

**Инструкция
по применению набора сывороток антилейкоцитарных
HLA-A, B, C, DR гистотипирующих жидких (HLA-сыворотки)**

Рекомендована к утверждению комиссией по наборам реагентов для иммуноферментного (неинфекционные), радио-иммунологического и других видов иммунохимического анализа Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ (протокол №8 от 17 сентября 2001 г.)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор HLA сывороток используется в качестве диагностического средства. Он предназначен для подбора доноров при аллотрансплантации органов и тканей, при проведении гемокомпонентной терапии, популяционно-генетического анализа, судебно-медицинской экспертизы и для диагностики иммунологического конфликта при беременности. Набор может быть использован также для исследования антигенного состава тканей при различных заболеваниях, ассоциированных с наличием определенного антигена системы HLA (в качестве дифференциально-диагностического критерия и для установления предрасположенности к определенным заболеваниям).

Набор рассчитан на проведение анализа 100, 200 или 1000 образцов крови человека при расходе 1,0 мкл соответствующей сыворотки на одно определение.

Инструкция составлена: директором д.м.н., проф. Л.Н. Бубновой

УТВЕРЖДАЮ

**Руководитель Федеральной службы по
надзору в сфере здравоохранения и
социального развития**

_____ Н.В. Юргель

« _____ » _____ 200 г.

**Инструкция
по применению набора сывороток антилейкоцитарных
HLA-A, B, C, DR гистотипирующих жидких (HLA-сыворотки)**

Рекомендована к утверждению комиссией по наборам реагентов для иммуноферментного (неинфекционные), радио-иммунологического и других видов иммунохимического анализа Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ (протокол №8 от 17 сентября 2001 г.)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор HLA сывороток используется в качестве диагностического средства. Он предназначен для подбора доноров при аллотрансплантации органов и тканей, при проведении гемокомпонентной терапии, популяционно-генетического анализа, судебно-медицинской экспертизы и для диагностики иммунологического конфликта при беременности. Набор может быть использован также для исследования антигенного состава тканей при различных заболеваниях, ассоциированных с наличием определенного антигена системы HLA (в качестве дифференциально-диагностического критерия и для установления предрасположенности к определенным заболеваниям).

Набор рассчитан на проведение анализа 100, 200 или 1000 образцов крови человека при расходе 1,0 мкл соответствующей сыворотки на одно определение.

Инструкция составлена: директором д.м.н., проф. Л.Н. Бубновой

2. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор HLA сывороток, основанный на реакции антиген-антитело, используемый для определения фенотипа индивидуума, состоит из гистотипирующих сывороток различной специфичности, позволяющих определять наличие определенного специфического антигена.

В основу работы набора положен лимфоцитотоксический тест, при котором выделенные из периферической крови лимфоциты индивидуума, имеющие определенные антигены, реагируют с антителами соответствующей специфичности.

3. СОСТАВ НАБОРА

Набор выпускается в 2 комплектациях.

Вариант А:

- сыворотки, содержащие антитела к специфичностям локусов А, В, С и DR HLA – 70 пробирок (по 100 мкл, 200 мкл или 1000 мкл);
- положительный контрольный образец (сыворотка крови человека, содержащая полиспецифические HLA антитела) – 1 пробирка (100 мкл, 200 мкл или 1000 мкл);
- отрицательный контрольный образец (инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая HLA антитела) – 1 пробирка (100 мкл, 200 мкл или 1000 мкл).

Вариант Б:

- микропланшеты 72-луночные, содержащие в лунках под минеральным маслом сыворотки, положительный контрольный образец и отрицательный контрольный образец в замороженном состоянии – 100, 200 или 1000 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Антилейкоцитарные сыворотки набора высокочувствительны и специфичны к антигенам HLA локусов А, В, С, DR и вызывают лизис 80-100% лимфоцитов соответствующей специфичности в стандартном лимфоцитотоксическом тесте.

Лимфоциты, выделенные из периферической крови человека, реагируют с антителами соответствующей специфичности в присутствии кроличьего комплемента.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. Меры предосторожности – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г).

