изогемагглютинирующих сывороток АВ0 (всего 6 флакончиков и один флакон контрольной сыворотки АВ₀(IV) группы).

2.2.2. Стандартные эритроциты АВ0 представляют собой взвесь эритроцитов 0(I), А(II) и В(III) групп в специально изготовленном консервирующем растворе (ФСП 42 0270-114-01) в соотношении 1:4. Всего в набор входят 3 флакончика стандартных эритроцитов.

2.2.3. Универсальные реагенты изготавливаются из сыворотки или плазмы доноров, содержат антитела к одному (моноспецифические) или к нескольким (полиспецифические) антигенам системы резус (D, C, c, E,) и антигену Келл. Всего в набор входит 7 флакончиков реагентов.

2.2.4. Стандартные эритроциты для поиска антиэритроцитарных антител представляют собой взвесь эритроцитов группы 0(I) в специально изготовленном консервирующем растворе для пролонгированного хранения эритроцитов и содержат антигены системы резус: (D, C, c, E,) и антигены системы Келл, Даффи, Кидд, M, N, S, s, Le. В набор входит 3 флакончика.

2.2.5. Сыворотка для контроля реакции при выявлении антиэритроцитарных антител (контрольная сыворотка) содержит антитела-антирезус в титре 1:8-1:16, изготавливается из сыворотки или плазмы доноров, представляет собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета, консервированную борной кислотой (2 г на 100 г сыворотки). В набор входит 1 флакончик контрольной сыворотки.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Стандартные реагенты для определения групп крови человека системы АВ0, резус и Келл принадлежности и выявления антиэритроцитарных антител изготавливаются из сыворотки или плазмы доноров, обследованных на ВИЧ, гепатиты А, В, С и другие гемоконтактные инфекции. Стандартные реагенты содержат групповые или антирезус-антитела или групповые антигены А или В.

Технология изготовления реагентов исключает возможность контаминации патогенными для человека вирусами.

Все реагенты выпускаются в соответствии с инструкциями (приказ МЗ РФ от 09.01.1998 г. № 2) и промышленными регламентами на производство реагентов ГУЗ «СОСПК».

К стандартным изогемагглютинирующим сывороткам АВ0 предъявляются следующие требования:

- сыворотка должна быть специфичной, т.е. содержать определенные групповые антитела анти-А, анти-В или оба антитела вместе и не вызывать неспецифической реакции агглютинации эритроцитов одноименной группы и группы О(I). Сыворотка группы АВ(IV), не содержащая групповых антител, не должна вызывать агглютинации;
- должна быть активной, что выражается в наступлении первых признаков агглютинации со стандартными эритроцитами группы А₁ и В в течение первых 30 секунд и со стандартными эритроцитами группы А₂ – не ниже, чем 1:16;
- не должна оказывать на эритроциты гемолизирующего действия;
- должна быть прозрачной. Допускается небольшая опалесценция, что не влияет на качество сыворотки;
- должна быть окрашена: группа О(I) – не окрашена, группа А(II) – в светло-синий цвет, группа В(III) – в красный, группа АВ(IV) – в желтый.

Стандартный универсальный реагент антирезус пригоден для определения резус-фактора независимо от групповой принадлежности крови по системе АВ0. универсальные реагенты анти-D, анти-DE, анти-DC, анти-C, анти-c, анти-E, анти-Kell должны быть специфичны, что выражается в наличии агглютинации с соответствующими антигенами и ее отсутствии со всеми другими антигенами. Активность универсальных реагентов антирезус оценивается по появлению агглютинации эритроцитов с соответствующими антителами реагентов в течение первой минуты и через 3 минуты после добавления изотонического раствора NaCl и при этом титр антител должен быть не ниже 1:32.

