

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

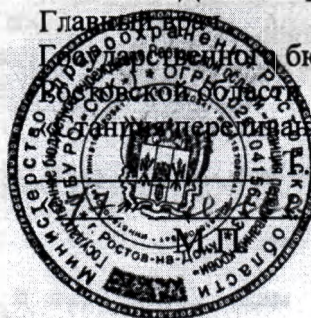
Главный врач

Государственного бюджетного учреждения

«Ростовский областной центр переливания крови»

Е.В. Фадеева

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению Набора реагентов для иммуногематологических исследований
(стандартные изогемагглютинирующие сыворотки АВ0, универсальный реагент антирезус анти-
D, консервированные стандартные эритроциты АВ0, 33 % раствор полиглюкина)
(Реагенты для иммуногематологических исследований ROSPK)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуногематологических исследований предназначен для комплексного исследования крови доноров, реципиентов, беременных.

1.2 Реагенты набора используются для:

- определения групп крови системы АВ0 прямой реакцией агглютинации на плоскости;
- определение группы крови системы АВ0 перекрестным методом;
- определения резус-принадлежности крови методом в пробирках без подогрева;
- контроля качества выполнения исследований при определении нерегулярных антиэритроцитарных антител в сыворотке крови непрямой пробой Кумбса и реакцией конглютинации с применением желатина;
- выполнения проб на совместимость крови донора и реципиента при гемотрансфузиях;
- проведения контроля специфичности и активности при изготовлении и использовании консервированных стандартных эритроцитов для исследований системы АВ0 и выявления нерегулярных антиэритроцитарных антител.

1.3. Эта методика включает в себя определение группы крови системы АВ0 перекрестным методом, определение групповых антигенов и групповых антител, определение резус принадлежности, выявления антиэритроцитарных антител, проведение проб на совместимость переливаемой крови с применением 33% раствора полиглюкина.

1.4. Набор рассчитан на 50 исследований.

1.5. Определение группы крови системы АВ0 производится методом прямой агглютинации на плоскости. Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки АВ0 выявляют групповые антигены, а консервированные стандартные эритроциты АВ0 выявляют групповые антитела анти-А и анти-В. Определение группы крови производится на плоскости при комнатной температуре. Определение резус принадлежности проводится экспресс-методом. 33% раствор полиглюкина применяется как дополнительный компонент в реакции конглютинации между антигеном и антителом при комнатной температуре.

1.6. Правильное определение группы крови, резус 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:

2.1.1. При взаимодействии антител с соответствующим антигеном происходит агглютинация (склеивание) эритроцитов. Если эритроциты не содержат антиген, 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 1 серия стандартных изогемагглютинирующих сывороток АВ0 (всего 4 флакона).

2.2.2. Консервированные стандартные эритроциты АВ0 представляют собой взвесь эритроцитов 0(I), А(II) и В(III) групп в специально изготовленном консервирующем растворе в соотношении 1:4. Всего в набор входят 3 флакона стандартных эритроцитов.

2.2.3. Универсальный реагент антирезус анти-D изготавливается из сыворотки или плазмы доноров, содержат антитела к одному (моноспецифические) антигену системы резус (D). Всего в набор входит 1 флакон реагента.

2.2.4. 33% раствор полиглокина получается путем выпаривания. В набор входит 1 флакон реагента.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Стандартные реагенты для определения групп крови человека системы АВ0, резус принадлежности изготавливаются из сыворотки или плазмы доноров, обследованных на ВИЧ, гепатиты В и С, и другие трансмиссивные 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 техническими условиями на производство реагентов ГБУ РО «СПК»

3.2. 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 в течение 1 минуты со стандартными эритроцитами группы А₂ - и иметь титр не ниже, чем 1:32;

- не должна оказывать на эритроциты гемолизирующего действия;

- должна быть прозрачной. Допускается небольшая опалесценция, что не влияет на качество сыворотки;

166

– должна быть окрашена: группа O(I) – не окрашена, группа A(II) – в светло-синий цвет, группа B(III) – в красный, группа AB(IV) – в желтый.

