

ИНСТРУКЦИЯ МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
13 ноября 2008 г. № 121-1108

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
Министра здравоохранения
Республики Беларусь

Р.А.Часнойть

13.11.2008

Приготовление консервированных стандартных эритроцитов и их применение в изосерологических исследованиях

Учреждение-разработчик: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии»

Авторы: д.м.н., профессор М.П.Потапнев, к.м.н., доцент Э.Л.Свириновская, Е.М.Дворина, Т.В.Будько, Е.В.Полкова

Минск, 2008

Стандартные эритроциты, содержащие определенные сочетания аллоантигенов, предназначены для выявления антиэритроцитарных антител в сыворотке исследуемой крови, при определении групп крови АВ0 перекрестным способом, для контроля при определении резус-принадлежности крови, а также для проведения контроля специфичности и активности изготавливаемых стандартных изогемагглютинирующих сывороток АВ0, сывороток антирезус, стандартных сывороток и реагентов, предназначенных для определения различных систем антигенов эритроцитов крови человека.

С целью увеличения срока годности стандартных эритроцитов можно производить их консервирование специально изготовленными консервирующими растворами.

I. Требования, предъявляемые к стандартным эритроцитам

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 группы А(II), предназначенные для выявления изогемагглютинина α , должны иметь титр не ниже 1:64. Стандартные эритроциты группы В(III), предназначенные для выявления изогемагглютинина β , также должны иметь титр не ниже 1:64.

Титр антигенов А и В устанавливается с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток группы $A_{\beta}(II)$ (анти-В) и $B_{\alpha}(III)$ (анти-А) или соответствующих моноклональных антител анти-А и анти-В, удовлетворяющих требованиям действующих инструкций.

Время наступления агглютинации эритроцитов А₁ и В со стандартными изогемагглютинирующими реагентами должно составлять не более 5 секунд, эритроцитов подгруппы А₃, В₂ – не более 2 минут.

Стандартные эритроциты группы крови 0(I) с этими реактивами не должны давать агглютинации в течение 20 минут.

Стандартные эритроциты группы крови 0(I), предназначенные для выявления в исследуемой сыворотке антиэритроцитарных антител и установления их специфичности, должны содержать антигены системы Резус: D, C, C^w, c, E, e в различных сочетаниях, антигены систем Келл, Даффи, Кидд, M, N, S, s, Le, обеспечивающие выявление клинически значимых антител, и давать с соответствующими реактивами четкую агглютинацию при определении методом конглоутинации с желатином, экспресс-методом в пробирках или на плоскости без подогрева или непрямой пробе Кумбса, в зависимости от того, для какого метода исследования предназначен используемый реактив.

Резус-отрицательные стандартные эритроциты 0(I) фенотипа ccddее не должны давать агглютинации с реагентами антирезус, содержащими антитела анти-D, анти-C, анти-E во всех методах исследования, для использования в которых предназначены указанные реагенты антирезус.

Время наблюдения за отрицательной реакцией должно соответствовать времени, установленному для каждой из этих реакций.

II. Приготовление консервированных стандартных эритроцитов

Приготовление стандартных эритроцитов производится в условиях строгого соблюдения асептики и состоит из приготовления консервирующего раствора, получения взвеси эритроцитов в консервирующем растворе, розлива эритроцитов, маркировки продукции и контрольных исследований.

1. Приготовление консервирующего раствора для стандартных эритроцитов

Консервирующей средой для приготовления стандартных эритроцитов могут служить растворы: консервант № 1, если эритроциты предназначены для определения групп крови системы АВ0, или консервант № 2, если эритроциты предназначены для выявления антиэритроцитарных антител, установления их специфичности, стандартизации аллоиммунных сывороток (рецептура приведена ниже).

В случае необходимости доведения pH растворов до требуемых величин добавляют несколько кристаллов аскорбиновой кислоты или Na₂HPO₄ 12H₂O.

Консервант № 1		Консервант № 2	
сорбит	40,0 г	аденин	0,03 г
глюкоза	6,0 г	инозин	0,06 г
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	2,0 г	лимонная кислота	1,5 г
KH ₂ PO ₄	0,9 г	глюкоза	3,0 г
этиловый спирт 96°	100 мл	Na ₃ PO ₄	0,4 г
вода бидистиллированная	до 1000 мл	NaOH1н	20 мл
pH раствор	6,4	вода бидистиллированная	до 100 мл
		pH раствора	6,3–6,4

Консервирующие растворы (консерванты) представляют собой прозрачную бесцветную жидкость без запаха. Розлив производят в стерильные флаконы емкостью 250 мл или 500 мл, которые закрывают резиновыми пробками и завальцовывают металлическими колпачками. Стерилизация консервантов производится в автоклаве при 1,2 атмосферы в течение 30 минут*. Срок годности консервантов – 6 месяцев. В случае помутнения консервирующего раствора или появления желтого окрашивания применение его для работы недопустимо.

