

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра
_____ В.В. Колбанов
13 февраля 2003 г.
Регистрационный № 124-1102

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТАНДАРТНЫХ
ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ
СЫВОРОТОК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП
КРОВИ СИСТЕМЫ АВ0**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: НИИ гематологии
и переливания крови,
Республиканская станция переливания крови

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Э.Л. Свирновская, В.С. Бондаренко, к.м.н.,
доцент В.Н.Гапанович, Т.В. Будько, к.м.н. Л.В. Иванов

Минск, 2003

Стандартными изогемагглютинирующими сыворотками являются сыворотки, приготовленные из крови людей и содержащие групповые антитела (агглютинины). Сыворотки предназначены для определения групповой принадлежности крови людей по системе АВ0.

Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки представляют собой прозрачную жидкость, окрашенную в соответствии с групповой принадлежностью, расфасованную в маленькие флаконы. На этикетке обязательно указывают название учреждения, изготовившего сыворотку, специфичность, титр агглютининов, объем (в мл) и срок годности.

ОТБОР КРОВИ И ПЛАЗМЫ ДЛЯ СТАНДАРТНЫХ СЫВОРОТОК

Источниками для получения стандартных сывороток служат:

кровь, заготовленная без антикоагулянта или с антикоагулянтом от донора, предварительно обследованного и содержащего в группе крови антитела с титром, достаточным для изготовления стандартных сывороток;

плазма, заготовленная методом плазмафереза и содержащая групповые антитела с необходимым титром, является оптимальным источником для производства стандартных сывороток, т.к. позволяет от одного донора получить большой объем сырья.

ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К СТАНДАРТНОЙ ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ СЫВОРОТКЕ

К стандартной изогемагглютинирующей сыворотке предъявляются следующие требования:

сыворотка должна быть специфичной, то есть содержать определенные групповые антитела – α (анти-А), β (анти-В) или оба антитела вместе и не вызывать неспецифической агглютинации эритроцитов одноименной группы и группы 0(I). Сыворотка группы АВ(IV), не содержащая групповых агглютининов, не должна вызывать агглютинации;

сыворотка должна быть активной, что выражается в наступлении первых признаков агглютинации со стандартными эритроцитами подгрупп А1 и В1 в течение первых 30 секунд и со стандартными эритроцитами подгрупп А2, В2 в течение первой минуты и титром агглютининов по отношению к эритроцитам групп А1 и В1 не ниже 1:64 и группы А2 – не ниже 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 А(II) – в синий цвет, группа В(III) – красный цвет, группа АВ(IV) – в желтый цвет;

должна быть предохранена от инфицирования прибавлением консервирующих средств;

должна иметь точную паспортизацию, т.е. обозначение групповой принадлежности, титра, количества, срока годности, номера серии, количества и наименования учреждения, ее изготовившего. Все эти сведения должны быть обозначены на этикетке, наклеиваемой на флакон со стандартной сывороткой, а также внесены в «Журнал регистрации изготовленной стандартной сыворотки системы АВ0», в который записываются также сведения о дате изготовления сыворотки и результатах контрольных проверок ее качества.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАБОТЫ

1. Предварительное определение пригодности крови донора для изготовления из нее стандартной изогемагглютинирующей сыворотки проводится в образце крови, полученной непосредственно от донора в небольшом количестве.

2. Взятие крови от донора, отделение от нее плазмы (сыворотки) или получение плазмы от донора при помощи плазмафереза.

3. Обработка плазмы, крови для получения из нее сыворотки.

4. Сбор остатков крови из флакончиков (пробирок)-спутников в общую емкость, отделение от нее сыворотки (плазмы) и предварительное определение пригодности для изготовления стандартной изогемагглютинирующей сыворотки.

5. Определение пригодности сыворотки, плазмы для изготовления из нее стандартной изогемагглютинирующей сыворотки, включающее:

определение групповой принадлежности сыворотки (групповых агглютининов);

определение способности сыворотки вызывать неспецифическую агглютинацию;

определение гемолизирующих свойств сыворотки;

определение активности сыворотки;

скорость определения агглютинации;

титр агглютининов.

6. Предварительное заключение о пригодности сыворотки.

7. Консервирование сыворотки.

8. Первый контроль сыворотки до розлива.

9. Второй контроль сыворотки до розлива.

10. Смешивание отдельных порций сывороток.

11. Фильтрация сыворотки.

12. Окрашивание сыворотки.

13. Окончательное заключение о пригодности сыворотки.

14. Розлив сыворотки.
15. Паспортизация разлитой сыворотки.
16. Контроль разлитой сыворотки.

МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение групповой принадлежности сыворотки при помощи стандартных эритроцитов

Определение производится на белой фарфоровой или любой другой белой пластинке со смачиваемой поверхностью, на которой надписываются обозначения: слева «0», в середине «А» и справа «В». Соответственно каждому обозначению на пластинку наносят по одной маленькой капле (0,01мл) стандартных эритроцитов групп 0(I), А(II), В(III). На каждую каплю эритроцитов капают одну большую каплю (0,1 мл) испытуемой сыворотки с расчетом, чтобы соотношение количества эритроцитов и сыворотки было приблизительно 1:10. Эритроциты перемешивают с сывороткой сухой стеклянной палочкой, пластинку слегка покачивают, затем на 1-2 минуты оставляют в покое, потом снова покачивают и одновременно наблюдают за результатом. Наблюдение проводят в течение 5 минут. Через 3 минуты в каждую каплю, в которой наступила агглютинация, добавляют 1 каплю (0,1 мл) изотонического раствора NaCl и снова покачивают пластинку.