3.3. Универсальный реагент антирезус анти-D пригоден для определения резус-фактора независимо от групповой принадлежности крови по системе AB0. Универсальный реагент антирезус анти-D должен быть специфичен, что выражается в наличии агглютинации с соответствующими антигенами и ее отсутствии со всеми другими антигенами. Активность универсального реагента антирезус анти-D 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.

3.4. Консервированные стандартные эритроциты для исследований по системе AB0 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:

- консервированные стандартные эритроциты O(I) не должны давать агглютинации с анти-A и анти-B;

- консервированные стандартные эритроциты A(II) дают агглютинацию с анти-A;

- консервированные стандартные эритроциты B(III) дают агглютинацию с анти-B.

Консервированные 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 A_I и B со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками должно составлять не более 5 секунд.

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

3.5. 33 % раствор полиглобина должен представлять собой прозрачную или слегка мутноватую густую жидкость, обладать специфичностью и активностью, т.е. при добавлении полиглобина в пробирки, где происходит взаимодействие слабовыраженных антител антирезус с резус-положительными эритроцитами наблюдается агглютинация, а с резус-отрицательными эритроцитами агглютинации нет.

3.6. 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

4.1. Изготавливаемые реагенты предназначены только для лабораторной диагностики in vitro. Потенциальный риск применения набора реагентов класс 3.

4.2. 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».

4.3. 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 °C.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1. При работе со стандартными реагентами требуется следующее оборудование и материалы:

- центрифуга лабораторная клиническая;
- термостат электрический суховоздушный;
- микроскоп;
- лупа лабораторная 6х-8х;
- часы песочные;
- дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема 5-50, 100-1000 мкл;
- наконечники одноразовые к пипеточным дозаторам;
- пипетки и палочки одноразовые полимерные или стеклянные;
- штативы лабораторные полимерные для пробирок;
- пробирки биологические;
- пробирки градуированные центрифужные;
- стекла предметные;
- планшеты для определения групп крови;
- планшеты для иммунологических реакций однократного применения;
- маркер для стекла;
- стаканы стеклянные;
- перчатки хирургические резиновые или медицинские диагностические одноразовые;
- цоликлоны анти-А, анти-В, анти-АВ и/или стандартные изогемагглютинирующие сыворотки АВ0;
- контрольные сыворотки для скрининга антител;
- желатин, 10% раствор для лабораторных работ;
- 0,9% раствор хлорида натрия;
- вода очищенная.
- 33% раствор полиглюкина.
- баня водяная лабораторная;

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для исследования используют цельную кровь, отмытые эритроциты, эритроциты в плазме, сыворотке или физиологическом растворе.

6.2. Для исследования используются эритроциты не более двух дневного срока хранения при температуре от 2 до 8 °С. Во избежание ошибок рекомендуется использовать плотный осадок эритроцитов со дна пробирки, максимально освобожденный от взвешивающей среды.

6.3. Нельзя использовать гемолизированные образцы.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Определение групп крови системы АВ0 перекрестным способом при помощи стандартных изогемагглютинирующих сывороток (или цоликлонов анти-А, -В, -АВ) и стандартных эритроцитов

7.1.1 Нанести на верхнюю часть предварительно маркированного планшета по одной большой капле (0,1 мл/ 100 мкл) изогемагглютинирующих сывороток АВ0 двух серий (или цоликлонов анти-А, анти-В, анти-АВ) под соответствующими надписями.

7.1.2 Нанести на нижнюю часть планшета над соответствующими надписями по одной маленькой капле (0,01 мл/ 10 мкл) консервированных стандартных эритроцитов для исследований системы АВ0 групп 0 (I), А (II), В (III), взятых из осадка на дне флаконов.

7.1.3 Извлечь из пробирки, содержащей исследуемую кровь, сыворотку и нанести ее по одной большой капле (0,1 мл/ 100 мкл) рядом с каждой каплей стандартных эритроцитов.

7.1.4 Извлечь из пробирки этой же пипеткой эритроциты исследуемой крови и нанести их рядом с каждой каплей стандартной сыворотки (цоликлона) по одной маленькой капле (0,01 мл/ 10 мкл).