* Стерилизацию консервантов можно производить путем фильтрования их через соответствующие стерилизующие фильтры. Розлив производят в стерильные флаконы емкостью 250–500 мл, которые немедленно закрывают резиновыми пробками и завальцовывают металлическими колпачками.

2. Получение взвеси эритроцитов в консерванте и розлив

Источником получения стандартных эритроцитов является консервированная кровь доноров, у которых антигенная структура эритроцитов определена заранее.

Для изготовления тест-эритроцитов 0, А, В, используемых при определении групп крови АВ0 и в качестве контроля при определении резус-принадлежности, должна быть использована кровь одного специально отобранного донора.

Выбранную цельную кровь можно хранить в холодильнике при температуре +4 °С до 3 дней.

После удаления плазмы эритроцитную массу передают в подразделение СПК, ответственное за производство изосерологических стандартов. Не позднее суток в боксе через обычную стерильную систему для заготовки крови путем прокола переливают эритроцитную массу во флакон с заготовленным консервантом так, чтобы соотношение эритроцитарной массы и консерванта было 1:1. Содержимое флакона осторожно перемешивают и разливают той же системой в стерильные флаконы по 5, 10 или 15 мл.

Флаконы (по 5, 10 или 15 мл) закрывают специальным устройством с крышечкой-пипеткой или резиновыми пробками, завальцовывают металлическими колпачками, немедленно маркируют и помещают в холодильник при температуре +4 °С.

Для изготовления стандартных эритроцитов, предназначенных для выявления антиэритроцитарных антител, можно использовать эритроциты одного донора или смесь эритроцитов 0(I) группы от двух-четырех доноров различного фенотипа так, чтобы каждый из редких антигенов К, С^w, Е присутствовал в эритроцитах не менее чем у двух доноров. При составлении смеси консервированную эритроцитную массу переливают в одну стерильную емкость и разливают как указано выше.

3. Маркировка

На флаконы со стандартными эритроцитами наклеивают этикетки с указанием учреждения, изготовившего эритроциты, группы крови по системе АВ0, антигенного состава эритроцитов, номера серии и срока годности. При выдаче прилагают наставление по применению стандартных эритроцитов.

4. Контроль

Контроль специфичности и активности стандартных эритроцитов производится после их расфасовки и маркировки в лаборатории иммунологических стандартов станции переливания крови.

III. Хранение и сроки годности

Консервированные стандартные эритроциты хранят при температуре +4 °С. Срок годности консервированных стандартных эритроцитов – 2 месяца.

IV. Транспортировка стандартных эритроцитов

Транспортировка стандартных эритроцитов производится аналогично транспортировке консервированной крови в изотермической таре.

Дополнение 1

Наставление по применению консервированных стандартных эритроцитов
(прилагается при выдаче готовой продукции)

Стандартные/тест-эритроциты группы 0(I) с содержанием в эритроцитах клинически значимых антигенов D, C, E, c, e, Kell используются для выявления соответствующих изоиммунных противозэритроцитарных антител в сыворотке крови доноров, больных, беременных и других обследуемых лиц с помощью реакции конгломинации в желатине, непрямой пробы Кумбса, реакции агглютинации в солевой среде в пробирках или на плоскости, в качестве положительного контроля при определении резус-принадлежности крови.

Тест-эритроциты группы 0(I), A(II), B(III) предназначены для выявления изогемагглютининов анти-A и анти-B в сыворотке или плазме при определении групповой принадлежности крови перекрестным методом.

Для выявления неполных изоиммунных анти-A и анти-B антител в сыворотке крови человека с помощью реакции конгломинации в желатине и непрямой пробе Кумбса. Тест-эритроциты группы 0(I), резус-отрицательные могут быть использованы в качестве отрицательного контроля при определении резус-принадлежности крови.

Срок годности консервированных стандартных эритроцитов – 2 месяца. Стандартные эритроциты из разгерметизированного флакона пригодны для использования в течение 2 недель.