Результат учитывают по наличию или отсутствию агглютинации в каждой капле. При этом возможны четыре варианта:

агглютинация наступила с эритроцитами групп А(II) и В(III), но отсутствует с эритроцитами группы 0(I). Это указывает на наличие в испытуемой сыворотке двух агглютининов α (анти-А) и β (анти-В), т.е. на принадлежность испытуемой сыворотки к группе $0\alpha\beta$ (I);

агглютинация наступила с эритроцитами группы В(III) и отсутствует с эритроцитами групп 0(I) и А(II). Это указывает на наличие в испытуемой сыворотке только агглютинина β (анти- β), т.е. на принадлежность испытуемой сыворотки к группе $A\beta$ (II);

агглютинация наступила с эритроцитами группы А(II) и отсутствует с эритроцитами групп 0(I) и В(III). Это указывает на наличие в испытуемой сыворотке только агглютинина α (анти-А), т.е. на принадлежность испытуемой сыворотки к группе $B\alpha$ (III);

агглютинация отсутствует с эритроцитами всех трех групп. Это указывает на отсутствие групповых агглютининов, т.е. на принадлежность испытуемой сыворотки к группе АВ0(IV).

Определение способности сыворотки вызывать неспецифическую агглютинацию

Эти исследования можно проводить одновременно с определением групповой принадлежности при помощи стандартных эритроцитов. Дополнительно в исследование включают 6-8 образцов эритроцитов группы 0(I) и одногруппных с исследуемой сывороткой. Наблюдение результатов с эритроцитами одноименной группы и группы 0(I) проводят до 20 минут.

Если испытуемая сыворотка вызывает агглютинацию эритроцитов одноименной группы и группы 0(I), это значит, что она обладает свойством вызывать неспецифическую агглютинацию. В этих случаях учитывают скорость ее наступления и интенсивность.

Определение гемолизирующих свойств сыворотки

Гемолизирующие свойства сыворотки выявляются одновременно с определением групповой принадлежности при помощи стандартных эритроцитов. Если при смешивании с эритроцитами сыворотка вызывает их гемолиз, это значит, что сыворотка обладает гемолизирующими свойствами.

Определение скорости наступления агглютинации

Скорость наступления агглютинации определяют так же, как групповую принадлежность – при помощи стандартных эритроцитов, но с дополнительным включением в реакцию стандартных эритроцитов группы A2. Скорость наступления агглютинации учитывают с помощью секундомера от момента перемешивания сыворотки с эритроцитами до момента наступления первых признаков агглютинации отдельно по отношению к эритроцитам групп A1, A2 и B.

Определение титра агглютининов

Для определения титра агглютининов в исследуемой сыворотке приготавливают разведения ее в изотоническом растворе NaCl. Для этого в штатив ставят 10 пробирок и в каждую из них вносят градуированной пипеткой по 1 мл изотонического раствора NaCl. Затем в первую пробирку той же пипеткой добавляют 1 мл испытуемой сыворотки и перемешивают ее с изотоническим раствором путем встряхивания пробирки. Из этой пробирки 1 мл смеси переносят во вторую и снова пере-

мешивают, и так до последней пробирки. В результате в пробирках образуются разведения сыворотки от 1:2 до 1:1024.

Непосредственно на пластинке можно приготовить разведения сыворотки в арифметической прогрессии. Для этого следует сделать в пробирке первое исходной разведение (любое). Например, к 1 капле сыворотки добавить 15 капель изотонического раствора NaCl, получив, таким образом, разведение 1:16. Эту разведенную сыворотку нанести в 6 пронумерованных точек на пластинку: в первую точку – 2 капли, во вторую, третью и все последующие – по 1 капле. Затем добавить изотонический раствор: во вторую точку 1 каплю, в третью – 2 капли, в четвертую – 3, в пятую – 4, в шестую – 5. Капли перемешивают стеклянной палочкой, начиная с последней точки в направлении к первой. Так получают разведение сыворотки на пластинке: 1:16, 1:32, 1:48, 1:64, 1:80, 1:96.

При определении титра агглютининов α_2 по отношению к эритроцитам A2 приготавливают дополнительно промежуточное разведение сыворотки 1:24.

Разведения сыворотки можно приготовить, отмеряя сыворотку и изотонический раствор NaCl каплями, для чего используют одну и ту же пипетку.

На пробирках отмечают степень разведения сыворотки. Далее 0,1 мл (одну большую каплю) каждого разведения сыворотки переносят на пластинку, предварительно написав на ней обозначения степени разведения сыворотки: 1:2, 1:4 и т.д. до 1:1024.