7.1.5 Тщательно перемешать во всех каплях сыворотку (цоликлон) с эритроцитами одноразовыми или стеклянными палочками, индивидуальными для каждой пары капель. Покачать планшет и оставить в покое на 1-2 минуты (при использовании сывороток).

7.1.6 Наблюдать за ходом реакции при периодическом покачивании планшета в течение 5 минут (3 минут при использовании цоликлонов). Агглютинация исследуемых эритроцитов, как правило, начинается в течение первых 10-30 секунд, но 5 (3) -минутный интервал наблюдения должен быть выдержан ввиду возможности поздней агглютинации эритроцитов. Агглютинация исследуемой сыворотки со стандартными эритроцитами может наступить поздно (к концу пятой минуты) в связи с возможным низким титром содержащихся в ней групповых антител.

7.1.7 Добавить в капли смеси сыворотки с эритроцитами, в которых наступила агглютинация, по 1 капле (0,05 мл/ 50 мкл) 0,9% раствора хлорида натрия (не ранее, чем через 3 минуты с начала наблюдения). Продолжать наблюдение при периодическом покачивании планшета до истечения пяти минут.

7.1.8 Учесть результат реакции.

7.2. ЭКСПРЕСС-МЕТОД В ПРОБИРКАХ БЕЗ ПОДОГРЕВА (определение резус-фактора)

7.2.1 В штатив устанавливают 2 ряда пробирок по числу исследуемых эритроцитов в каждом ряду и по 2 пробирки для контрольных исследований. На пробирках надписывают фамилию, инициалы обследуемого лица.

7.2.2. Во все пробирки 1 ряда вводят по 2 капли (0,1 мл) стандартного универсального реагента антирезус (анти Rh₀ D).

7.2.3. Во все пробирки 2-го ряда вводят по 2 капли (0,1 мл) изотонического раствора NaCl и по 1 капле (0,05 мл) 33% раствора полиглюкина.

7.2.4. 2-й ряд служит контролем для исключения возможной неспецифической агглютинации исследуемых эритроцитов, например, за счет аутоантител.

7.2.5. В каждую пару одинаково обозначенных пробирок с универсальным реагентом вводят, согласно маркировке, по 1 капле (0,05 мл) исследуемой крови.

7.2.6. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием и затем медленно поворачивают по оси, наклоняя почти до горизонтального положения так, чтобы содержимое растекалось по стенкам пробирки. Такое растекание крови по стенкам делает реакцию более выраженной.

7.2.7. Агглютинация наступает уже в течение первой минуты, но для образования устойчивости комплекса антиген + антитело и четко выраженной реакции, а также ввиду возможности замедленной реакции при слабо выраженной агглютинабельности эритроцитов, контакт эритроцитов с реагентом при поворачивании пробирок проводят не менее 3-х минут.

7.2.8. Через 3 минуты добавляют по 2 – 3 мл изотонического раствора NaCl, перемешивают содержимое путем 2 - 3 кратного переворачивания пробирок (не встряхивая!)

7.2.9 Учет результата. Пробирки просматривают на свет невооруженным глазом или через лупу. Результат трактуют по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов:

- при наличии агглютинации, исследуемую кровь относят к «резус – положительной» (Rh +);
- при отсутствии агглютинации исследуемую кровь считают «резус – отрицательной (Rh -).

Обязательно ставить контроль.

Во всех образцах контрольного ряда агглютинации быть не должно.

7.3 Определение полных иммунных антител групповой системы АВ0 реакцией солевой агглютинации

7.3.1 Подготовка реагентов для анализа

7.3.1.1 Поместить в предварительно маркированные градуированные центрифужные пробирки по 0,5 мл/ 500 мкл консервированных стандартных эритроцитов для исследований системы АВ0 групп А (II) и В (III), взятых из осадка на дне флаконов.

7.3.1.2 Долить в пробирки до метки 10 мл 0,9% раствор хлорида натрия и перемешать их содержимое индивидуальной для каждой пробирки одноразовой или стеклянной палочкой.

7.3.1.3 Уравновесить пробирки и центрифугировать их в течение 5 минут при 2000-3000 об/мин.

7.3.1.4 Отсосать надосадочную жидкость из каждой пробирки. Повторить отмывание эритроцитов.