Стандартные эритроциты для исследований по системе АВ0 должны давать четкую, хорошо видимую агглютинацию при взаимодействии со стандартными сыворотками соответствующей специфичности и не давать агглютинации с сыворотками, не содержащими антител против данного антигена эритроцитов:

- стандартные эритроциты O(I) не должны давать агглютинации с анти-A и анти-B;
- стандартные эритроциты A(II) дают агглютинацию с анти-A;
- стандартные эритроциты B(III) дают агглютинацию с анти-B.

Стандартные эритроциты группы A(II), предназначенные для выявления анти-A, должны иметь титр не ниже 1:64. Эритроциты группы B(III), предназначенные для выявления анти-B, также должны иметь титр не ниже 1:64. Время наступления агглютинации эритроцитов A₁ и B со стандартными изоагглютинирующими сыворотками должно составлять не более 5 секунд; эритроцитов подгрупп A₂, B₂ – не более 2 минут.

Стандартные эритроциты O(I) с этими реактивами не должны давать агглютинации в течение 20 минут.

Стандартные эритроциты группы крови O(I), предназначенные для выявления антиэритроцитарных антител и установления их специфичности, должны содержать антигены системы Резус: D, C, E, c, e в различных сочетаниях; антигены систем Kell, Даффи, M, N, S, s, обеспечивающие выявление клинически значимых антител, давать с соответствующими реактивами четкую агглютинацию при определении методом конгломинации с желатином, экспресс-методом в пробирках или на плоскости без подогрева, или непрямой пробе Кумбса, в зависимости от того, для какого метода исследования предназначен соответствующий реактив.

Стандартные резус-отрицательные эритроциты O(I) не должны давать агглютинации с реактивами антирезус, содержащими антитела анти-D, анти-C, анти-E во всех методах исследования, для использования в которых предназначены указанные реактивы антирезус.

Сыворотка для контроля реакции при выявлении антител должна быть прозрачной жидкостью светло-желтого цвета. Сыворотка должна быть специфичной, т.е. содержать слабо выраженные анти-D антитела, должна давать агглютинацию с антигеном D и не давать ее с другими антигенами. Должна быть активной, т.е. агглютинация наступает через 5 минут после смешивания с эритроцитами, титр должен быть не ниже 1:16-1:8.

33 % раствор полиглобулина должен представлять собой прозрачную или слегка мутноватую густую жидкость, обладать специфичностью и активностью, т.е. при добавлении полиглобулина в пробирки, где происходит взаимодействие слабо выраженных антител антирезус с резус-положительными эритроцитами наблюдается агглютинация, а с резус-отрицательными эритроцитами агглютинации нет.

10 % раствор желатина представляет собой жидкость желтого цвета, застывающую при температуре холодильника +4+8 °С. Должен обладать специфичностью и активностью, т.е. при добавлении желатина в пробирки, где происходит взаимодействие слабо выраженных антител антирезус с резус-положительными эритроцитами при температуре +48 °С, наблюдается агглютинация, а с резус-отрицательными эритроцитами агглютинации нет.

Все реагенты должны быть предохранены от инфицирования прибавлением консервированных средств. Должны иметь точную паспортизацию, т.е. обозначение групповой принадлежности, титра, срока годности, номера серии и наименования учреждения их изготовившего.

Все эти сведения должны быть обозначены на этикетке, наклеиваемой на флакон.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Изготавливаемые реагенты предназначены только для лабораторной диагностики *in vitro*.

При работе с набором и утилизации отходов следует соблюдать СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность», СП 3.1.5.2826-10 «Санитарно-эпидемиологические правила».

