

**Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 11. Требования к оказанию медицинских услуг

**ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ДОНОРОВ
КРОВИ И (ИЛИ) ЕЕ КОМПОНЕНТОВ И РЕЦИПИЕНТОВ**

Методические указания
МУ ФМБА России 11. 61 – 2017

Санкт-Петербург
2017

Предисловие

1. Разработано в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

Директор, д.м.н., профессор

А.В. Чечеткин

Заместитель директора по научной работе,

д.м.н., профессор

С.С. Бессмельцев

2. Исполнители

д.б.н., профессор

Н.В. Минеева

к.м.н.

Е.В. Бутина

3. Введение в действие – с момента утверждения.

4. Введено впервые.

Содержание

1.	Область применения	5
2.	Нормативные ссылки	6
3.	Термины, определения, обозначения и сокращения	7
4.	Основные нормативные положения. Общие требования	10
	4.1. Система управления качеством	10
	4.2. Требования к персоналу	11
	4.3. Медицинское оборудование	11
	4.4. Расходные материалы и реактивы	12
5.	Отбор образцов крови для исследования и доставка в лабораторию	12
6.	Алгоритмы иммуногематологических исследований	14
	6.1. Алгоритм исследования крови доноров	15
	6.2. Алгоритм исследования крови реципиентов	20
	6.3. Алгоритм исследований перед трансфузией эритроцитов	26
	6.4. Алгоритм исследований перед трансфузией свежезамороженной плазмы и тромбоцитных концентратов	27
7.	Алгоритм выбора реципиентам совместимых по антигенам эритроцитов доноров	28
8.	Обеспечение качества проведения исследований	28
9.	Методики проведения исследований	31
	9.1. Определение группы крови системы ABO. Интерпретация результатов	31
	9.1.1. Определение группы крови системы ABO с помощью моноклональных антител на плоскости	32
	9.1.2. Определение группы крови системы ABO перекрестным методом на плоскости	33
	9.1.3. Определение группы крови ABO перекрестным способом методом агглютинации в геле	34
	9.2. Определение резус-принадлежности	35
	9.2.1. Определение резус-принадлежности с помощью моноклональных антител на плоскости	35
	9.2.2. Определение резус-принадлежности крови методом агглютинации в геле	36

9.2.3. Определение резус-принадлежности крови непрямым антиглобулиновым тестом методом агглютинации в геле	37
9.2.4. Подтверждающее определение группы крови ABO и резус-принадлежности методом агглютинации в геле	37
9.3. Определение фенотипа антигенов эритроцитов	38
9.3.1. Определение фенотипа антигенов эритроцитов методом на плоскости с моноклональными антителами	38
9.3.2. Исследование фенотипа антигенов эритроцитов методом агглютинации в геле	40
9.4. Скрининг антиэритроцитарных аллоантител	40
9.4.1. Скрининг антиэритроцитарных аллоантител непрямым антиглобулиновым тестом методом агглютинации в геле	40
9.5. Идентификация эритроцитарных аллоантител в непрямом антиглобулиновом тесте методом агглютинации в геле	40
9.6. Проведение иммуногематологических исследований с использованием других технологий	41
9.7. Проведение исследований с помощью автоматических иммуногематологических анализаторов	41
9.8. Пробы на совместимость крови донора и реципиента	41
9.8.1. Проба на плоскости при комнатной температуре	41
9.8.2. Реакция конглоутинации с 10% желатином	42
9.8.3. Проба с 33% полиглюкином	42
9.8.4. Проба на совместимость в непрямом антиглобулиновом тесте методом агглютинации в геле	43
9.9. Исследование эритроцитарных аутоантител	44
9.10. Непрямой антиглобулиновый тест в общепринятой постановке	44
9.11. Посттрансфузионные гемолитические осложнения	46
9.12. Причины ошибок при проведении иммуногематологических исследований	46
9. Требования безопасности	47
Заключение	48
Приложение А	49
Приложение Б	50
Приложение В	51



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя
Федерального медико-
биологического агентства

М.В. Забелин

« 14 » ноября 2017 г.

МУ ФМБА России 11.61 - 2017

**Иммуногематологическое обследование доноров крови и (или) ее компонентов
и реципиентов**

Методические указания

1. Область применения

Методические указания определяют принципы проведения иммуногематологических исследований у доноров и реципиентов компонентов крови.

Настоящие методические указания применяются при:

- определении группы крови системы АВО;
- установлении резус-принадлежности крови;
- исследовании антигенов эритроцитов систем Резус и Келл;
- скрининге и идентификации антиэритроцитарных аллоантител;
- определении аутоантител к эритроцитам;
- подборе совместимых пар донор-реципиент;
- исследовании причин посттрансфузионных гемолитических осложнений.

Настоящий документ разработан с целью обеспечения эффективности и иммунологической безопасности трансфузий крови и ее компонентов.

Документ предназначен для специалистов медицинских организаций, являющихся субъектами обращения донорской крови и ее компонентов. Область применения: служба крови, трансфузиология, клиническая лабораторная диагностика.

2. Нормативные ссылки

В настоящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

Федеральный закон Российской Федерации от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных».

Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 02 апреля 2013 г. № 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов».

Приказ Минздравсоцразвития России от 28 марта 2012 г. № 278н «Об утверждении требований к организациям здравоохранения (структурным подразделениям), осуществляющим заготовку, переработку, хранение и обеспечение безопасности донорской крови и ее компонентов, и перечня оборудования для их оснащения».

ГОСТ Р 52905-2007 Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

ГОСТ Р 53079.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Руководство по управлению качеством в клинико-диагностической лаборатории. Типовая модель.

ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.

ГОСТ Р 53420-2009 Кровь донорская и ее компоненты. Общие требования к обеспечению качества при заготовке, переработке, хранении и использовании донорской крови и ее компонентов.

При пользовании настоящим документом целесообразно проверить действие ссылочных документов на территории России по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

3. Термины, определения, обозначения и сокращения

В настоящем документе применены следующие термины с соответствующими им определениями:

агглютинация эритроцитов – реакция «склеивания» эритроцитов под воздействием антител с образованием видимых клеточных агрегатов;

адсорбция – осаждение на поверхности эритроцитов, имеющих соответствующий антиген, антител из сыворотки;

аллоантитела – антитела (иммуноглобулины), направленные к антигенам клеток крови, отсутствующим у индивида;

аллоиммунизация – процесс образования аллоантител в ответ на антигенную стимуляцию;

аутоантитела – антитела, направленные к собственным структурам клеток крови, адсорбированные на клетках или растворенные в плазме;

база данных донорства крови и ее компонентов - государственная информационная система, содержащая сведения о мероприятиях, связанных с обеспечением безопасности донорской крови и ее компонентов, развитием, организацией и пропагандой донорства крови и ее компонентов, в том числе федеральный регистр доноров.

гемолизины – антитела, вызывающие *in vitro* лизис эритроцитов в присутствии комплемента;

единица крови или ее компонента – количество донорской крови или ее компонента, содержащееся в одном контейнере;

донация – процесс взятия у донора крови или ее компонентов, предназначенных для клинического использования, получения компонентов, производства препаратов либо использования в научно-исследовательских или образовательных целях;

донор – лицо, прошедшее медицинское обследование, допущенное к донации и добровольно сдающее кровь или ее компоненты;

донорская кровь – кровь, взятая от донора и предназначенная для клинического использования, получения компонентов, производства препаратов либо использования в научно-исследовательских или образовательных целях;

идентификация антител – определение специфичности аллоантител;

клинически значимые аллоантитела – антитела, способные стать причиной посттрансфузионного осложнения и/или гемолитической болезни плода и новорожденного;

компоненты крови – клетки крови (эритроциты, тромбоциты, гранулоциты), плазма, взятые от донора или выделенные из донорской крови и предназначенные для клинического

использования, производства препаратов либо использования в научно-исследовательских или образовательных целях;

контроль качества – проверка продукции, процессов, услуг на соответствие установленным требованиям;

моноклональные антитела – антитела, которые продуцируются гибридомными клеточными линиями и используются для приготовления реагентов для определения антигенов клеток крови;

непрямой антиглобулиновый тест – один из методов иммуногематологического обследования, применяемый для выявления антител, находящихся в сыворотке; для определения специфичности антител; для типирования антигенов эритроцитов; определения резус-принадлежности в сложнодиагностируемых случаях; для постановки пробы на совместимость крови донора и реципиента при гемотрансфузиях;

образец крови донора – часть крови, взятой у донора или кандидата в доноры, предназначенная для исследования;

панагглютинация – способность сыворотки агглютинировать все образцы эритроцитов, независимо от их ABO, резус-принадлежности, фенотипа;

плазма – компонент крови, представляющий собой жидкую часть крови, остающуюся после отделения клеточных компонентов;

предтрансфузионный образец крови реципиента – образец крови реципиента, взятый до трансфузии;

посттрансфузионный образец крови реципиента – образец крови реципиента, взятый на следующий день после трансфузии или при возникновении симптомов посттрансфузионного гемолитического осложнения;

резус-принадлежность – дифференцирование крови по наличию в эритроцитах антигена D системы антигенов Резус (Rh);

реципиент – физическое лицо, которому по медицинским показаниям требуется или произведена трансфузия (переливание) донорской крови и (или) ее компонентов;

скрининг аллоантител – исследование наличия или отсутствия антител к антигенам клеток крови в сыворотке;

типирование антигенов – исследование специфичности антигенов клеток крови;

фенотип антигенов эритроцитов – совокупность антигенов эритроцитов индивида с указанием их наличия или отсутствия по результатам исследования;

химера – присутствие в кровеносном русле одновременно двух и более популяций эритроцитов;

холодовые нерегулярные аллоантитела – антитела, не относящиеся к системе ABO, вызывающие агглютинацию эритроцитов *in vitro* при температуре +15 - +25 °C;

штрих-код донации (лабораторного исследования) – цифровое и графическое обозначение, кодирующее информацию об организации Службы крови, в которой проведено взятие компонента крови, годе, порядковом номере донации или лабораторного исследования, группе крови системы ABO, номере контейнера с компонентом крови или пробирки для исследования.