Разведения сыворотки можно приготавливать также непосредственно на пластинке. Для этого в 10 пронумерованных точек наносят по одной большой капле (0,1 мл) изотонического раствора NaCl. В первую точку добавляют 1 каплю (0,1 мл) испытуемой сыворотки, перемешивают капли, затем той же пипеткой переносят 1 каплю смеси во вторую точку и т.д. до десятой, получая, таким образом, разведения сыворотки от 1:2 до 1:1024.

На пластинку рядом с каждой каплей разведенной сыворотки наносят маленькую каплю (0,01 мл) стандартных эритроцитов соответствующей группы, т.е. эритроциты A1 и A2, когда титруют агглютинины α , и эритроциты группы B, когда титруют агглютинины β . Соотношение эритроцитов и сыворотки должно быть 1:10.

Каждую каплю стандартных эритроцитов тщательно перемешивают с сывороткой сухой стеклянной палочкой, после чего пластинку покачивают, затем оставляют на 1-1,5 минуты в покое, снова покачивают и одновременно наблюдают за результатом в течение 5 минут.

Максимальное разведение сыворотки, в которой наступила агглютинация стандартных эритроцитов до истечения 5 минут, принимают за титр агглютининов в этой сыворотке.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Предварительное заключение о пригодности крови для стандартной сыворотки

Основным показателем пригодности крови донора для стандартной сыворотки является ее активность, т.е. скорость наступления агглютинации и титр агглютининов.

Скорость наступления агглютинации должна быть не более 30 секунд с эритроцитами групп А1 и В и не более 1 минуты с эритроцитами группы А2.

Титр сыворотки должен быть: для агглютинина α – не ниже 1:64 по отношению к эритроцитам А2; для агглютинина β – не ниже 1:64 к эритроцитам В.

При предварительном исследовании непосредственно взятой пробной порции крови титр агглютининов должен быть хотя бы на одно разведение выше, ввиду возможного его падения в процессе обработки и консервирования основной порции крови.

Одновременно следует учитывать, не вызывает ли сыворотка крови неспецифической агглютинации и гемолиза эритроцитов.

Если сыворотка вызывает слабую неспецифическую агглютинацию эритроцитов позднее, чем через 5 минут, то это не является противопоказанием к ее использованию, так как эти свойства при дальнейшей обработке сыворотки исчезают.

Если сыворотка вызывает неспецифическую агглютинацию ранее, чем через 5 минут, то брать у донора кровь для приготовления стандартной сыворотки не следует.

Гемолизирующих свойств крови у доноров обычно не наблюдается, но если это имеет место, брать кровь у донора не следует. В этом случае так же, как и при выраженной неспецифической реакции, донора следует подвергнуть дополнительному медицинскому обследованию.

Доноров, кровь которых соответствует требованиям, предъявляемым к стандартным сывороткам, следует взять на особый учет, с целью дальнейшего использования их крови для изготовления стандартных сывороток, преимущественно с помощью плазмафереза.

Взятие крови и донора и отделение от нее сыворотки

Кровь донора берут из вены в сухой стерильный сосуд. Через 15-30 минут сосуд с кровью встряхивают для отделения свертка от стенки

и затем помещают на сутки в холодильник при $+4 - +8^{\circ}\text{C}$. Отделившуюся за это время сыворотку отсасывают или сливают в другой сосуд, а сосуд со свертком оставляют еще на одни сутки при $+4 - +8^{\circ}\text{C}$. Обычно через одни сутки из свертка отделяется еще некоторое количество сыворотки, которую присоединяют к первой порции. Сыворотку консервируют борной кислотой из расчета 2-3 г на 100 мл сыворотки или азидом натрия из расчета 1 г на 1000 мл сыворотки.

Для ускорения свертывания крови сосуд можно поставить сначала на 1 час в термостат, а затем в холодильник.

Паспортизация

На сосуде с кровью, а затем с сывороткой надписывают паспортные данные, т.е. фамилию, имя и отчество донора, групповую принадлежность, дату взятия крови, количество крови и полученной из нее сыворотки, а также результат исследования пробной порции крови. Эти же сведения записываются в «Журнал регистрации материала, поступающего для изготовления стандартной сыворотки».

Получение сыворотки из крови, оставшейся во флакончиках (пробирках)-спутниках после взятия ее у доноров

Для изготовления сыворотки может быть использована кровь из флакончиков (пробирок)-спутников. Для этого остатки крови сливают (каждую группу отдельно) в сухие флаконы. На флаконе надписывают группу крови и дату ее заготовки.

Использование плазмы крови

При получении сыворотки из плазмы из последней удаляется фибрин. Это можно осуществить несколькими способами:

1. К плазме прибавляют раствор хлорида кальция из расчета 3 мл 20%-го или 6 мл 10%-го на 100 мл плазмы. Через 30-40 минут во флаконе образуется сверток. Если сверток пристал к стенке, то флакон следует встряхнуть, чтобы сверток отделился. Флакон с содержимым оставляют на двое суток в холодильнике, после чего отделившуюся сыворотку переливают через воронку с марлей в другой флакон. Сыворотку консервируют и на флакон наносят паспортные данные.