7.3.1.5 Установить в штатив и обозначить две пробирки в соответствии с групповой принадлежностью отмываемых эритроцитов.

7.3.1.6 Приготовить 2% взвесь отмываемых эритроцитов. Для этого внести в каждую из двух пробирок по 49 капель (0,01 мл/ 10 мкл каждая) 0,9% раствора хлорида натрия и по 1 капле (0,01 мл/ 10 мкл) отмываемых стандартных эритроцитов в соответствии с их маркировкой и маркировкой пробирок с отмываемыми эритроцитами. Перемешать содержимое пробирок индивидуальной для каждой пробирки стеклянной палочкой.

7.3.2 Поместить 0,5-1,0 мл исследуемой сыворотки в градуированную центрифужную пробирку, развести в четыре раза 0,9% раствором хлорида натрия и перемешать одноразовой или стеклянной палочкой.

7.3.3 Разлить разведенную сыворотку в две маркированные градуированные центрифужные пробирки поровну.

7.3.4 Прогреть одну из пробирок с разведенной сывороткой в водяной бане при температуре 70°C в течение 10 минут. Получить в результате этого две порции исследуемой сыворотки - нативную и прогретую, каждая из которых разведена в соотношении 1:4.

7.3.5 Нумеровать лунки в планшете для иммунологических реакций следующим образом:

- при исследовании сыворотки группы А (II) или В (III) - один ряд из 12 лунок;
- при исследовании сыворотки группы 0 (I) - два ряда по 12 лунок.

Нумерация лунок заключается в обозначении у каждой лунки степени разведения помещенной в нее сыворотки (1:4, 1:8, 1:16 и т. д.).

7.3.6 Внести во все лунки каждого ряда, начиная со второй, по две капли (0,02 мл/ 20 мкл) 0,9% раствора хлорида натрия.

7.3.7 Внести в первую и вторую лунки каждого ряда по две капли (0,02 мл/ 20 мкл) непрогретой сыворотки, разведенной в четыре раза.

7.3.8 Смешать во второй лунке планшета каждого ряда сыворотку с 0,9% раствором хлорида натрия пипеткой и перенести две капли этой смеси в третью лунку, из третьей, после перемешивания, в четвертую и т. д.

7.3.9 Удалить из последней лунки две капли смеси. В результате в лунках планшета получено разведение исследуемой сыворотки от 1:4 до 1:8000.

7.3.10 Приготовить аналогично разведения прогретой сыворотки, разведенной в четыре раза, согласно п.п. 7.4.5 - 7.4.9. Достаточно сделать разведения до 1:128.

7.3.11 Добавить во все лунки планшета с разведениями прогретой и непрогретой сыворотки по одной капле (0,01 мл/ 10 мкл) 2% смеси консервированных стандартных эритроцитов противоположной группы, а именно :

- при исследовании сыворотки группы В_а (III) - эритроциты группы А (II);
- при исследовании сыворотки группы А_в (II) - эритроциты группы В (III);
- при исследовании сыворотки группы 0_{ав} (I) - в один ряд лунок добавить эритроциты

группы А (II), в другой - группы В (III).
7.3.12 Встряхнуть планшеты для перемешивания содержимого лунок. Оставить планшеты на один час: с нативной сывороткой - при комнатной температуре, с прогретой - в термостате при температуре 37 °С.

7.3.13 Учесть результат реакции при помощи лупы с 6-8 -кратным увеличением.

7.4 Определение неполных иммунных антител групповой системы АВ0 непрямой пробой Кумбса

7.4.1 Подготовка реагентов для анализа выполняется согласно п.7.3.1.1.-7.3.1.4. настоящей инструкции.

7.4.2 Установить в штатив и пронумеровать: 6 пробирок – при исследовании сыворотки групп

A_{β} (II) и B_{α} (III) и два ряда по 6 пробирок - при исследовании сыворотки группы $O_{\alpha\beta}$ (I).

7.4.3 Надписать на пробирках степень разведения сыворотки, которая будет исследована, от 1:4 до 1:128.

7.4.4 Внести во все пробирки, начиная со второй, по три капли 0,9% раствора хлорида натрия.