В настоящем документе применены следующие обозначения и сокращения:

ГБН – гемолитическая болезнь новорожденного;

ГОСТ – государственный стандарт;

НПАГТ – непрямой антиглобулиновый тест;

ПАГТ – прямой антиглобулиновый тест;

СЗП – свежезамороженная плазма;

СОП – стандартная операционная процедура;

СПК – станция переливания крови;

УЗ – учреждение здравоохранения;

EDTA– этилендиаминтетрауксусная кислота: стабилизатор крови;

IgG – иммуноглобулины класса G;

IgM – иммуноглобулины класса M;

LISS – раствор низкой ионной силы соли.

ОСНОВНЫЕ НОРМАТИВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Общие требования

4.1. Система управления качеством

В организации (лаборатории), проводящей иммуногематологические исследования, должна быть разработана программа по обеспечению качества исследований. Все производственные операции проводятся в соответствии со Стандартными операционными процедурами, осуществляемыми в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования. СОПы должны редактироваться по мере необходимости. Действующие версии СОПов должны быть доступны исполнителям на рабочих местах.

Система мер по управлению качеством включает в себя:

- требования к исследуемому материалу – правила отбора и маркировки образцов, условий хранения, консервации, транспортировки и выбраковки образцов;
- требования к обеспечению качества исследований: проведение контроля качества используемых реактивов, внутренний и внешний контроль качества исследований;
- требования к порядку и срокам выдачи результатов, ведению отчетной документации, хранению проб, безопасному удалению отходов;
- инструкции по проведению исследований и оценке результатов;
- систему принятия решений при наличии ошибок;
- систему обучения и оценки знаний персонала;
- инструкции по обеспечению и контролю соблюдения требований биологической безопасности с патогенными биологическими агентами III-IV групп.

Для качественного выполнения процессов иммуногематологических исследований, должна вестись следующая документация:

- журнал регистрации иммуногематологических исследований у доноров;
- журнал регистрации иммуногематологических исследований у больных;
- бланки "Результаты исследования в лаборатории" для заключений о проведенных исследованиях;
- журнал регистрации ошибок, анализа причин ошибок и мер по их устранению;
- документы с результатами внешней оценки качества иммуногематологических исследований;
- журнал по технике безопасности;
- журнал по регистрации технического обслуживания и использования оборудования.

4.2. Требования к персоналу

В дополнение к общим требованиям к качеству выполнения лабораторных исследований в здравоохранении, иммуногематологические исследования могут выполняться не только специалистом с высшим образованием (врачом или биологом), но также и специалистом со средним медицинским образованием (медицинским технологом, медицинским лабораторным техником и др.), проводящим первичные исследования.

Подготовка специалистов должна соответствовать Квалификационным требованиям к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки «Здравоохранение и медицинские науки», утвержденным приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 8 октября 2015 года № 707н (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 23 октября 2015 года, регистрационный № 39438).

Квалификация персонала должна быть подтверждена документами установленного образца, а также наличием документов, подтверждающих прохождение специализированных циклов по иммуногематологии, инструктажа или тренингов в соответствии с законодательством Российской Федерации.

4.3. Медицинское оборудование

Используемое оборудование и реактивы должны быть разрешены к применению Министерством здравоохранения Российской Федерации в установленном законодательством порядке.

Подробный перечень оборудования и реактивов приведен в описании методик проведения иммуногематологических исследований, а также в инструкциях, прилагаемых к тест-системам.

Минимальный набор основного и вспомогательного оборудования для выполнения иммуногематологических исследований:

- термостат электрический суховоздушный или водяная баня;
- стерилизатор медицинский воздушный;
- микроскоп бинокулярный;
- центрифуга лабораторная ;
- установка для водоподготовки;
- холодильник фармацевтический (медицинский) (+2 – +6 °C);
- холодильник медицинский (ниже –25 °C);
- автоматический иммуногематологический анализатор для проведения иммуногематологических исследований;

- система полуавтоматического оборудования/набор полуавтоматического оборудования для проведения иммуногематологических исследований в составе центрифуги и инкубатора;
- автоматический дозатор одноканальный переменного объема.

4.4. Расходные материалы и реактивы

Медицинские изделия:

- вакуумные системы для забора крови;
- пробирки вакуумные для получения плазмы и/или сыворотки;
- наконечники к одноканальному дозатору переменного объема;
- пипетка Пастеровская с делениями, нестерильная;
- предметное стекло;
- пробирки одноразовые пластмассовые или стеклянные объемом 2, 5, 10 мл;
- штативы для пробирок;
- планшеты одноразовые для изосерологических исследований;
- перчатки медицинские нестерильные;
- реагенты моноклональные диагностические жидкие для определения антигенов эритроцитов человека;
- панель тест-эритроцитов для определения групп крови системы ABO;
- панель тест-эритроцитов для скрининга аллоантител;
- панель тест-эритроцитов для идентификации аллоантител;
- антиглобулиновая сыворотка для проведения антиглобулинового теста.

Лекарственные средства и химические реактивы:

- раствор желатина 10%;
- изотонический 0,9% раствор хлорида натрия стерильный;
- раствор 33% полиглюкина.

5. Отбор образцов крови для исследования и доставка в лабораторию

Образцы крови доноров и реципиентов отбирают в одноразовые пробирки при соблюдении условий асептики. Забор крови в количестве 5-7 мл производят в специальные закрытые пластиковые пробирки, исключаящие контакт крови с медперсоналом. При необходимости берут две пробы в две пробирки – в одну для получения сыворотки без консерванта, во вторую – с консервантом.

Автоматические методы исследования предполагают использование образцов крови, взятых в пробирки с антикоагулянтом EDTA.

Доноры

1. До донации забор образца крови проводят из пальца или периферической вены донора в вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт EDTA.

2. Во время донации отбор образцов осуществляют непосредственно из системы для взятия крови без нарушения целостности или из специального контейнера-спутника для проб, имеющегося в составе этой системы.

Образец должен быть четко маркирован с использованием штрих-кода, зарегистрирован в учетных документах и базе данных донорства крови и (или) ее компонентов.

Реципиенты

Отбор образцов крови производят из периферической вены пациента в одноразовые вакуумные пробирки в объеме 2-5 мл в пробирку с антикоагулянтom EDTA или без антикоагулянта (в зависимости от используемых методик и аппаратуры):

1. при поступлении в стационар;
2. при направлении на исследование в клинико-диагностическую (иммуногематологическую) лабораторию.

Для проведения проб на совместимость и индивидуального подбора эритроцитсодержащих компонентов крови в условиях лаборатории образцы крови реципиентов заготавливают не ранее чем за 72 часа до трансфузии.

Образец крови должен быть маркирован с указанием фамилии и инициалов пациента, номера медицинской документации, отражающей состояние здоровья реципиента, наименования отделения, даты заготовки образца.

На образец крови, взятый на исследование, выписывают **направление** на проведение иммуногематологических исследований (допускается выписывать одно направление на два образца от одного пациента), в котором должно быть указано:

1. информация об учреждении, направившем образец на исследование;
2. информация, позволяющая однозначно идентифицировать пациента (фамилия и инициалы, отделение, номер истории болезни/ амбулаторной карты, дата рождения (возраст), пол, диагноз);
3. вид исследования (наименования необходимых исследований);
4. дата направления (день, месяц, год);
5. дата и время взятия образца крови (время, день, месяц, год);
6. результаты первичного определения группы крови и резус-принадлежности;
7. трансфузионный и акушерский анамнез;
8. фамилия, инициалы и подпись врача, направившего кровь на исследование;

9. фамилия и инициалы, подпись специалиста, проводившего взятие крови.

Направление в лабораторию для проведения индивидуального подбора эритроцитов должно содержать дополнительно сведения о пациенте: группа крови по системе АВО, резус-принадлежность, фенотип эритроцитов; акушерский и трансфузионный анамнез, наличие предшествующих сенсбилизаций и реакций; количество запрашиваемых единиц эритроцитов; дату запроса; фамилию врача, ответственного за трансфузию, его подпись.

Доставку образцов крови в лабораторию осуществляют в закрытых контейнерах в соответствии с правилами обращения с пробами, потенциально содержащими патологические объекты. Недопустим перегрев (выше 25 °С) или охлаждение (ниже 0 °С) образцов крови. Оптимальные сроки доставки проб в лабораторию – до 90 мин.

В лаборатории должны быть разработаны требования к доставке биоматериала.

Лабораторные исследования образцов крови не проводятся, если:

- отсутствует письменное направление на исследование;
- отсутствует маркировка или пробирка маркирована с ошибкой;
- заполнение направления на исследование не соответствует требованиям;
- объем пробы недостаточен для исследования;
- пробирки с образцами повреждены или закрыты негерметично;
- присутствуют гемолиз, хилез или бактериальное загрязнение пробы;
- отсутствует письменное направление, сделан только устный запрос на проведение исследования.

Хранение и утилизация образцов крови

Образцы крови после проведения лабораторных исследований хранят при температуре +2 – +6 °С в течение 72 часов и утилизируют.

6. Алгоритмы иммуногематологических исследований

Не допускаются процедуры обработки образцов крови до доставки в лабораторию.

Исследования проводят в соответствии со стандартными операционными процедурами, которые должны содержать инструкции по проведению исследования, включающие следующие разделы:

- цель исследования;
- необходимое оборудование и реагенты;
- требования к образцу крови для исследования;
- порядок проведения исследования;
- интерпретация результатов и оформление отчета;

- постановка положительных и отрицательных контролей;
- примечания;
- нормативные ссылки.