Иногда во флаконе с сывороткой через некоторое время снова выпадает сверток фибрина; в этих случаях сыворотку еще раз переливают чрез воронку с марлей (с тканью) в другой флакон.

2. К плазме добавляют равный объем одногруппной сыворотки с титром антител 1:64. Содержимое флакона перемешивают и оставляют на одни сутки при комнатной температуре и затем помещают в холодильник на 10-14 дней. На паспорте флакона дописывают сведения о дате и количестве добавленной сыворотки.

За 10-14 дней образуется плотный сверток фибрина. Кроме этого может исчезнуть свойство вызывать гемолиз или неспецифическую агглютинацию эритроцитов.

Отделившуюся сыворотку сливают в другой флакон через воронку с тканью, марлей, сыворотку консервируют, на флакон наносят паспортные данные.

Паспортизация

Паспортные записи о плазме переносят с флакона на флакон по мере отделения сыворотки. К ним добавляют запись о дате получения сыворотки. Те же сведения записывают в «Журнал регистрации материала, поступающего для изготовления стандартной сыворотки АВ0».

Дальнейшая обработка и предварительное заключение о пригодности сыворотки

1. Серологические исследования. В сыворотке определяют: групповую принадлежность (групповые агглютинины); гемолизирующие свойства; способность вызывать неспецифическую агглютинацию; активность, т.е. скорость наступления агглютинации и ее выраженность; титр агглютининов.

Методы исследования см. выше. На основании этих исследований делают предварительное заключение о пригодности сыворотки. Основными показателя являются скорость наступления агглютинации и титр антител.

2. Сыворотку предварительно считают пригодной, если она вызывает агглютинацию эритроцитов групп А1 и В не позднее, чем через 30 секунд, а эритроцитов группы А2 – не позднее чем через 1 минуту, и если титр агглютининов в ней не ниже 1:64 по отношению к эритроцитам групп А1 и В и не ниже 1:16 по отношению к эритроцитам группы А2. При этом следят за тем, чтобы сыворотка не имела красной или бурой окраски.

Если агглютинация наступает позднее или титр агглютининов ниже, сыворотку считают непригодной. Наличие неспецифической агглютинации или гемолизирующих свойств на этой стадии изготовления сыворотки не

делает ее непригодной, что позволяет сохранить ее до 1-го контроля (см. ниже).

3. Паспортизация. Результаты всех исследований, перечисленных в этом разделе, записывают на флаконе с сывороткой и в «Журнал регистрации материала, поступающего для изготовления стандартной сыворотки АВ0».

Консервирование сыворотки

Сыворотку, полученную из крови, взятой непосредственно у донора, и сыворотку, полученную из любого другого источника и признанную предварительно годной, консервируют. Наиболее пригодным консервантом является борная кислота, которую прибавляют из расчета 2-3 г на 100 мл сыворотки, или азид натрия – 1 г на 1000 мл.

После прибавления консерванта сыворотку оставляют на срок 10-12 дней. За этот срок в ней, с одной стороны, может снизиться титр агглютининов, а с другой – исчезнуть свойство вызывать гемолиз или неспецифическую агглютинацию, если это имело место.

Сыворотку, имеющую высокий титр агглютининов, разрешается разводить изотоническим раствором NaCl до титра ниже 1:64, соответственно количеству разводителя добавляют борную кислоту или азид натрия.

Первый контроль сыворотки до розлива и оценка пригодности ее для дальнейшей обработки

1. Первый контроль производится через 10-12 дней после поступления сыворотки, ее предварительного испытания и консервирования. Он заключается в следующем:

проверяют правильность паспортизации сыворотки, т.е. сверяют записи на флаконе и журнале;

определяют групповую принадлежность при помощи стандартных эритроцитов и результат сверяют с обозначением группы крови на флаконе и в журнале;

одновременно с определением групповой принадлежности проверяют способность сыворотки вызывать неспецифическую агглютинацию и гемолиз эритроцитов;

проверяют, нет ли в сыворотке признаков инфицирования, не помутнела ли или не потемнела ли она;

проверяют активность сыворотки, т.е. скорость наступления агглютинации и титр агглютининов;

результаты всех исследований записывают на этикетке флакона и в журнал.

2. Заключение о пригодности сыворотки для дальнейшей обработки делается при следующих условиях: если паспортные записи произведены правильно, в сыворотке нет признаков инфицирования, если она не помутнела и обладает достаточной активностью.

Под достаточной активностью при первом контроле понимают соответствие требованиям, указанным в предыдущем разделе, при условии, что титр не только соответствует этим требованиям, но и не снизился более, чем на два разведения, по сравнению с исходными цифрами.

Если сыворотка отвечает этим условиям, ее считают пригодной для дальнейшей обработки и оставляют еще на 10-12 дней, после чего производят второй контроль (см. ниже).

При снижении титра более чем на две ступени (даже если титр сыворотки после снижения остался равным или выше 1:64), сыворотку считают непригодной.

При наличии признаков инфицирования, значительного потемнения и помутнения сыворотку считают непригодной.