В связи с тем, что исследуемые образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита и другие вирусные инфекции, при проведении анализов следует использовать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, а также одноразовые палочки и специальные планшеты. Определение группы крови и резус принадлежности должно производиться в помещении с хорошим освещением при температуре +15-25 °С.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе со стандартными реагентами требуется следующее оборудование и материалы:

- планшет для изосерологических исследований;
- пластмассовые одноразовые или стеклянные палочки;
- пробирки градуированные центрифужные 10,0 мл;
- пипетки одноразовые пластиковые;
- секундомер;
- штативы для пробирок;
- лупа с увеличением в 2-3 раза;
- термостат водяной;
- маркер по стеклу;
- центрифуга настольная на 3000 об/мин;
- натрий хлористый, хч;
- микроскоп;
- раствор желатина 10 %;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые одноразовые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Определение проводится в нативной крови и крови, взятой в консервант или из пальца. Для исследования используются эритроциты не более двух дневного срока хранения при температуре +2-8 °С. Во избежание ошибок рекомендуется использовать плотный осадок эритроцитов со дна пробирки, максимально освобожденный от взвешивающей среды.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Техника определения группы крови АВ0, резус и Келл принадлежности и определения антиэритроцитарных антител.

7.1.1. МЕТОД АГГЛЮТИНАЦИИ НА ПЛОСКОСТИ

- 7.1.1.1. Из флаконов с капельницей нанести на планшет по две капли (0,1 мл) сыворотки под соответствующими надписями.
- 7.1.1.2. Рядом с каплей сыворотки нанести одну маленькую каплю (0,01 мл) исследуемой крови.
- 7.1.1.3. Палочкой смешать кровь с сывороткой.

- 7.1.1.4. Наблюдать за ходом реакции следует при легком покачивании планшета в течение 5 минут. Агглютинация обычно наступает в первые 2-3 минуты, но наблюдение необходимо вести до 5 минут, чтобы не пропустить агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности антигенов.
- 7.1.2. РЕАКЦИЯ КОНГЛЮТИНАЦИИ С ЖЕЛАТИНОМ
- 7.1.2.1. В пробирку внести одну каплю (0,05 мл) стандартных эритроцитов.
- 7.1.2.2. Добавить две капли (0,1 мл) исследуемой сыворотки и 2 капли (0,1 мл) 10 % желатина.
- 7.1.2.3. Содержимое пробирки тщательно перемешать.
- 7.1.2.4. Инкубировать в водяном термостате 30 минут при + 48 °С.
- 7.1.2.5. Содержимое пробирки залить 5-7 мл изотонического раствора NaCl и, после осторожного переворачивания пробирки, визуальнo или под микроскопом определить наличие агглютинатов.
- 7.1.3. ЭКСПРЕСС-МЕТОД
- 7.1.3.1. В пробирку внести две капли (0,1 мл) реагента универсального необходимой специфичности.
- 7.1.3.2. Добавить одну каплю (0,05 мл) исследуемых эритроцитов со дна пробирки.
- 7.1.3.3. Содержимое пробирки тщательно перемешать и осторожно поворачивать в горизонтальном положении вокруг своей оси 5 минут.
- 7.1.3.4. По истечении времени залить пробирку 5-7 мл изотонического раствора NaCl, и после 1-2 кратного поворачивания определить наличие агглютинации невооруженным глазом в проходящем свете или в лупу.

8. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

8.1. В случае определения группы крови системы АВ0 следует пользоваться таблицами 1, 2, 3, 4, 5. При подозрении на спонтанную неспецифическую агглютинацию исследуемых эритроцитов к образовавшимся агглютинатам, следует добавить две капли (0,1 мл) изотонического раствора NaCl. Агглютинаты, образовавшиеся в результате неспецифического склеивания эритроцитов, разойдутся.

Таблица 1

Оценка результатов определения групп крови при помощи изогемагглютинирующих сывороток АВ0 двух серий каждой группы

*Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации,
Знаком минус (-) – отсутствие её*

Изогемагглютинирующие сыворотки группы			Исследуемая кровь принадлежит к группе
0 _{αβ} (I) Анти-(A+B)	A _β (II) Анти-B	B _α (III) Анти-A	
-	-	-	0(I)
-	-	-	
+	-	+	A(II)
+	-	+	
+	+	-	B(III)