6.1. Алгоритм исследования крови доноров

Исследования перед донацией

Перед донацией крови или ее компонентов у донора определяют группу крови системы АВО с помощью моноклональных антител анти-А, анти-В (п.п. 9.1.1).

Исследования после донации в клиничко-диагностической лаборатории

Образец крови донора, полученный во время донации, направляется в клиничко-диагностическую лабораторию, в которой определяют:

- группу крови системы АВО перекрестным методом (любым из методов, описанных в п.п. 9.1.2, 9.1.3, 9.6);
- резус (D)-принадлежность (любым из методов, описанных в п.п. 9.2.1 - 9.2.3, 9.6);
- фенотип эритроцитов (антигены С, с, Е, е, К) (любым из методов, описанных в п.п. 9.3.1, 9.3.2, 9.6);
- наличие эритроцитарных аллоантител (скрининг) (любым из методов, описанных в п.п. 9.4, 9.6);
- специфичность (идентификацию) эритроцитарных аллоантител, выявленных при скрининге, (п.п. 9.5).

В зависимости от имеющегося в лаборатории оборудования могут использоваться автоматические и/или «ручные» методы исследования.

Группа крови АВО

В лаборатории группу крови определяют перекрестным методом, т.е. одновременно по наличию антигенов А и В с использованием анти-В, анти-А моноклональных антител и наличию или отсутствию в сыворотке (плазме) крови анти-А и анти-В антител с тест-эритроцитами А, В, О. Использование тест-эритроцитов группы О обязательно при проведении исследования группы крови на плоскости без подогрева и позволяет исключить неспецифическую реакцию (отрицательный результат свидетельствует об отсутствии неспецифических антител). При исследовании АВО принадлежности на автоматических анализаторах использование эритроцитов О не предусмотрено.

При последующих донациях плазмы, если группа крови АВО донора определена дважды в образцах крови, взятых от разных донаций, каждый раз перекрестным методом, исследования АВО принадлежности допускается проводить с применением только реактивов анти-А, анти-В (п.п. 9.2.4).

Использование анти-AB моноклональных антител при определении группы крови ABO на плоскости проводится при необходимости исключения неспецифической реакции.

В случае расхождения результатов перекрестного определения (наличие IgM аллоантител, выявление экстраагглютининов анти-A₁, а также при ослаблении силы реакции агглютинации при выявлении антигена A) целесообразно использовать дополнительно реактивы другого производителя и реактив анти-A₁, что позволит исключить ошибочное заключение о групповой принадлежности исследуемого образца.

Эритроциты доноров, содержащие антиген A₂, допускается использовать для трансфузий реципиентам группы крови A, а эритроциты A₂B – для трансфузий реципиентам AB.

При наличии у донора экстра агглютининов анти-A₁ допускается использовать только отмытые или криоконсервированные эритроциты.

В каждую серию исследований должны быть включены "положительный" и "отрицательный" контроли: эритроциты A, B и O.

ABO принадлежность и трансфузии тромбоцитов

Трансфузии тромбоцитов предпочтительно проводить с учетом ABO идентичности донора и реципиента, особенно в педиатрической практике. При отсутствии ABO идентичного донора тромбоцитов и использовании тромбоцитов от ABO несовместимых доноров существует опасность лизиса эритроцитов, а также разрушения тромбоцитов реципиента анти-A, анти-B антителами донора. Риск разрушения повышен у детей из-за малого объема циркулирующей крови по сравнению с объемом перелитых тромбоцитов.

При отсутствии ABO идентичных пар донор-реципиент используют тромбоциты доноров в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Подбор тромбоцитов с учетом антигенов ABO

Группа крови реципиента	ABO принадлежность тромбоцитов донора		
	Выбор 1	Выбор 2	Выбор 3
O	O	B	A
A	A	AB	B или O
B	B	AB	A или O
AB	AB	A или B	O

Кровь донора, используемая для получения тромбоцитов при выборе 2 и 3, не должна содержать ABO антител в титре выше, чем 1:64 – 1:128 (в зависимости от метода определения).

Если титр антител превышает это значение, при получении тромбоцитов этих доноров используют технологии замещения плазмы взвешивающим раствором.

Наличие антител к антигенам ABO определяют у доноров тромбоцитов один раз в год (однократно). Необходимо учитывать, что при использовании методов агглютинации в геле титр ABO антител будет на 1-3 ступени выше, чем при определении на плоскости методом прямой агглютинации. Выявление ABO антител допускается проводить в сыворотке/плазме донора, разведенной в 50-60 раз физиологическим раствором, без проведения титрования (антитела должны отсутствовать).

При необходимости определения анти-A, анти-B IgG антител используют методику с унитиолом (Приложение В).

Резус-принадлежность

Резус-принадлежность образца крови определяется наличием или отсутствием на эритроцитах антигена D. При наличии антигена D резус-принадлежность устанавливается как положительная, при отсутствии антигена D – как отрицательная.

Исследование Rh-принадлежности крови доноров проводят в лаборатории. Для проведения исследования используют метод агглютинации на плоскости с применением моноклональных антител (реактив анти-D IgM), метод агглютинации в геле либо другой метод с использованием автоматических иммуногематологических анализаторов (п.п.9.).

Реагенты анти-D, содержащие антитела класса иммуноглобулинов M, не выявляют варианты антигена D (например, D^{VI}). Поэтому все образцы крови доноров, показавшие отрицательный результат с реактивом анти- D IgM, необходимо дополнительно исследовать с реактивом анти-D, содержащим неполные антитела (иммуноглобулины класса G) антиглобулиновым тестом (реакцией Кумбса) в классической постановке или его модификациях. Доноры, имеющие слабый антиген D или D^{VI} фенотип, считаются Rh-положительными.

При использовании реактивов импортного производства необходимо изучить описание свойств реактива анти- D и его способность выявлять варианты антигенов, так как требования к составу реактивов различаются в зависимости от страны производителя, при этом допускается наличие в типизирующем реактиве смеси IgM и IgG анти- D антител. При использовании таких реактивов для исследования у доноров достаточно проводить тестирование резус-принадлежности в один этап.

В каждую серию исследований должны быть включены "положительный" и "отрицательный" контроли: эритроциты D- и D+.

Фенотипирование антигенов эритроцитов

Исследование фенотипа эритроцитов (антигены С, с, Е, е, К) у донора проводят дважды – во время разных донаций желательно разными методами или реактивами разных серий. При отсутствии расхождения в результатах типирования фенотип антигенов считается установленным и при последующих кроводачах и не требует дальнейшего переопределения.

Наличие антигена при описании фенотипа маркируется знаком «+», отсутствие антигена маркируется знаком «-».

В каждую серию исследований должны быть включены "положительный" и "отрицательный" контроли: эритроциты К-, К+, С+, с+, Е+, е+, С-, с-, Е-, е- (или эритроциты фенотипа DCcEeK и DCcEe K-).

Скрининг эритроцитарных аллоантител

Нерегулярные антитела подразделяют на *имеющие и не имеющие клиническое значение*. Под клинически значимыми антителами подразумевают антитела способные *in vivo* вызывать разрушение эритроцитов, имеющих на мембране соответствующий антиген, и с присутствием которых связано укорочение выживания перелитых эритроцитов, возникновение гемолитической болезни новорожденных и посттрансфузионных гемолитических осложнений. Антитела, реагирующие с антигенами в антиглобулиновом тесте, имеют клиническое значение. Этот тест является наиболее эффективным для исследования антител. Для скрининга антител антиглобулиновым тестом целесообразно использовать реактив анти-IgG, а не реактив анти-IgG+C3d, применение которого приводит к выявлению неспецифических антител, не имеющих клинического значения.

Сыворотка или плазма всех доноров исследуется на наличие антител к антигенам эритроцитов независимо от группы крови системы ABO и резус (D)-принадлежности. Скрининг антиэритроцитарных аллоантител у доноров мужчин проводится не реже, чем каждые 6 месяцев, у женщин – через каждые 3 месяца.

Панель тест-эритроцитов должна состоять не менее чем из трех образцов эритроцитов группы крови О с различными фенотипами антигенов. Например, один образец эритроцитов фенотипа ccDEEK-, второй образец CCDeeK-, третий образец ccddeeK+. Эритроциты в панели должны быть типированы по системам антигенов Даффи, Кидд, MNS, по возможности содержать в фенотипе антигены Fy^a , Fy^b , Jk^a , Jk^b , S, s в гомозиготном состоянии. Пулирование тест-эритроцитов не допускается.

В каждую серию исследований должен быть включен контроль: сыворотка, содержащая анти-D антитела низкой активности.

В случае обнаружения при скрининге антител к антигенам эритроцитов, цельная кровь или плазма донора не используется для переливания (допускается приготовление отмытых или размороженных эритроцитов), заготовленная плазма переводится на этом основании в статус «Брак»). В случае неспецифической реакции агглютинации эритроцитов кровь донора для переливания не используется, а заготовленные компоненты переводят в статус «Брак».

Определение специфичности (идентификация) выявленных аллоантител

Для идентификации антител, выявленных первичным скринингом, используют панель эритроцитов, включающую не менее 10 образцов. Панель стандартных эритроцитов должна состоять из такого сочетания фенотипов, которое позволяет определить специфичность антител: моноспецифических и полиспецифических анти-D, -C, -c, -E, -e, , -K, -k, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, S, -s, -M, -Le^a, -P₁.

Выявление анти-D, -C, -c, -E, -e, -K, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, S, -s антител является основанием для отвода от донорства крови и/или ее компонентов, содержащих плазму. Возможно использование для приготовления отмытых или криоконсервированных эритроцитов.