При первом контроле сыворотки явления неспецифической агглютинации и гемолизирующие свойства наблюдаются редко, потому что эти свойства обычно исчезают за время хранения сыворотки с консервантом. Если же эти свойства все же сохранились, это не делает сыворотку непригодной для дальнейшей обработки, так как при некоторых условиях они могут быть устранены в течение времени, предшествующего второму контролю сыворотки.

Устранение свойства сыворотки вызывать неспецифическую агглютинацию

Устранение свойств сыворотки вызывать неспецифическую агглютинацию может быть достигнуто путем разбавления ее изотоническим раствором NaCl. Это допускается только для сыворотки групп 0(I), A (II) и B(III) и только при высоком титре агглютининов в ней (не ниже 1:64) и при этом титре не более, чем половинным объемом изотонического раствора по отношению к объему сыворотки (с добавлением соответствующего количества борной кислоты или азиды натрия). Предварительно испытывают ряд пробных разведений сыворотки, приготовленных в небольших количествах. Наблюдение проводят в течение 20 минут. После подбора разведения, устраняющего неспецифическую агглютинацию, разводят всю сыворотку.

Если разведение изотоническим раствором NaCl не устраняет неспецифическую агглютинацию, сыворотку считают непригодной.

Разведение сыворотки группы АВ(IV) не допускается. Сыворотку, вызывающую хотя бы незначительную неспецифическую агглютинацию, считают непригодной.

Устранение гемолизирующего действия сыворотки

Для устранения гемолизирующего действия сыворотки ее прогревают при t 56°C в течение 1 часа. Если такое прогревание не устраняет гемолизирующего действия, сыворотку считают непригодной.

Второй контроль сыворотки до розлива и оценка ее пригодности для дальнейшей обработки

1. Второй контроль производят через 10-12 дней после первого (приблизительного через 20-24 дня после начала обработки сыворотки) и проводят так же, как первый контроль (см. выше).

2. Заключение о пригодности сыворотки для дальнейшей обработки делают при следующих условиях: если паспортные записи сделаны правильно, сыворотка не инфицирована, не помутнела, не потемнела, не вызывает неспецифической агглютинации и гемолиза эритроцитов и достаточно активна.

Под достаточной активностью при втором контроле понимают соответствие требованиям, указанным выше, при условии, что титр не только соответствует этим требованиям, но и не снизился по сравнению с цифрами, полученными при первом контроле. В других случаях сыворотку считают непригодной.

Смешивание сывороток

Для максимального использования сырья и упрощения контроля за образцами разлитой сыворотки допускается смешивание нескольких порций одногруппных сывороток после второго контроля до розлива (см. ниже). Предварительно из каждой порции берут по 1-2 мл сыворотки и в смеси их определяют титр агглютининов. Затем титр проверяют еще раз через 2-3 дня и, если он не изменился, смешивают остальные сыворотки. Сыворотку-смесь обозначают новым номером и ее снова испытывают, как при втором контроле (см. выше).

Окрашивание сыворотки

Дополнительным условием, предупреждающим ошибки при определении группы крови, является окрашивание сывороток. Окрашивание можно

производить до фильтрации, если предполагается фильтровать сыворотку через бумажный фильтр. При использовании фильтра Зейтца сыворотку окрашивают после фильтрации.

Сыворотку группы А(II) окрашивают в синий (или сине-зеленый) цвет, группы В(III) – в красный, группы АВ(IV) – в желтый (см. Дополнение 2).

Фильтрация сыворотки

Сыворотку, признанную пригодной, фильтруют. Сыворотку, полученную из крови, взятой непосредственно у донора, обычно достаточно профильтровать через бумажный фильтр. Сыворотку, полученную из других источников, необходимо фильтровать через фильтр Зейтца со стерилизующей прокладкой. Такое фильтрование просветляет сыворотку и предупреждает развитие инфекции. Немедленно после фильтрования сыворотку окрашивают (см. Дополнение 2).

Окончательное заключение о пригодности сыворотки

Окончательное заключение о пригодности сыворотки делают после ее фильтрования.

Сыворотку считают пригодной, если она:

специфична, т.е. содержит агглютинины α и β или оба вместе и не вызывает неспецифической агглютинации эритроцитов;

активна, т.е. вызывает первые признаки агглютинации в течение первых 30 секунд с эритроцитами групп А1 и В1 и в течение 1 минуты с эритроцитами группы А2, имеет титр агглютининов не ниже 1:64 по отношению к эритроцитам А2. Для окончательного заключения о пригодности сыворотки, кроме абсолютной величины титра, принимают во внимание его динамику (см. выше: первый контроль, второй контроль);

не оказывает гемолизирующего действия на эритроциты;

прозрачна (допускается небольшая опалесценция);

предохранена от инфицирования консервированием;

имеет точную паспортизацию.

При соответствии этим требованиям сыворотке присваивается номер серии и она может быть разлита и выпущена как стандартная изогемагглютинирующая сыворотка для определения групп крови АВ0 с соответствующей записью в «Журнале регистрации изготовленной стандартной сыворотки системы АВ0».