7.4.5 Внести в первую и вторую пробирку штатива по три капли исследуемой сыворотки, предварительно разведенной и прогретой согласно п.п.7.3.2.-7.3.4.

7.4.6 Перенести из второй пробирки, после перемешивания ее содержимого, три капли в следующую и так далее до последней пробирки, из которой три капли удалить. В результате получены разведения сыворотки от 1:4 до 1:128.

7.4.7 Добавить пипеткой во все пробирки по одной маленькой капле (0,01 мл/10 мкл) дважды отмытых 0,9% раствором хлорида натрия консервированных стандартных эритроцитов для исследований системы АВ0 противоположной группы, а именно:

- при исследовании сыворотки группы B_{α} (III) - эритроциты группы А (II);
- при исследовании сыворотки группы A_{β} (II) - эритроциты группы В (III);
- при исследовании сыворотки группы $O_{\alpha\beta}$ (I) - эритроциты группы А (II) в первый ряд

и эритроциты группы В (III) во второй ряд пробирок.

7.4.8 Встряхнуть штатив для перемешивания содержимого пробирок и инкубировать в термостате при температуре 37°С в течение 45 минут.

7.4.9 Трижды отмыть эритроциты после инкубации и приготовить из них 5% взвесь, добавив для этого в каждую пробирку с отмытыми стандартными эритроцитами по 19 капель (0,01 мл/10 мкл каждая) 0,9% раствора хлорида натрия.

7.4.10 Перенести по 1 капле (0,05 мл/ 50 мкл) взвеси эритроцитов из каждой пробирки каждого ряда на планшет и пронумеровать в соответствии с нумерацией пробирок.

7.4.11 Добавить к каждой капле взвеси эритроцитов по одной капле (0,05 мл/ 50 мкл) сыворотки для пробы Кумбса и тщательно перемешать индивидуальной для каждой пары капель стеклянной палочкой. Слегка покачать планшет и оставить в покое на 1-2 минуты.

7.4.12 Наблюдать за результатом реакции в течение 20 минут при периодическом покачивании планшета.

7.4.13 Учесть результат реакции.

7.5 Определение нерегулярных антиэритроцитарных антител в сыворотке крови непрямой пробой Кумбса

7.5.1 Подготовка реагентов для анализа

7.5.1.1 Установить в штатив и пронумеровать три градуированные центрифужные пробирки в соответствии с числом и нумерацией образцов консервированных стандартных эритроцитов для выявления нерегулярных антиэритроцитарных антител.

7.5.1.2 Внести в пробирки, в соответствии с их нумерацией, по 0,5 мл/ 500 мкл консервированных стандартных эритроцитов.

7.5.1.3 Долить во все пробирки до метки 10 мл 0,9% раствор хлорида натрия и перемешать их содержимое индивидуальной для каждой пробирки стеклянной палочкой.

7.5.1.4 Уравновесить пробирки и центрифугировать их в течение 5 минут при 2000 - 3000 об/мин.

7.5.1.5 Отсосать надосадочную жидкость из каждой пробирки. Повторить такое отмывание эритроцитов дважды.

7.5.2 Установить в штатив, пронумеровать и обозначить три пробирки в соответствии с нумерацией и обозначением пробирок со стандартными эритроцитами.

7.5.3 Внести во все пробирки по три капли (0,15 мл) испытуемой сыворотки.

7.5.4 Набрать со дна каждой пробирки, содержащей отмытые стандартные эритроциты, по маленькой капле (0,01 мл/ 10 мкл) эритроцитов с помощью пипетки и перенести их в пробирки с испытуемой сывороткой согласно нумерации пробирок.

7.5.5 Тщательно перемешать содержимое пробирок путем встряхивания и инкубировать в термостате в течение 45 минут при температуре 37°C.

7.5.6 Вынуть штатив с пробирками из термостата, долить в каждую из них 0,9% раствор хлорида натрия до метки 10 мл, уравновесить, центрифугировать и отсосать индивидуальной пипеткой надосадочную жидкость. Повторить такое отмывание эритроцитов 3-4 раза.

7.5.7 Добавить в каждую пробирку с отмытыми эритроцитами по 19 капель (0,01 мл/ 10 мкл каждая) 0,9% раствора хлорида натрия для получения 5% взвеси.