Выявление клинически незначимых антител (прививочные, холодовые к антигенам систем MNS, Левис, P, Лютеран, а также антител с неустановленной специфичностью) является основанием для временного отвода от донаций (не менее, чем на 3 месяца) с указанием необходимости предварительного исследования аллоантител перед сдачей крови и/или ее компонентов. Если антитела у донора не выявляются после проведения двух исследований, донора переводят в группу несенсибилизированных лиц.

Регистрация образцов и результатов исследования

При отсутствии автоматизированных систем каждый поступивший в лабораторию образец и результат его исследования должен быть зарегистрирован в «**Журнале регистрации иммуногематологических исследований**», который должен содержать следующую информацию:

1. лабораторный номер;
2. дата проведения исследования;
3. информация, позволяющая однозначно идентифицировать донора;
4. номер образца;
5. результаты первичного определения группы крови (для первичного донора) или результаты предыдущего определения группы крови, резус-принадлежности, фенотипа антигенов эритроцитов, скрининга антител к антигенам эритроцитов;

6. сведения об использованных реактивах или тест-системах: наименование, серия, срок годности, специфичность реактивов, а также сведения о постановке контролей;

7. протокол иммуногематологических исследований в лаборатории, в котором наличие или отсутствие агглютинации с используемыми реактивами обозначается символами + или -. Характер агглютинации оценивается: от 4+ до +. Сомнительный результат: $\pm$;

8. заключение о групповой и резус-принадлежности крови, исследовании антител и фенотипе, примечания о наличии индивидуальных особенностей исследуемого образца;

9. подпись лица, проводившего исследования.

При использовании в лаборатории автоматизированных информационных систем следует регистрировать результаты тестирования в режиме реального времени в объеме, позволяющем однозначно соотнести полученный результат с исследуемым образцом и условиями проведения исследования (см. пп.1-6, 8-9). В обязательном порядке протоколы исследований установленной формы распечатываются на бумажных носителях и заверяются подписью ответственного лица для обеспечения прослеживаемости процесса.

Результаты иммуногематологических исследований доноров (ответ) оформляют в соответствии с действующими приказами и инструкциями по заготовке крови и компонентов и медицинскому освидетельствованию доноров, вносят в базу данных донорства крови и ее компонентов.

В случае получения расхождений результатов предварительных и подтверждающих исследований, необходимо информирование сотрудников подразделений, осуществляющих работу с донорами и заготовку донорской крови и компонентов, и повторное взятие образца крови донора или исследование заготовленного образца.

6.2 Алгоритм исследования крови реципиентов

При поступлении пациента в организацию клинической трансфузиологии врач клинического отделения проводит первичное определение ABO и резус-принадлежности с помощью моноклональных антител анти-A, анти-B, анти-D IgM или (п.п.9.1.1, 9.2.1) или с применением стандартных гемагглютинирующих сывороток анти-AB, анти-B и анти-A.

Исследования в клинико-диагностической лаборатории

В клинико-диагностической (иммуногематологической) лаборатории исследуется:

Группа крови ABO определяется перекрестным способом (любым из методов, описанных в п.п. 9.1.2, 9.1.3, 9.6) с моноклональными антителами анти-A, анти-B, и стандартными

эритроцитами O, A₁ и B. Исследование ABO принадлежности реципиентов аналогично исследованию доноров.

Любые расхождения должны быть выяснены и разрешены до переливания. Заключение о групповой принадлежности крови делается на основании первичного и повторного исследований. Больные, имеющие экстраагглютинины анти-A₁, не должны получать эритроциты доноров с антигеном A₁. Реципиенту, имеющему антиген A₂ и экстраагглютинины анти-A₁, при необходимости гемотрансфузий переливаются эритроциты, не содержащие в фенотипе антиген A₁:

- реципиенту с группой крови A₂ – отмытые эритроциты группы O,
- реципиенту с группой крови A₂B – отмытые эритроциты O или B группы.

Исследование ABO-принадлежности пациентов, многократно (3 и более раз) госпитализирующихся в одну и ту же организацию клинической трансфузиологии, допускается проводить с применением только реактивов анти-A, анти-B (п.п. 9.2.4).

Резус-принадлежность (любым из методов, описанных в п.п. 9.2.1 – 9.2.3, 9.6), определение проводят с реактивом анти-D IgM, IgG. Тест на наличие вариантов антигена D для реципиентов не проводят, за исключением случаев расхождения в результатах исследования, полученных в разных медицинских учреждениях, а также при исследовании беременных женщин.

При использовании методов агглютинации в геле, результат выявления антигена D с характером агглютинации +2, +1 считается слабоположительным (в зависимости от производителя).

Если резус-принадлежность крови реципиента определить не удастся, больному переливают D-отрицательную кровь, пока резус-принадлежность не будет установлена.

У реципиентов, имеющих слабый антиген D (D^{weak} , D^{partial}), вероятность выработки анти-D мала, однако им проводят трансфузии D-отрицательных эритроцитов (с возможным учетом фенотипа), если:

- возраст реципиента ≤ 18 лет;
- реципиент – женщина в возрасте ≤ 50 лет;
- имеется высокая вероятность повторных трансфузий компонентов крови.

Фенотип антигенов эритроцитов: антигены C, c, E, e, K (и антигены других систем при необходимости) определяют любым из методов, описанных в п.п. 9.3.1 – 9.3.2, 9.6. Порядок проведения исследования аналогичен таковому у доноров.

У пациентов, многократно госпитализирующихся в одну и ту же организацию клинической трансфузиологии для получения повторных курсов терапии, фенотип антигенов эритроцитов систем Резус и Келл исследуется дважды – во время разных госпитализаций. При совпадении результатов фенотип считается установленным и далее не определяется.

Скрининг антиэритроцитарных аллоантител проводят любым из методов, описанных в п.п.9.4, 9.6. Наиболее чувствительным методом исследования является антиглобулиновый тест. Порядок проведения исследования аналогичен таковому у доноров. Исследование антител у реципиентов проводят при каждой госпитализации. При проведении повторных трансфузий в период госпитализации, скрининг антител повторяют каждые 7 дней.

Идентификацию антиэритроцитарных аллоантител проводят в соответствии с п.п. 9.5. Порядок проведения исследования аналогичен таковому у доноров.

Нерегулярные антиэритроцитарные антитела могут быть обнаружены у больного на разных этапах иммуногематологического исследования: перекрестном определении групп крови системы АВО, пробах на совместимость, скрининге антител. В случае выявления у больного антиэритроцитарных антител, должна быть определена их специфичность (идентификация).

При установлении специфичности антител рекомендуется расширенное фенотипирование антигенов эритроцитов лица, в сыворотке которого обнаружены антитела.

Если известно, что реципиент уже имеет или имел антитела, специфичность их должна устанавливаться каждый раз при проведении исследования для исключения антител другой специфичности, которые могли выработаться дополнительно. Для выявления вновь образующихся антител дополнительной специфичности необходимо использовать эритроциты, не содержащие антигенов, к которым направлены ранее идентифицированные антитела. Специфичность антител целесообразно подтверждать с 3-мя антиген-положительными и 3-мя антиген-отрицательными образцами эритроцитов доноров.

Допускается отправлять образцы на идентификацию специфичности антител в другие учреждения здравоохранения.

Регистрация результатов исследования. Каждый поступивший в лабораторию образец и результат его исследования должен быть зарегистрирован в **«Журнале регистрации иммуногематологических исследований»**, который должен содержать следующую информацию:

1. лабораторный номер;

2. дата проведения исследования (для каждого образца);
3. информация, позволяющая однозначно идентифицировать пациента (из направления на исследование);
4. информация о медучреждении / враче-клинисте, направившем на исследование материал;
5. цель исследования;
6. номер образца;
7. результаты первичного определения группы крови и резус-принадлежности;
8. сведения об использованных реактивах или тест-системах: наименование, серия, срок годности, специфичность реактивов, а также сведения о постановке контролей;
9. протокол иммуногематологических исследований, заполненный от руки (в котором наличие или отсутствие агглютинации с используемыми реактивами обозначается символами + или -, характер агглютинации оценивается: от 4+ до +, сомнительный результат: $\pm$); или распечатка исследования автоматическими иммуногематологическими анализаторами с обязательным сохранением процесса определения в компьютере или в информационной системе.
10. заключение о групповой и резус-принадлежности крови, исследовании антител и фенотипе, примечания о наличии индивидуальных особенностей исследуемого образца;
11. подпись лица, проводившего исследования.

Ответ о результатах исследования крови реципиента представляется на бланке учреждения и содержит следующую информацию, вносимую уполномоченным сотрудником лаборатории:

1. информация, позволяющая однозначно идентифицировать пациента;
2. дата направления на исследование;
3. результат исследования;
4. дата проведения исследования (день, месяц и год выдачи результата);
5. фамилия, имя, отчество и подпись ответственного лица.

Отчет о результатах исследования должен содержать сведения о группе крови и резус-принадлежности, фенотипе антигенов эритроцитов, о наличии или отсутствии антител, их специфичности, методе исследования, примечания о наличии индивидуальных особенностей исследуемого образца, рекомендации по выбору гемотрансфузионных сред для трансфузии.

Условия и форма предоставления результата исследования

Бланки результатов исследований пациентов заполняют в тот же день и передают в учреждение или врачу-клиницисту, направившему материал на исследование, для внесения в медицинскую документацию реципиента, отражающую состояние его здоровья.

Лечащий врач записывает данные о группе крови системы ABO и Резус на **лицевую сторону истории болезни** с указанием даты и заверяет личной подписью, а **заключение о подтверждающем определении вклеивают в историю болезни за титульным листом.**

При несовпадении результатов исследования ответ не выдается и специалист, выявивший несовпадение, **незамедлительно** сообщает лечащему врачу (устно и письменно) и совместно с лечащим врачом **повторяют исследование из нового образца крови реципиента, заготовленного и оформленного в присутствии лечащего врача.**

Запрещается переносить данные о группе крови и резус-принадлежности в медицинскую документацию, отражающую состояние здоровья реципиента, из медицинской документации других организаций, где реципиенту ранее проводилось медицинское обследование или была оказана медицинская помощь, в том числе включающая трансфузию крови и ее компонентов.