Разлив

Сыворотку групп $0\alpha\beta$ (I), $A\beta$ (II) и $B\alpha$ (III) разливают во флаконы по 1-5 мл, сыворотку АВ(IV) – по 0,5 мл.

Запрещается разливать сыворотки разных групп одновременно в одном помещении. Немедленно после разлива на флаконы наклеиваются этикетки. Флаконы закупоривают.

Паспортизация разлитой сыворотки

1. Этикетки, наклеиваемые на флаконы с разлитой сывороткой, должны содержать следующие сведения:

название учреждения, в котором изготовлена сыворотка;

групповую принадлежность сыворотки с обязательным указанием агглютининов;

номер серии;

титр агглютининов в сыворотке. Титр α -агглютинина указывается по отношению к эритроцитам группы А1. Для сыворотки группы $O\alpha\beta(I)$ указывается титр только одного агглютинина α или β , того из них, который слабее;

срок годности: число, месяц, год, объем в мл;

количество мл;

на этикетки наносят по диагонали цветные полосы: для группы А(II) – две синие, для группы В(III) – три красные, для группы АВ(IV) – четыре желтые.

2. Этикетки изготавливаются типографским способом, оставляя свободные места для цифровых обозначений (номера серии, количества, титра, количества мл и срока годности), которые вносят на этикетку к моменту разлива (см. рисунок 1).

3. Сыворотку, разлитую во флаконы, регистрируют в «Журнале для регистрации изготовленной стандартной сыворотки системы АВ0».

Наименование учреждения-изготовителя
Изогемагглютинирующая сыворотка группы $O\alpha\beta(I)$ АНТИ-(А+В)
Серия..... Титр.....
Мл годна до

Наименование учреждения-изготовителя
Изогемагглютинирующая сыворотка группы $A\beta(II)$ АНТИ-В
Серия..... Титр.....
Мл годна до

Наименование учреждения-изготовителя
Изогемагглютинирующая сыворотка группы $B\alpha(III)$ АНТИ-А
Серия..... Титр.....
Мл годна до

Наименование учреждения-изготовителя
Изогемагглютинирующая сыворотка группы АВ(IV)
Серия..... Титр.....
Мл годна до

Рис.1 Форма этикеток стандартных изогемагглютинирующих сывороток системы АВ0

На этикетки наносят по диагонали цветные полосы: для группы А(II) – две синие, для группы В(III) – три красные, для группы АВ(IV) – четыре желтые. Можно печатать полностью таким же цветом текст этикеток.

Срок годности стандартной изогемагглютинирующей сыворотки

Срок годности стандартной сыворотки – 6 месяцев с момента ее розлива.

Сыворотку, срок годности которой истек, можно проверить и, если она сохранила без изменений свои свойства (см. выше), продлить срок годности еще на 2 месяца.

Контроль разлитой сыворотки

Контроль разлитой сыворотки производят в пределах срока ее годности. Для этого из каждой серии разлитой сыворотки в лаборатории оставляют несколько флаконов, которые сохраняют как образцы для последующего контроля.

Контроль заключается в проверке внешнего вида сыворотки и сохранения ее специфичности и активности.

При контрольной проверке к сыворотке предъявляют следующие требования:

отсутствие помутнения, выпадения осадка и потемнения;

отсутствие способности вызвать неспецифическую агглютинацию и гемолиз эритроцитов;

наступление агглютинации с эритроцитами групп А1 и В не позднее, чем в течение 30 секунд, с эритроцитами группы А2 – не позднее, чем в течение 1 минуты;

сохранение титра агглютининов на высоте, установленной при втором контроле сыворотки до розлива. Если титр снизился (не более чем на одну ступень), но высота его не ниже требований, указанных выше, то сыворотку проверяют еще чрез 5 и 10 дней. Если титр далее не снижается, сыворотку считают пригодной.

Методика титрования при контроле разлитой сыворотки

При контроле разлитой сыворотки титр можно определять более простым способом. Испытуемую сыворотку разводят изотоническим раствором NaCl соответственно указанному на ней титру. Например, при титре 1:64 в пробирку накапывают 63 капли изотонического раствора и той же пипеткой – 1 каплю испытуемой сыворотки. Сыворотку

тщательно перемешивают с изотоническим раствором и одну каплю переносят на пластинку. Сюда же прибавляют одну маленькую (приблизительно в 10 раз меньшую) каплю стандартных эритроцитов соответствующей группы. Эритроциты перемешивают с сывороткой и наблюдают за результатом при покачивании пластинки в течение 5 минут.

Если за это время появилась агглютинация, значит, титр сыворотки не снизился. Если в течение 5 минут агглютинация не наступила, значит, титр сыворотки снизился. В этих случаях для установления величины титра сыворотку титруют вновь, как указано выше.

Брак разлитой сыворотки в пределах указанного срока годности

Если при контроле разлитой сыворотки окажется, что она не соответствует предъявляемым требованиям (см. выше), то сыворотку считают непригодной и ликвидируют.

В учреждения, в которые эта сыворотка была отпущена, немедленно сообщают по телефону или телеграфом о непригодности данной серии сыворотки.