7.5.8 Перенести по 1 капле (0,05 мл/ 50 мкл) взвеси эритроцитов из каждой пробирки каждого ряда на планшет и пронумеровать в соответствии с нумерацией пробирок.

7.5.9 Добавить к каждой капле взвеси эритроцитов по одной капле (0,05 мл/ 50 мкл) сыворотки для пробы Кумбса и тщательно перемешать индивидуальной для каждой пары капель стеклянной палочкой. Слегка покачать планшет и оставить в покое на 1-2 минуты.

7.5.10 Наблюдать за результатом реакции в течение 20 минут при периодическом покачивании планшета.

7.5.11 Учесть результат реакции.

7.6 Определение нерегулярных антиэритроцитарных антител в сыворотке крови реакцией конглоутинации с применением желатина

7.6.1 Установить в штатив и пронумеровать три пробирки в соответствии с числом и нумерацией образцов консервированных стандартных эритроцитов для выявления нерегулярных антиэритроцитарных антител.

7.6.2 Внести во все пробирки по две капли (0,1 мл/100 мкл) исследуемой сыворотки.

7.6.3. Внести в пробирки в соответствии с их нумерацией по одной капле (0,05 мл/50 мкл) консервированных стандартных эритроцитов, предварительно отмытых согласно п.п.7.5.1.1 - 7.5.1.5.

7.6.4 Добавить во все пробирки по две капли (0,1 мл/ 100 мкл) 10% раствора желатина для лабораторных целей, подогретого до разжижения.

7.6.5 Встряхнуть штатив для перемешивания содержимого пробирок и инкубировать в водяной бане при температуре от 46 до 48°C в течение 15 минут или в суховоздушном термостате в течение 45 минут.

7.6.6 Извлечь из водяной бани или термостата штатив с пробирками и добавить в каждую из них 5-8 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

7.6.7 Перемешать содержимое пробирок путем одно-двукратного переворачивания и наблюдать результат реакции, просматривая их на свет.

7.6.8 Учесть результат реакции визуально и с помощью микроскопирования.

7.7 Определение групп крови системы АВ0 при помощи стандартных изоагглютинирующих сывороток

7.7.1 Нанести на предварительно маркированный планшет под соответствующими обозначениями два ряда капель (по 0,1 мл/100 мкл каждая) стандартных

изогемагглютинирующих сывороток АВ0 разных серий в следующем порядке: 0_{ар}(I) (анти-(A+B)), A_β(II) (анти-B), B_α(III) (анти-A).

7.7.2 Извлечь из пробирки, содержащей исследуемую кровь, эритроциты и нанести их рядом с каждой каплей стандартной сыворотки по одной маленькой капле (0,01 мл/ 10 мкл). Капля эритроцитов должна быть приблизительно в 10 раз меньше капли сыворотки.

7.7.3 Тщательно перемешать во всех каплях сыворотку с эритроцитами одноразовыми или стеклянными палочками, индивидуальными для каждой пары капель. Покачать планшет и оставить в покое на 1-2 минуты.

7.7.4 Наблюдать за ходом реакции при периодическом покачивании планшета в течение 5 минут. Агглютинация исследуемых эритроцитов, как правило, начинается в течение первых 10-30 секунд, но 5-минутный интервал наблюдения должен быть выдержан ввиду возможности позднего наступления агглютинации в случае слабой агглютинабельности эритроцитов (A₂ или A₂B).

7.7.5 Добавить в капли смеси сыворотки с эритроцитами, в которых наступила агглютинация (но не ранее, чем через 3 минуты), по 1 капле (0,05 мл/ 50 мкл) 0,9% раствора хлорида натрия для исключения неспецифического характера агглютинации. Продолжить наблюдение при периодическом покачивании планшета до истечения пяти минут.

7.7.6 Провести дополнительное контрольное исследование испытуемых эритроцитов стандартной сывороткой группы АВ₀(IV), если агглютинация наблюдается со стандартными сыворотками всех групп (во всех каплях), для исключения неспецифической агглютинабельности эритроцитов. Нанести для этого на планшет большую каплю (0,1 мл/100 мкл) сыворотки группы АВ₀(IV), добавить к ней маленькую каплю (0,01 мл/10 мкл) испытуемых эритроцитов, перемешать и наблюдать за ходом реакции в течение 5 минут при периодическом покачивании планшета.