При выявлении у реципиента антител к антигенам эритроцитов выписывается заключение о наличии у пациента аллосенсибилизации к антигенам эритроцитов. В заключении обязательно указывается, что, в случае необходимости проведения трансфузионной терапии, индивидуальный подбор крови осуществляют с учетом фенотипа антигенов эритроцитов и специфичности антител с использованием антиглобулинового теста. Заключение хранится у пациента и предъявляется при каждой госпитализации.

Если у реципиента однажды были выявлены и идентифицированы клинически значимые антитела к антигенам эритроцитов, такой реципиент, даже если впоследствии антитела перестали выявляться в сыворотке, должен получать компоненты крови, не содержащие антигенов той же специфичности, что и антитела. Все последующие трансфузии больному с выявленными антителами осуществляются с индивидуальным подбором в непрямом антиглобулиновом тесте. Специфичность аллоантител учитывается при подборе доноров.

Индивидуальный подбор эритроцитсодержащих компонентов крови основан на результатах непрямого антиглобулинового теста с сывороткой/плазмой крови реципиента и эритроцитами донора (п.п. 9.7.4). Подбор крови доноров для больных с аллоантителами осуществляют в лаборатории.

Больному проводят индивидуальный подбор крови донора в следующих случаях:

- наличие в анамнезе реакций и осложнений на прежние гемотрансфузии, беременностей, закончившихся рождением детей с желтухой или другими признаками ГБН;

- в сыворотке выявлены эритроцитарные аллоантитела;
- имеются затруднения с определением группы крови;
- результат индивидуальных проб на совместимость положительный или сомнительный;
- предполагается проведение многократных трансфузий в течение длительного периода;
- у новорожденных имеются признаки гемолитической болезни.

Индивидуальный подбор крови проводят с учетом специфичности антител реципиента среди доноров, фенотипированных по антигенам С, с, Е, е, К (Приложение А). При наличии у реципиента антител другой специфичности, например анти- Jk^a , анти- Fy^a и др., требуется проведение дополнительного типирования доноров по этим антигенам. Эритроциты доноров, предназначенные для переливания, не должны иметь антигенов, одноименных антителам реципиента.

При необходимости многократных трансфузий и трансфузий детям, индивидуальный подбор крови проводят с учетом специфичности антител и фенотипа антигенов эритроцитов доноров и реципиентов.

Если специфичность аллоантител не установлена, поиск совместимого донора проводится среди доноров, идентичных/совместимых с реципиентом по фенотипу С, с, Е, е, К, по результатам постановки антиглобулинового теста.

При трансфузиях детям до 4 месяцев индивидуальный подбор эритроцитсодержащих компонентов крови проводят в непрямом антиглобулиновом тесте как с сывороткой/плазмой крови ребенка, так и с сывороткой/плазмой крови матери, если сыворотка/плазма крови матери доступна и АВО совместима. Если мать и ребенок АВО не совместимы, подбор проводят с учетом специфичности антител, выявленных у матери.

Таблица подбора компонентов крови детям до 4 месяцев жизни с ГБН или подозрением на ГБН по системе АВО представлена в Приложении В.

Журнал проведения индивидуальных подборов крови должен содержать следующую информацию:

1. лабораторный номер; нумерация исследований непрерывная в течение календарного года;
2. дата проведения исследования (для каждого образца);
3. информация, позволяющая однозначно идентифицировать реципиента (из направления на исследование);
4. информация о медучреждении / враче-клинисте, направившем на исследование

материал;

5. группа крови, резус-принадлежность, фенотип антигенов эритроцитов, наличие и специфичность антител реципиента;

6. сведения об использованных реактивах или тест-системах: наименование, серия, срок годности, специфичность реактивов;

7. информация об образцах крови доноров: группа крови, резус-принадлежность, фенотип антигенов эритроцитов;

8. протокол иммуногематологических исследований, **заполненный от руки** (наличие или отсутствие агглютинации эритроцитов донора с сывороткой/плазмой реципиента обозначается символами + или -, характер агглютинации оценивается: от 4+ до +, сомнительный результат: $\pm$), **или распечатка** результатов исследования автоматическими иммуногематологическими анализаторами с обязательным сохранением процесса определения в компьютере или в информационной системе;

9. информация о донорах (группа крови, резус-принадлежность, фенотип), кровь которых совместима с реципиентом;

10. подпись лица, проводившего исследования.

Бланки результатов исследований пациентов заполняют в тот же день и передают в учреждение или врачу-клиницисту, направившему материал на исследование, для внесения в историю болезни или в амбулаторную карту. Бланк ответа содержит сведения, указанные в п.п. 2, 3, 5, 9, 10. При необходимости указывают информацию о медучреждении, проводившем исследование

6.3 Алгоритм исследований перед трансфузией эритроцитов

Должны быть выполнены тесты на совместимость крови донора и реципиента. Используемые методы должны выявлять ABO несовместимость и клинически значимые антитела (наиболее чувствительным методом исследования антител является антиглобулиновый тест).

Предтрансфузионные тесты могут быть выполнены как с сывороткой, так и с плазмой больного. Использование не полностью коагулированной крови может исказить результаты исследования. Гемолизированный образец крови должен быть заменен новым образцом, хилезная кровь также не используется (кроме случаев, когда это допускается методикой).

Перед трансфузией компонентов крови врач проводит исследование группы крови системы ABO у донора и реципиента с помощью моноклональных антител анти-А, анти-В и сверяет результаты с записью в истории болезни и с обозначением группы крови донора на контейнере.

Эритроциты донора, которые используют для определения ABO принадлежности или в

тестах на совместимость, получают из сегмента трубки от полимерного контейнера с донорской кровью.

Перед переливанием компонентов крови, содержащих эритроциты, выполняют тесты на индивидуальную совместимость между сывороткой/плазмой реципиента и эритроцитами донора на плоскости при комнатной температуре $+18 - +25^{\circ}\text{C}$ (п.п. 9.8.1) и любым из методов, описанных в п.п. 9.8.2 – 9.8.4.

По окончании трансфузии донорский контейнер с оставшейся кровью и (или) ее компонентами, а также пробирки с кровью реципиента, взятой до и после трансфузии, подлежат обязательному хранению в течение 72 часов при температуре $+2 - +6^{\circ}\text{C}$.

Если проба на совместимость проведена в лаборатории антиглобулиновым тестом с учетом фенотипа антигенов эритроцитов, врач у постели больного проводит только определение АВО-принадлежности крови донора и реципиента и выполняет только одну пробу на индивидуальную совместимость – на плоскости при комнатной температуре.

Экстренные переливания

Врач, проводящий трансфузию эритроцитов в экстренных случаях, должен:

- определить АВО- и резус-принадлежность реципиента с помощью реактивов анти-А, анти-В и анти-D (IgM);
- определить АВО-принадлежность донора с помощью реактивов анти-А и анти-В;
- провести пробы на совместимость.

Если скрининг аллоантител перед экстренной гемотрансфузией не проводился, он должен быть сделан ретроспективно, после переливания на образце крови реципиента, взятом до трансфузии.

6.4 Алгоритм исследований перед трансфузией свежзамороженной плазмы и тромбоцитных концентратов

При переливании свежзамороженной плазмы и тромбоцитных концентратов врач, проводящий трансфузию, обязан определить группу крови реципиента по системе АВО. При трансфузиях тромбоцитов нельзя переливать тромбоциты от D+ доноров девочкам и женщинам детородного возраста, имеющим *rh* отрицательную принадлежность крови (для предотвращения выработки анти-D антител).

Групповую и резус-принадлежность донора врач, проводящий трансфузию (переливание) свежзамороженной плазмы и тромбоцитов, устанавливает по маркировке на контейнере с компонентом крови. Пробы *in vitro* на индивидуальную совместимость не проводятся, проводится только биологическая проба.

При переливании свежемороженой плазмы и тромбоцитов антигены эритроцитов С, с, Е, е, К не учитываются.

7. Алгоритм выбора реципиентам совместимых по антигенам эритроцитов доноров



Рисунок 1 – Алгоритм выбора реципиентам совместимых по антигенам эритроцитов доноров

8. Обеспечение качества проведения исследований

Для обеспечения качества исследований качество каждого из процессов должно постоянно контролироваться выполняющими их сотрудниками.

Внутренний контроль качества включает в себя входящий контроль качества поступающих в лабораторию реактивов, постановку положительных и отрицательных контролей на каждый вид исследований, а также сопоставление результатов исследования образца на всех этапах проведения тестирования, например, результатов исследования группы крови и резус-принадлежности в лаборатории с результатами первичных исследований доноров и реципиентов, указанных в направлении на исследование.

Постановку контролей осуществляют ежедневно на каждое исследование (при единичных исследованиях) или на серию исследований.

Контроль реактивов для мануальных методов исследования

При поступлении реактивов в лабораторию контролируют отсутствие осадка при визуальном осмотре реактивов;

Реактивы для АВО типирования контролируют на:

- наличие агглютинации реагентов анти-А, анти-В с эритроцитами, содержащими А и В антигены: титр антител должен быть не менее 1:64/128; анти-А реактив должен иметь титр антител 1: 32 с эритроцитами A₂, A₂B;
- отсутствие агглютинации реактива анти-А с эритроцитами В и реактива анти-В с эритроцитами А.