Сыворотку, возвращенную из других учреждений из-за непригодности, ликвидируют так же, как сыворотку этой серии, оставшуюся неиспользованной в изготовившей ее лаборатории.

Выдача сыворотки

Сыворотку выдают по требованиям учреждений, в которых определяют группу крови. Выдают сыворотку комплектом в равных количествах групп $0\alpha\beta$ (I), $A\beta$ (II) и $B\alpha$ (III). Сыворотку группы $AB0$ (IV) выдают по 1 мл на 15 мл общего количества сыворотки других трех групп. При выдаче сыворотки к ней обязательно прикладывают инструкцию по использованию (см. Дополнение 1).

Хранение сыворотки

Сыворотку хранят в холодильнике при $+4 - +8^{\circ}\text{C}$.

Общие сведения о паспортизации сыворотки

Под паспортизацией подразумевают запись на флаконе всех сведений о находящейся в нем порции исходного материала, из которого получается сыворотка, и последовательную запись всех результатов, полученных при исследовании исходного материала, а затем сыворотки в процессе ее изготовления и контроля.

Паспортные записи производятся:

на флаконе с исходным материалом. Эти записи постепенно пополняются и переносятся с флакона на флакон по мере обработки и исследования этой сыворотки;

на этикетке, наклеиваемой на флаконы с разлитой сывороткой;

в «Журнале регистрации материала, поступающего для изготовления стандартной сыворотки системы АВ0»;

в «Журнале регистрации изготовленной стандартной сыворотки системы АВ0».

Паспортные записи в журналах

В «Журнал регистрации материала, поступающего для изготовления стандартной сыворотки системы АВ0» записывают все сведения о поступившем материале и полученной из него сыворотки, включая контрольные исследования, проведенные до момента розлива сыворотки.

При смешивании сывороток различных серий смесь записывают под новым номером. Записи в этом журнале дублируют информацию на этикетках флаконов с неразлитой сывороткой.

В «Журнал регистрации изготовленной стандартной сыворотки системы АВ0» записывают сведения о сыворотке с момента ее розлива. В этот журнал вносят сведения, имеющиеся на этикетке разлитой сыворотки, и делают дополнительные записи о дате розлива и результатах контрольных проверок разлитой сыворотки. В этот же журнал записывают, куда и сколько было отпущено сыворотки каждой серии.

Нумерацию серий начинают с 01 января каждого года и ведут независимо от групповой принадлежности сыворотки.

Дополнение 1

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП КРОВИ СИСТЕМЫ АВ0

(прилагается при выдаче сыворотки)

Техника реакции

Определение группы АВ0 производится стандартными изогемагглютинирующими сыворотками на плоскости при комнатной температуре.

Стандартные сыворотки наносят на белую пластинку со смачиваемой поверхностью по одной большой капле (0,1 мл) рядом с предварительно надписанным обозначением так, что они образуют ряд капель в следующем порядке по горизонтали: $O\alpha\beta$ (анти-А+В), $A\beta$ (анти-В) и $B\alpha$ (анти-А).

Исследуемую кровь наносят по одной маленькой капле, приблизительно в 10 раз меньше капли сыворотки (0,01 мл), рядом с каждой каплей сыворотки. Кровь тщательно перемешивают с сывороткой стеклянными палочками.

Результат реакции

Наблюдение за ходом реакции производят при легком покачивании пластинки в течение 5 минут.

Результат реакции в каждой капле может быть положительным (+) или отрицательным (-).

Положительный результат (+) выражается в агглютинации (склеивании) эритроцитов: агглютинаты видны невооруженным глазом сначала в виде мелких красных зернышек, постепенно сливающихся в более крупные хлопья. При этом сыворотка постепенно обесцвечивается.

При отрицательной реакции (-) капля остается равномерно окрашенной.

Агглютинация наступает обычно в течение 10-30 секунд, однако наблюдение проводят не менее 5 минут ввиду возможности позднего наступления агглютинации в случае слабой агглютинабельности эритроцитов (A_2 или A_2B).

Через 3 минуты в капли, в которых наступила агглютинация, добавляют по одной большой капле (0,1 мл) изотонического раствора $NaCl$ для разрушения иногда наступающей ложной агглютинации — неспецифического склеивания эритроцитов, в том числе так называемые монетные столбики.

В тех случаях, когда положительный результат получается со стандартными сыворотками всех групп (во всех каплях), для исключения неспецифической агглютинации производится дополнительное контрольное исследование испытуемых эритроцитов со стандартной сывороткой группы AB_0 (IV), не содержащей групповых агглютининов. Лишь отсутствие агглютинации с сывороткой группы AB_0 (IV) позволяет учесть положительный результат реакции с сыворотками $O\alpha\beta$ (I) (анти-А+В), $A\beta$ (II) (анти-В) и $B\alpha$ (III) (анти-А) как истинный.

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

Результат реакции с изогемагглютинирующими сыворотками				Исследуемая кровь принадле- жит к группе
0αβ(I) (анти-A+B)	Aβ(II) (анти-B)	Bα(III) (анти-A)	AB0(IV) контроль	
-	-	-		0(I)
+	-	+		A(II)
+	+	-		B(III)
+	+	+	-	AB(IV)

Примечание: + – наличие агглютинации, - – отсутствие агглютинации.