7.7.7 Учесть результат реакции.

7.8 Проба на совместимость переливаемой крови с применением 33% раствора полиглюкина для лабораторных целей

7.8.1 Установить в штатив центрифужную или любую другую пробирку емкостью не менее 10 мл. Надписать на ней фамилию, инициалы, группы крови больного и донора, номер контейнера с кровью.

7.8.2 Внести пипеткой на дно пробирки две капли сыворотки больного, одну каплю крови из контейнера и одну каплю 33% раствора полиглюкина для лабораторных целей.

7.8.3 Перемешать содержимое пробирки встряхиванием, далее в течение 3-5 минут медленно поворачивать ее по оси, наклоняя почти до горизонтального положения так, чтобы содержимое растекалось по стенкам. Такое растекание содержимого пробирки по стенкам делает реакцию более выраженной.

7.8.4 Установить пробирку вертикально, добавить 2-3 мл 0,9% раствора хлорида натрия и перемешать ее содержимое путем 2-3х-кратного перевертывания (не взбалтывать!). Просмотреть пробирку на свет невооруженным глазом или через лупу.

7.8.5 Учесть результат реакции.

7.9 Нормы расхода

7.9.1 Определение групповых анти-A и анти-B антител в сыворотке / плазме крови при исследовании групповой принадлежности системы АВ0 перекрестным способом - 0,03 мл на 1 исследование.

7.9.2 Определение полных иммунных антител групповой системы АВ0 - 0,01 мл на 1 исследование сыворотки групп А (II) и В (III); 0,02 мл на одно исследование сыворотки группы 0 (I).

7.9.3 Определение неполных иммунных антител групповой системы АВ0 - 0,06 мл на

исследование сыворотки групп А (II) и В (III); 0,12 мл на одно исследование сыворотки группы 0 (I).

7.9.4 Определение нерегулярных антиэритроцитарных антител в сыворотке крови непрямой

пробой Кумбса - 0,03 мл на 1 исследование; реакцией конглоутинации с применением желатина - 0,15 мл на 1 исследование.

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 стандартных изогемагглютинирующих сывороток АВ0 двух серий каждой группы

Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации,

Знаком минус (-) - отсутствие её

Стандартные 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)
+	+	-	
+	+	+	AB(IV)
+	+	+	
Контроль с сывороткой группы АВ ₀ (IV)			-

Оценка результатов определения групп крови перекрестным методом при помощи стандартных изогемагглютинирующих сывороток двух серий каждой группы и стандартных эритроцитов

Таблица 2

Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки группы		
0 _{αβ} (A+B) Анти-(A+B)	A _β (II) Анти-B	B _α (III) Анти-A
-	-	-
-	-	-
Стандартные эритроциты		
0(I)	A(II)	B(III)
-	+	+
Исследуемая кровь группы 0(I)		

Таблица 3

Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки группы		
0 _{αβ} (A+B) Анти-(A+B)	A _β (II) Анти-B	B _α (III) Анти-A
+	+	-
+	+	-
Стандартные эритроциты		
0(I)	A(II)	B(III)
-	+	-
Исследуемая кровь группы B(III)		

Таблица 4

Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки группы		
0 _{αβ} (A+B) Анти-(A+B)	A _β (II) Анти-B	B _α (III) Анти-A
+	-	+
+	-	+
Стандартные эритроциты		
0(I) -	A(II) -	B(III) +
Исследуемая кровь группы A(II)		

Таблица 5

Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки группы			
0 _{αβ} (A+B) Анти-(A+B)	A _β (II) Анти-B	B _α (III) Анти-A	AB ₀ (IV) контроль
+	+	+	-
+	+	+	-
Стандартные эритроциты			
0(I) -	A(II) -	B(III) -	AB(IV) -
Исследуемая кровь группы AB(IV)			

8.2. В случае определения резус принадлежности наличие агглютинатов в пробирке указывает на присутствие соответствующих антигенов. Для контроля специфичности (независимо от применения методики исследования) необходимо использовать соответствующие стандартные Rh(+) и Rh(-) эритроциты.