Реактивы для типирования антигенов эритроцитов системы Резус и антигена К:

- наличие агглютинации эритроцитов, содержащих D антиген, реактивом анти-D, титр антител не ниже 1:64. Отсутствие агглютинации эритроцитов cde с реактивом анти- D;
- наличие агглютинации эритроцитов, содержащих соответствующий антиген, реактивами анти-С, анти-с, анти-Е, анти-е, анти-К, титр антител не ниже 1:16. Отсутствие агглютинации эритроцитов, не содержащих антигены, соответствующие специфичности антител в реактивах;

Тест-эритроциты контролируют на

- отсутствие осадка, гемолиза;
- наличие агглютинации при взаимодействии с сыворотками, содержащими антитела, соответствующие специфичности антигенов, присутствующих на тест- эритроцитах (например, взаимодействие тест-эритроцитов cde К с антителами анти-с, анти-е, анти-К) и отсутствие агглютинации с антителами, не имеющими специфических антигенов (например, тест-эритроцитов cde К с антителами анти-С, анти-Е, анти-D).

Входящий контроль реактивов, предназначенных для автоматических методов исследования

Контроль качества реактивов для автоматизированных методов исследования может отличаться от контроля реактивов, предназначенных для мануальных методов, проводится в соответствии с инструкцией производителя.

Качество оценивается по характеру агглютинации эритроцитов, содержащих антигены соответствующей специфичности, и должно быть в диапазоне 4+ - 3+; при отсутствии на эритроцитах соответствующих антигенов агглютинация должна отсутствовать (-).

Требования к проведению ежедневных контрольных исследований при определении групповой и резус-принадлежности крови, фенотипировании антигенов эритроцитов и исследовании антител приведены в соответствующих разделах методических указаний.

Контроль работы оборудования

Оборудование, используемое для иммуногематологических исследований (центрифуги, термостаты, холодильники, автоматические анализаторы) должно регулярно подвергаться профилактическому осмотру в соответствии с инструкциями производителей.

Результаты внутреннего контроля качества должны быть зарегистрированы в «Журнале результатов исследования» или в отдельном журнале внутреннего контроля качества. Журнал должен содержать следующую информацию:

1. дата постановки внутреннего контроля качества реактивов;
2. результаты постановки положительных контролей, включая описание выявленных проблем;
3. результаты постановки отрицательных контролей, включая описание выявленных проблем и мер по исправлению выявленных недостатков;
4. подпись специалиста, проводившего исследование контрольных образцов.

Ошибки при проведении исследования регистрируют в **журнале регистрации ошибок (внутренних аудитов)** с указанием сведений:

1. дата проведения внутреннего аудита;
2. причина внутреннего аудита (анализ ошибки исследования, маркировки, расследование по результатам внутреннего контроля или внешней оценки качества, другое);
3. описание проблемы;
4. описание причин выявленных недостатков;
5. список мероприятий для устранения выявленных недостатков;
6. фамилия, имя, отчество лица (лиц), проводивших аудит;
7. фамилия, имя, отчество и должность лица, ответственного за устранение недостатков;
8. заключение о выполнении поручений по исправлению недостатков;
9. дата внесения заключения и подпись ответственного исполнителя.

Внешний контроль качества

Лаборатория, осуществляющая иммуногематологические исследования, должна принимать участие в соответствующих разделах системы внешней оценки качества с периодичностью не менее двух раз в год. Документированные результаты внешней оценки, заключения и рекомендации инспекторов и/или внешних аудиторов, уполномоченных на проведение подобных оценок, а также список мероприятий по устранению выявленных недостатков, фамилия, имя, отчество и должность ответственного за устранение недостатков, заключение о выполнении

поручений по исправлению недостатков, дата и подпись ответственного.

Все документы должны храниться в лаборатории в течение 5 лет. Журналы регистрации результатов исследований хранятся 10 лет.

9. Методики проведения исследований

Перед проведением исследования необходимо изучить инструкцию к наборам реактивов! Порядок проведения исследования должен соответствовать инструкции, учет результата проводится строго в рекомендованном временном интервале.

9.1. Определение группы крови системы АВО. Интерпретация результатов

Оценка результатов исследования группы крови АВО проводится по наличию или отсутствию антигенов А и В на эритроцитах и анти-А, анти-В антител в сыворотке (перекрестный способ) (таблица 2).

Таблица 2 – Оценка результатов взаимодействия исследуемого образца крови с используемыми реактивами

Реактивы			Тест-эритроциты			Исследуемый образец принадлежит к группе крови и содержит антитела
анти-А+В ¹	анти-В	анти-А	О	А	В	
-	-	-	-	+	+	О анти-А, анти-В
+	-	+	-	-	+	А анти-В
+	+	-	-	+	-	В анти-А
+	+	+	-	-	-	АВ антител нет

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

Группа О

Исследуемая кровь принадлежит к группе О: на эритроцитах отсутствуют антигены А и В – реакция с моноклональными антителами анти-А+В, анти-В и анти-А отрицательная. В исследуемой сыворотке присутствуют антитела анти-А и анти-В, так как с тест-эритроцитами А и В наблюдается положительная реакция, а с эритроцитами группы О – реакция отрицательная.

¹ Анти-А+В реактив используется при определении АВО принадлежности изогемагглютинирующими сыворотками крови человека.

Группа крови А

Кровь принадлежит к группе **А**: на эритроцитах присутствует **антиген А** – реакция положительная с антителами анти-А+В, анти-А. Антиген В отсутствует – реакция отрицательная с моноклональными антителами анти-В. **В исследуемой сыворотке присутствуют анти-В антитела**, так как с тест-эритроцитами В наблюдается положительная реакция, а с эритроцитами группы О и А – реакция отрицательная.

Группа В

Кровь принадлежит группе **В**: на эритроцитах присутствует **антиген В** – реакция положительная с антителами анти-А+В, анти-В. Антиген А отсутствует – реакция отрицательная с моноклональными антителами анти-А. **В исследуемой сыворотке присутствуют антитела анти-А**, так как с тест-эритроцитами А наблюдается положительная реакция, а с эритроцитами группы О и В – реакция отрицательная.

Группа АВ

Кровь принадлежит группе **АВ**: на эритроцитах присутствуют антигены А и В – реакция положительная с антителами анти-А+В, анти-А, анти-В. **В исследуемой сыворотке отсутствуют анти-А и анти-В антитела**, так как с тест-эритроцитами А, В и О – реакция отрицательная.

9.1.1. Определение группы крови системы АВО с помощью моноклональных антител на плоскости

Определение группы крови АВО проводится по наличию или отсутствию антигенов А и В на эритроцитах. Исследование выполняется на плоскости (пластине, планшете) при комнатной температуре (18-25 °С) в помещении с хорошим освещением.

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать пластину (написать Ф.И.О. обследуемого лица или штрих-код и специфичность моноклональных антител в порядке их нанесения: анти-А, анти-В).
2. Нанести по одной капле (50 мкл) моноклональных антител соответствующей специфичности.
3. Рядом нанести маленькую каплю (10 мкл) эритроцитов из пробирки с исследуемой кровью.
4. Капли перемешать, покачать пластину.
5. Результат реакции оценить через 5 мин. Положительный результат выражается в агглютинации эритроцитов, видимой невооруженным глазом. При отрицательной реакции капля остается окрашенной равномерно в красный цвет.

Интерпретация результатов

Реакция гемагглютинации в каждой капле может быть положительной или отрицательной.

При положительной реакции обычно в течение первых 10-30 сек от начала перемешивания в смеси появляются видимые невооруженным глазом мелкие агглютинаты (красные комочки), состоящие из склеенных эритроцитов. Мелкие агглютинаты постепенно становятся более крупными или образуют хлопья неправильной формы.

При отрицательной реакции смесь эритроцитов с антителами (5 мин) остается равномерно окрашенной в красный цвет и в ней не обнаруживается никаких агглютинатов. Положительная реакция свидетельствует о наличии в исследуемых эритроцитах антигена, к которому направлены моноклональные антитела.

- При отрицательной реакции с обоими типами реактивов исследуемая кровь принадлежит к группе О.
- При положительной реакции только с реактивом анти-А – к группе А.
- При положительной реакции только с реактивом анти-В – к группе В.
- При положительной реакции с реактивами анти-А и анти-В – к группе АВ.

Контроль специфичности

При положительном результате реакции с обоими реагентами (анти-А, анти-В) необходимо исключить неспецифическую агглютинацию. Для этого на плоскость наносят одну каплю изотонического 0,9% раствора хлорида натрия и маленькую каплю исследуемых эритроцитов - объемное соотношение 5:1. При отсутствии реакции агглютинации делают заключение о принадлежности исследуемого образца к группе АВ.

9.1.2. Определение группы крови системы ABO перекрестным методом на плоскости

Определение группы крови перекрестным способом заключается в одновременном определении антигенов А и В в эритроцитах испытуемой крови при помощи моноклональных антител анти-А, анти-В, а также выявлении в исследуемой сыворотке анти-А, анти-В антител при помощи стандартных эритроцитов О, А и В.

Для исследования используют кровь, заготовленную с консервантом или без консерванта. Определение проводится в помещении с хорошим освещением на пластине или специальном планшете при температуре 18-25 °С.

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать пластину: написать Ф.И.О. обследуемого лица или штрих-код, специфичность моноклональных антител в порядке их нанесения (анти-А, анти-В), специфичность стандартных эритроцитов в порядке их нанесения (О, А, В).
2. Нанести по одной капле (50 мкл) моноклональных антител соответствующей специфичности.
3. Нанести по одной маленькой капле (10-20 мкл) стандартных эритроцитов О, А, В.

4. К эритроцитам добавить по 1-2 капли исследуемой сыворотки (50-100 мкл).
5. Нанести по одной капле (10-20 мкл) исследуемых эритроцитов в каждую каплю моноклональных антител.
6. Капли перемешать, покачать пластину.
7. Оценить результат через 5 мин.