5.4. При работе с набором необходимо надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как кровь человека является потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Взвесь Т- и В-лимфоцитов, выделенных из 5-10 мл венозной крови человека, взятой с антикоагулянтом. Выделение лимфоцитов необходимо осуществлять не позднее 12 ч с момента взятия крови.

7. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- микроскоп инвертированный;
- термостат, поддерживающий температуру $+22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы полуавтоматические, позволяющие отбирать объемы жидкости 1-50 мкл;
- микропланшеты 72-луночные для иммунологических реакций;
- масло минеральное;
- комплемент кроличий;
- эозин К 5%;
- формальдегид раствор 40%, pH 7,2;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Набор HLA-сывороток, представленный в микропробирках, необходимо разморозить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) и внести по 1,0 мкл соответствующей сыворотки в лунки микропланшета под минеральное масло, предварительно внесенное в каждую лунку (по 5,0 мкл). Подготовленные таким образом к использованию планшеты при необходимости заморозить и хранить до момента использования в замороженном состоянии при температуре -40°C не более 12 месяцев. Планшеты, предназначенные для хранения в течение времени более 3 месяцев, следует хранить в герметичных воздухонепроницаемых мешках.

Набор HLA-сывороток, представленный в микропланшетах, разморозить при комнатной температуре непосредственно перед использованием.

Комплемент кроличий лиофилизированный необходимо растворить в 1,0 мл дистиллированной воды непосредственно перед использованием.

Приготовленный комплемент можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 часа.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

В каждую лунку с HLA-сыворотками внести по 1,0 мкл исследуемой клеточной суспензии [для определения HLA-A, B, C антигенов (I класс) – взвесь Т-лимфоцитов, для определения HLA-DR антигенов (II класс) – взвесь В-лимфоцитов]. Инкубировать планшеты при температуре $+22^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. для определения антигенов I класса или 60 мин. – для определения антигенов II класса. После окончания инкубации в каждую лунку внести по 5,0 мкл кроличьего комплемента и инкубировать при тех же условиях в течение 60 мин. (I класс) или 120 мин. (II класс), соответственно.

Для дифференциации живых (интактных) и погибших лимфоцитов в каждую лунку следует внести по 2,0 мкл 5% раствора эозина и через 2-5 мин. зафиксировать результат, добавив в каждую лунку 5,0 мкл 40% формальдегида (pH 7,2).

Учет реакции производить при помощи светового инвертированного микроскопа не ранее, чем через 30 мин. после фиксации.

Результат реакции оценивают в баллах, соответственно количеству погибших клеток (см. таблицу):

Оценка результатов реакции.

Таблица

% погибших клеток	Оценка реакции	Оценка в баллах
0% - 10%	Отрицательная	
11% - 20%	Сомнительно-отрицательная	2
21% - 50%	Слабо-положительная	4
51% - 80%	Положительная	6
81% - 100%	Сильно-положительная	8

При оценке реакции для определения фенотипа следует учитывать только положительные (6 баллов) и сильно-положительные (8 баллов) реакции.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре -40°C и ниже в течение всего срока годности.

Срок годности набора: вариант А (микропробирки) – 2 года, вариант Б (микропланшеты) – 1 год.

Повторное замораживание и размораживание компонентов набора не допускается.

Разведенный комплемент хранить не более 1 ч при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$.

Замороженные планшеты разморозить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 30 мин. и не позднее, чем через 1,5 ч.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора «HLA сыворотки», следует обращаться в ЗАО «Межрегиональный центр иммуногенетики и гистотипирующих реагентов «Гисанс» по адресу:

196600, Санкт-Петербург, Пушкин, ул. Жуковско-Волынская, д.4, лит. А
 тел/факс: (812) 451-9052, 451-9053, E-mail: lnbubnova@mail.ru, www.gisans.spb.ru
 или в ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
 Институт государственного контроля лекарственных средств НЦ ЭСМП Минздрава
 России по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14-а. Тел. (095) 120-60-95;
 120-60-96.

Директор ЗАО «Межрегиональный центр иммуногенетики и гистотипирующих реагентов «Гисанс» д.м.н., профессор Бубнова Л.Н.