8.3. Регистрация результатов реакции (п.п.7.3.,7.3.-7.6.) проводится по наличию (от «+» до «++++») или отсутствию («-») агглютинации консервированных стандартных эритроцитов исследуемой сывороткой в каждой капле (или пробирке). Результат учитывается как:

- отрицательный, если агглютинации эритроцитов не наблюдается, а капля смеси (или содержимое пробирки) остается равномерно окрашенной (-ым) в красный цвет. При определении нерегулярных антиэритроцитарных антител реакцией конгломинации с применением желатина необходимо дополнительно микроскопировать содержимое пробирок, в которых при просмотре невооруженным глазом агглютинация не видна. Для этого каплю

содержимого каждой пробирки поместить с помощью стеклянной палочки на предметное стекло и просмотреть под малым увеличением;

- положительный, если видны агглютинаты в виде склеенных эритроцитов, а капля смеси (или содержимое пробирки) в той или иной степени обесцвечивается.

Отсутствие агглютинации во всех каплях (пробирках) свидетельствует о том, что исследуемая сыворотка не содержит антител, направленных против антигенов консервированных стандартных эритроцитов.

Наличие агглютинации хотя бы в одной капле (пробирке) говорит о том, что исследуемая сыворотка содержит антитела, направленные против какого-либо из антигенов консервированных стандартных эритроцитов.

8.4. Регистрация результата определения полных иммунных антител групповой системы АВ0 реакцией солевой агглютинации (п.7.3.) проводится по наличию или отсутствию агглютинации консервированных стандартных эритроцитов исследуемой сывороткой, что выражается в разной форме их осадка на дне лунок планшета. Результат учитывается как:

- отрицательный, если агглютинации эритроцитов не наблюдается: осадок эритроцитов располагается ровным слоем в центре лунки планшета без шероховатостей и неровностей, границы его представляют собой правильно очерченный круг. Диаметр осадка при отрицательном результате всегда меньше, чем при положительном;

- положительный, если агглютинация эритроцитов произошла: осадок эритроцитов располагается на дне лунки планшета неравномерным слоем. Отмечается шероховатость, губчатость или зернистость его структуры. Края осадка неровные, изогнутые, иногда они завернуты внутрь. В некоторых случаях эритроциты расположены в виде волнистого венчика вокруг более светлой центральной части.

Отсутствие агглютинации во всех лунках планшета свидетельствует о том, что исследуемая сыворотка не содержит иммунных антител групповой системы АВ0 полной формы.

Наличие агглютинации свидетельствует о том, что исследуемая сыворотка содержит иммунные антитела групповой системы АВ0 полной формы, а последнее разведение, в котором она наблюдается — об их титре.

8.5. Контроль специфичности.

Для контроля специфичности реакции при определении нерегулярных антиэритроцитарных антител в каждую серию исследований необходимо включать контрольные образцы сывороток, содержащие («+» контроль) и не содержащие («-» контроль) антиэритроцитарные антитела.

8.6. Результат пробы на совместимость переливаемой крови с применением 33% раствора полиглюкина для лабораторных целей учитывают следующим образом: наличие агглютинации в пробирке свидетельствует о том, что кровь донора несовместима с кровью больного и не должна быть ему перелита. Если содержимое пробирки остается равномерно окрашенным и в нем не наблюдается признаков агглютинации эритроцитов, это означает, что кровь донора совместима с кровью больного в отношении резус-антигена D.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Набор реагентов для определения антител к антигенам эритроцитов хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок годности набора указан на этикетках компонентов набора и коробке на набор.

Реагенты из разгерметизированных флаконов пригодны для использования в течение недели.

Эксплуатация набора реагентов для определения антител к антигенам эритроцитов должна производиться в помещении с хорошим освещением при температуре от 15 до 25 °С.

10. РЕКЛАМАЦИЯ

177

Рекламации следует направлять в учреждение-изготовитель.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью
14 (четырнадцать) листов

Главный врач



[Handwritten signature]

Фадеева Т.В.