Интерпретация результатов

Положительная реакция с моноклональными антителами свидетельствует о наличии в исследуемых эритроцитах антигена, к которому направлены антитела. Положительная реакция со стандартными эритроцитами говорит о присутствии в сыворотке антител соответствующей специфичности. Заключение о групповой принадлежности крови можно сделать, сопоставив результаты реакции с моноклональными антителами и со стандартными эритроцитами.

Контроль специфичности

При положительном результате реакции с обоими типами моноклональных антител (анти-А, анти-В) необходимо исключить неспецифическую агглютинацию. Для этого на плоскость наносят одну каплю изотонического 0,9% раствора хлорида натрия и маленькую каплю исследуемых эритроцитов.

В капле со стандартными эритроцитами О не должно наблюдаться агглютинации, независимо от АВО принадлежности исследуемой крови.

Для определения **антигена А₁** на плоскость наносят одну каплю (50 мкл) реактива анти-А₁ и маленькую каплю (10 мкл) исследуемых эритроцитов. Перемешивают стеклянной палочкой и наблюдают в течение 5 мин. При выявлении агглютинации делают заключение о наличии сильного антигена А₁, при отсутствии агглютинации – о наличии подгруппы антигена А₂. Если при исследовании сыворотки крови индивида с подгруппой А₂ наблюдается агглютинация со стандартными эритроцитами А – делают заключение о присутствии в исследуемой крови экстраагглютининов анти-А₁.

9.1.3. Определение группы крови АВО перекрестным способом методом агглютинации в геле

Необходимо строго соблюдать инструкцию по применению медицинского оборудования и гелевых карт, утвержденную производителем. Нельзя использовать пластиковые карты с признаками высыхания геля, повреждениями или с истекшим сроком годности. Необходимо использовать растворы для разведения того же производителя, что и карты. Следует вносить реагенты в концентрациях и объемах, предусмотренных инструкцией.

Порядок проведения исследования

1. В промаркированной пробирке приготовить 0,8% взвесь исследуемых эритроцитов для чего смешать в пробирке 10 мкл эритроцитов и 1 мл раствора низкой ионной силы соли (название раствора зависит от фирмы изготовителя используемого оборудования). Выдержать при комнатной температуре 10 мин.
2. На пластиковой карте соответствующей специфичности написать Ф.И.О. обследуемого лица или штрих-код.
3. С микропробирок с гелем снять защитную фольгу и внести по 50 мкл тест-эритроцитов А и В.
4. К тест-эритроцитам добавить 25 мкл исследуемой сыворотки.
5. В пробирки, содержащие моноклональные антитела анти-А, анти-В, внести по 50 мкл взвеси исследуемых эритроцитов.
6. Взвесь исследуемых эритроцитов внести также в контрольную пробирку.
7. Центрифугировать карты в специально предназначенной для них центрифуге с фиксированным временем и количеством оборотов в минуту.
8. Оценить результат реакции. При отрицательном результате эритроциты образуют осадок на дне пробирки. При положительном результате эритроциты располагаются на поверхности геля или в толще геля, характер агглютинации оценивается в диапазоне от 4+ до +. Сомнительный результат оценивается как $\pm$, отрицательный обозначается знаком минус (-).

Контроль специфичности

В контрольной пробирке агглютинация должна отсутствовать (результат отрицательный). Если контроль положительный – определение недостоверно, исследование необходимо повторить после одно-, двукратного отмывания образца эритроцитов изотоническим 0,9% раствором хлорида натрия.

9.2. Определение резус-принадлежности

9.2.1. Определение резус-принадлежности с помощью моноклональных антител на плоскости

Для исследования используют кровь с консервантом или без консерванта. Исследование выполняется на плоскости (пластине, планшете) при комнатной температуре (+18 - +25 °C) в помещении с хорошим освещением. Используют реактивы, содержащие IgM моноклональные антитела.

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать пластину (написать Ф.И.О. обследуемого лица или штрих-код и специфичность моноклональных антител).
2. Нанести по одной капле (50 мкл) моноклональных антител анти-D Супер или анти-D IgM.

3. Рядом нанести маленькую каплю (10 мкл) эритроцитов из пробирки с исследуемой кровью.
4. Капли перемешать, наблюдать за ходом реакции, покачивая пластину.
5. Оценить результат реакции через 3 мин.

Интерпретация результатов

Положительная реакция свидетельствует о наличии в исследуемых эритроцитах антигена D. При отрицательных результатах реакции образцы крови доноров дополнительно исследуют на наличие слабого варианта антигена D с реактивами, содержащими анти-D IgG антитела в антиглобулиновом тесте.

Контроль специфичности

Для контроля специфичности с каждой серией анализируемых образцов крови необходимо проводить контрольные исследования со стандартными D-положительными и D-отрицательными эритроцитами.

9.2.2. Определение резус-принадлежности крови методом агглютинации в геле

Порядок проведения исследования

1. В промаркированной пробирке приготовить 0,8% взвесь исследуемых эритроцитов для чего надо смешать в пробирке 10 мкл эритроцитов и 1 мл раствора низкой ионной силы соли (название раствора зависит от фирмы изготовителя используемого оборудования). Выдержать при комнатной температуре 10 мин.
2. На пластиковой карте соответствующей специфичности написать Ф.И.О. обследуемого лица или штрих-код.
3. С микропробирок с гелем снять защитную фольгу и внести по 50 мкл 0,8% взвеси исследуемых эритроцитов.
4. Взвесь исследуемых эритроцитов внести также в контрольную пробирку.
5. Центрифугировать карты в специально предназначенной для них центрифуге с фиксированным временем и количеством оборотов в минуту.
6. Оценить результат реакции.

Контроль специфичности

Результат реакции в контрольной пробирке должен быть отрицательным. Если контроль положителен – определение недостоверно, исследование необходимо повторить после однократного отмывания образца эритроцитов изотоническим 0,9% раствором хлорида натрия.

Интерпретация результатов

Положительная реакция свидетельствует о наличии в исследуемых эритроцитах антигена D. Если гелевые карты содержат моноклональные антитела IgM, при отрицательных результатах

реакции образцы крови доноров дополнительно исследуют на наличие слабого варианта антигена D с реактивами, содержащими анти-D IgG антитела.

9.2.3. Определение резус-принадлежности крови в непрямом антиглобулиновом тесте методом агглютинации в геле

Порядок проведения исследования

1. В промаркированной пробирке приготовить 0,8% взвесь исследуемых эритроцитов для чего надо смешать в пробирке 10 мкл эритроцитов и 1 мл раствора низкой ионной силы соли (LISS) (название раствора зависит от фирмы изготовителя используемого оборудования). Выдержать при комнатной температуре 10 мин.
2. Промаркировать карту Coombs Anti-IgG (написать Ф.И.О. реципиента и донора или штрих-код). Снять защитную фольгу с карты.
3. Внести 50 мкл 0,8% взвеси исследуемых эритроцитов, приготовленной в растворе низкой ионной силы.
4. Внести 25 мкл реактива анти-D IgG.
5. Инкубировать карту 15 мин при +37 °C.
6. Центрифугировать карты в специально предназначенной для них центрифуге с фиксированным временем и количеством оборотов в минуту.
7. Оценить результат реакции.

Интерпретация результатов

Положительная реакция свидетельствует о наличии в исследуемых эритроцитах антигена D (характер агглютинации в диапазоне 4+– +).

Отрицательная реакция свидетельствует об отсутствии в исследуемых эритроцитах антигена D – резус принадлежность отрицательная.

Характер агглютинации + и ± может наблюдаться при наличии у пациента вариантов антигена D, диагностика которых возможна только при использовании специального набора реактивов.

9.2.4. Подтверждающее определение группы крови ABO и резус-принадлежности методом агглютинации в геле

Необходимо строго соблюдать инструкцию по применению медицинского оборудования и гелевых карт, утвержденную производителем. Нельзя использовать пластиковые карты с признаками высыхания геля, повреждениями или с истекшим сроком годности. Необходимо использовать растворы для разведения того же производителя, что и карты. Следует вносить

реагенты в концентрациях и объемах, предусмотренных инструкцией. Использовать реактивы комнатной температуры.

Порядок проведения исследования

9. В промаркированной пробирке приготовить 5% взвесь исследуемых эритроцитов для чего смешать в пробирке 50 мкл эритроцитов и 1 мл раствора низкой ионной силы соли (название раствора зависит от фирмы изготовителя используемого оборудования). Выдержать при комнатной температуре 10 мин.
10. На пластиковой карте соответствующей специфичности написать Ф.И.О. обследуемого лица или штрих-код.
11. С микропробирок с гелем снять защитную фольгу и внести в соответствующие микропробирки по 10-12,5 мкл взвеси исследуемых эритроцитов.
12. Центрифугировать карты в специально предназначенной для них центрифуге с фиксированным временем и количеством оборотов в минуту.
13. Оценить результат реакции. При отрицательном результате эритроциты образуют осадок на дне пробирки. При положительном результате эритроциты располагаются на поверхности геля или в толще геля, характер агглютинации оценивается в диапазоне от 4+ до +. Сомнительный результат оценивается как $\pm$, отрицательный обозначается знаком минус (-).

Контроль специфичности

В контрольной пробирке агглютинация должна отсутствовать (результат отрицательный). Если контроль положительный – определение недостоверно, исследование необходимо повторить после одно-, двукратного отмывания образца эритроцитов изотоническим 0,9% раствором хлорида натрия.

9.3. Определение фенотипа антигенов эритроцитов

9.3.1. Определение фенотипа антигенов эритроцитов методом на плоскости с моноклональными антителами

Для исследования используют нативную кровь с консервантом или без консерванта. Исследование выполняется на плоскости (пластине, планшете) при комнатной температуре (18-25°C) в помещении с хорошим освещением. Используют реактивы, содержащие IgM моноклональные антитела.

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать пластину (написать Ф.И.О. обследуемого лица или штрих-код и специфичность моноклональных антител в порядке нанесения).