Уточнение техники реакции, оценки результатов, возможные ошибки и другие подробности см. в «Инструкции по определению групп крови системы АВ0».

Дополнение 2

**ПОДГОТОВКА И ПРИМЕНЕНИЕ КРАСОК
ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ СТАНДАРТНЫХ
ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК**

Для окрашивания изогемагглютинирующих сывороток используются следующие красители:

для сыворотки группы Aβ(II) – метиленовая синяя, бриллиантовая зелень и трипан-блау вместе или любые две из них, взятые в равных количествах;

для сыворотки группы Bα(III) – эозин (BA), эозин натрия или конгорот;

для сыворотки группы AB0(IV) – уранин (флуоресценин растворимый – динатрий флуоресцениат).

Краски растворяют в дистиллированной воде или изотоническом растворе NaCl до получения пересыщенного раствора (1 г на 50 мл жидкости). Краситель приготавливают, исходя из потребности (50-100 мл), и сохраняют для использования.

При изготовлении сывороток немедленно после фильтрования соответствующие растворы красок по 3-5 капель добавляют на каждые 100 мл сыворотки до получения требуемой окраски: синий или сине-зеленый для группы Аβ(II), светло-красный для группы Вα(III) и желтый для группы АВ0(IV).

Следует иметь в виду, что иногда при хранении запаянных ампул на свету синяя краска в сыворотке группы Аβ(II) слегка выцветает, но она восстанавливается после вскрытия флакона.

Использование красок безвредно для сывороток, не влияет на их титр и срок годности.

Дополнение 3

Внешний контроль качества иммунологических стандартов (сывороток, реагентов, эритроцитов) осуществляет лаборатория контроля качества иммунологических стандартов Республиканской станции переливания крови (РСПК) согласно графику, утвержденным главным врачом РСПК. Внешний контроль качества готовых иммунологических стандартов производится не реже одного раза в 6 месяцев, т.е. не реже двух раз в год. Для проведения внешнего контроля станция переливания крови, производящая иммунологические стандарты, высылает в адрес лаборатории контроля качества иммунологических стандартов РСПК по два комплекта стандартных сывороток: один комплект – со сроком хранения, истекающим в текущем месяце; другой комплект – с полным сроком годности. Таким образом, выборочный внешний контроль осуществляется в начале и в конце срока годности стандартных сывороток.

Комиссия по отбору образцов иммунологических стандартов для направления на внешний контроль создается на станции переливания крови, производящей стандарты, приказом главного врача данной СПК. Председателем комиссии, как правило, назначается руководитель лаборатории производящей иммунологические стандарты; членами комиссии назначаются два или три сотрудника лаборатории - производителя. Для работы в составе комиссии могут привлекаться работники других подразделений.

Отбор проб (комплектов) оформляется актом, который подписывают председатель и члены комиссии. Один экземпляр протокола высылается в адрес РСПК вместе с подлежащими внешнему контролю образцами иммунологических стандартов, второй экземпляр остается на СПК-производителе стандартов.

Внешний контроль качества иммунологических стандартов производится согласно методикам, регламентированным действующими инструкциями.

На образцы иммунологических стандартов, прошедших внешний контроль в лаборатории контроля качества иммунологических стандартов РСПК, выдаются «Заключение о результатах испытаний» и «Протокол испытаний», которые заполняются в двух экземплярах, один из которых остается в контрольной лаборатории, второй высылается в адрес СПК-производителя проконтролированного тест-стандарта.

Результаты исследований стандартных сывороток, присланных СПК-изготовителем, в лаборатории контроля качества иммунологических стандартов РСПК фиксируются в соответствующих графах «Журнала регистрации изготовленной стандартной сыворотки системы АВ0» (форма 30/у), исключая графы 5 и 6.

Иммунологические стандарты, признанные контрольной лабораторией не отвечающими требованиям настоящей инструкции, СПК-производитель официально отзывает у потребителей и проводит расследование причин брака с участием лаборатории качества иммунологических стандартов.

Лаборатория контроля качества иммунологических стандартов РСПК снабжает лаборатории СПК, производящие стандартные сыворотки, соответствующими тест-панелями стандартных сывороток (реагентов) (для внутреннего контрольного типирования своих стандартных сывороток).

Помимо внешнего контроля качества иммунологических стандартов, производимых станциями переливания крови Беларуси, который осуществляется систематически, лаборатория контроля качества иммунологических стандартов РСПК периодически (не реже 1 раза в 2 года) во время плановых проверок производит:

контроль правильности ведения предусмотренной нормативно-технической документации;

контроль правильности выполнения инструкций по приготовлению соответствующих иммунологических стандартов (сывороток, реагентов, эритроцитов);

контроль качества оборудования.

С целью проверки квалификации сотрудников региональных лабораторий, производящих иммунологические стандарты, лаборатория контроля качества иммунологических стандартов РСПК обязана 1 раз в 6 месяцев посылать контрольные образцы сывороток для установления ее активности (титра) и специфичности, а также эритроциты для определения их групповой принадлежности.