2. Нанести по одной капле (50 мкл) моноклональных антител соответствующей специфичности (анти-С, -с, -Е, -е, -К, при необходимости используют дополнительно антитела другой специфичности, например анти-Јка, -к, -Fya-, - М, -N и др.) На флаконе с реактивами должно быть указание «Супер» или « IgM».
3. Рядом нанести маленькую каплю (10 мкл) эритроцитов из пробирки с исследуемой кровью.
4. Капли перемешать, наблюдать за ходом реакции, покачивая пластину.
5. Оценить результат реакции через 5 мин.

Интерпретация результатов

Положительная реакция свидетельствует о наличии в исследуемых эритроцитах соответствующего антигена. Отрицательная реакция свидетельствует об отсутствии в исследуемых эритроцитах соответствующего антигена.

9.3.2. Исследование фенотипа антигенов эритроцитов методом агглютинации в геле

Порядок проведения исследования

1. В промаркированной пробирке приготовить 0,8% взвесь исследуемых эритроцитов для чего надо смешать в пробирке 10 мкл эритроцитов и 1 мл раствора низкой ионной силы соли (название раствора зависит от фирмы изготовителя используемого оборудования). Выдержать при комнатной температуре 10 мин.
2. На пластиковой карте, содержащей антитела соответствующей специфичности, написать Ф.И.О. обследуемого лица или штрих-код.
3. Снять защитную фольгу с карты. В пробирки с гелем внести по 50мкл 0,8% взвеси исследуемых эритроцитов.
4. Взвесь исследуемых эритроцитов внести также в контрольную пробирку.
5. Центрифугировать карты в специально предназначенной для них центрифуге с фиксированным временем и количеством оборотов в минуту.
6. Оценить результат реакции.

Контроль специфичности

Результат реакции в контрольной пробирке должен быть отрицательным. Если контроль положителен – определение недостоверно, исследование необходимо повторить после однократного отмывания образца эритроцитов изотоническим 0,9% раствором хлорида натрия.

Интерпретация результатов

Положительная реакция свидетельствует о наличии в исследуемых эритроцитах соответствующего антигена. Отрицательная реакция свидетельствует об отсутствии в исследуемых эритроцитах соответствующего антигена.

9.4. Скрининг антиэритроцитарных аллоантител

9.4.1. Скрининг антиэритроцитарных аллоантител в непрямом антиглобулиновом тесте методом агглютинации в геле

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать карту Coombs Anti-IgG, вписав Ф.И.О. или штрих-код обследуемого.
2. Снять защитную фольгу с карты. Внести по 50 мкл тест-эритроцитов I, II, III (или I-IV, в зависимости от тест-системы).
3. Внести 25 мкл сыворотки/плазмы крови реципиента в каждую микропробирку.
4. Инкубировать при 15 мин при +37 °С.
5. Центрифугировать в центрифуге, предназначенной для пластиковых карт.
6. Оценить результат реакции.

Интерпретация результатов

Положительный результат – наличие агглютинации, расценивается как присутствие аллоантител в исследуемой сыворотке/плазме. Отрицательная реакция свидетельствует об отсутствии в исследуемой сыворотке/плазме аллоантител.

9.5. Идентификация эритроцитарных аллоантител в непрямом антиглобулиновом тесте методом агглютинации в геле

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать карту Coombs Anti-IgG, вписав Ф.И.О. или штрих-код обследуемого.
2. Снять защитную фольгу с карты. Внести по 50 мкл тест-эритроцитов I-X (или большее число образцов тест-эритроцитов в зависимости от производителя).
3. Внести во все микропробирки по 25 мкл сыворотки/плазмы крови реципиента.
4. Инкубировать 15 мин при 37 °С.
5. Центрифугировать в центрифуге для пластиковых карт.
6. Оценить результат реакции.

Интерпретация результатов

Положительный результат – наличие агглютинации, расценивается как присутствие аллоантител в исследуемой сыворотке/плазме. Отрицательная реакция свидетельствует об отсутствии в исследуемой сыворотке аллоантител.

Специфичность аллоантител устанавливается при сопоставлении фенотипов тест-эритроцитов, с которыми произошла или не произошла реакция агглютинации, в соответствии с прилагаемой к набору таблицей.

При необходимости подтверждения специфичности антител проводят типирование антигенов эритроцитов индивида на отсутствие антигенов, антитела к которым выявлены.

9.6. Проведение иммуногематологических исследований с использованием других технологий

Определение группы крови ABO и Резус, фенотипирование антигенов эритроцитов, скрининг антител и постановку проб на совместимость возможно проводить с применением других технологий, зарегистрированных в Российской Федерации:

- колоночной агглютинации на стеклянных микросферах в кассетах ORTHO BioVue. Для исследования используется 0,8% и 3% взвесь эритроцитов. Приготовление суспензии эритроцитов производится на растворе натрия хлорида. Время центрифугирования кассет составляет 5 мин.
- метода магнитизации эритроцитов (DIAGAST S.A.S, Франция) на плашках.
- микропланшетного анализа технологией Capture (Immucor, США).

Подробные методики проведения исследования предоставляются производителем.

9.7. Проведение исследований с помощью автоматических иммуногематологических анализаторов

Использование автоматических анализаторов существенно снижает вероятность технических ошибок и ошибок при интерпретации результатов, позволяет документировать и хранить результаты исследования. Лаборатории должны иметь резервные планы действия, предусматривающие мануальное проведение и авторизацию результатов тестирования на случай, когда автоматические системы недоступны.

При использовании иммуногематологических анализаторов для исследований группы крови ABO, резус-принадлежности, фенотипа антигенов эритроцитов, скрининга антиэритроцитарных антител применяют наборы реактивов, рекомендованные производителем. Результаты исследования архивируются в электронном виде и распечатываются в виде бланка.

9.8. Пробы на совместимость крови донора и реципиента

9.8.1. Проба на плоскости при комнатной температуре

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать пластину (написать Ф.И.О. реципиента и донора или штрих-код).
2. Нанести две капли (100 мкл) сыворотки крови реципиента.

3. Нанести одну маленькую каплю (10-20 мкл) эритроцитов донора.
4. Капли перемешать, наблюдать за ходом реакции, покачивая пластину.
5. Результат реакции оценить через пять минут.
6. Для исключения возможной неспецифической агглютинации через 5 мин добавить 2-3 капли изотонического 0,9% раствора хлорида натрия.

Интерпретация результатов

Отсутствие агглютинации свидетельствует, что в сыворотке крови реципиента нет IgM антител к эритроцитам донора: проба совместима. Наличие агглютинации свидетельствует о том, проба несовместима.

9.8.2. Реакция конглоутинации с 10% раствором желатина

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать стеклянную прозрачную пробирку высотой около 10 см (написать Ф.И.О. реципиента и донора или штрих-код).
2. Внести в пробирку одну каплю (50 мкл) эритроцитов донора.
3. Внести в пробирку две капли (100 мкл) 10% раствора желатина, подогретого до разжижения. (Раствор желатина необходимо тщательно просмотреть перед применением. При помутнении или появлении хлопьев желатин не пригоден).
4. Внести две капли (100 мкл) сыворотки реципиента.
5. Слегка встряхнуть пробирку для перемешивания содержимого и поместить на водяную баню при температуре 46-48 °C на 15 мин.
6. Добавить 5-8 мл изотонического 0,9% раствора хлорида натрия.
7. Перемешать путем одно – двукратного перевертывания.
8. Оценить результат реакции по наличию или отсутствию агглютинации.

Интерпретация результатов

Отсутствие агглютинации свидетельствует, что в сыворотке крови реципиента нет антител к эритроцитам донора: проба совместима. Наличие агглютинации свидетельствует о несовместимости крови донора и реципиента.

9.8.3. Проба с 33% раствором полиглюкина

Порядок проведения исследования

1. Промаркировать стеклянную прозрачную пробирку высотой около 10 см (написать Ф.И.О. реципиента и донора или штрих-код).

2. Внести в пробирку одну каплю (50 мкл) эритроцитов донора.
3. Внести две капли (100 мкл) сыворотки реципиента.
4. Внести одну каплю (50 мкл) 33% раствора полиглокина.
5. Встряхнуть пробирку для перемешивания, наклонить и медленно поворачивать по горизонтальной оси так, чтобы содержимое растеклось по стенкам.
6. Через 3-5 мин добавить 3-4 мл изотонического 0,9% раствора хлорида натрия.
7. Перемешать путем одно-двукратного переворачивания.
8. Оценить результат реакции по наличию или отсутствию агглютинации.

Интерпретация результатов

Отсутствие агглютинации свидетельствует, что в сыворотке крови реципиента нет IgG антител к эритроцитам донора и проба совместима. Наличие агглютинации свидетельствует о том, что проба несовместима.

Отсутствие видимой агглютинации в пробе с 33% раствором полиглокина не гарантирует совместимости крови донора и реципиента, т.к. тест обладает низкой чувствительностью (выявляет антиэритроцитарные аллоантитела в титре 1:32 и выше).

9.8.4. Проба на совместимость в непрямом антиглобулиновом тесте методом агглютинации в геле

Порядок проведения исследования

1. В промаркированной пробирке приготовить 0,8% взвесь эритроцитов донора для чего смешать в пробирке 10 мкл эритроцитов и 1 мл раствора низкой ионной силы соли (название раствора зависит от фирмы изготовителя используемого оборудования). Выдержать при комнатной температуре 10 мин.
2. Промаркировать карту Coombs Anti-IgG (написать Ф.И.О. реципиента и донора или штрих-код).
3. Внести 50 мкл 0,8% взвеси эритроцитов донора.
4. Внести в микропробирку 25 мкл сыворотки/плазмы крови реципиента.
5. Инкубировать 15 мин при +37 °C.
6. Центрифугировать в центрифуге для пластиковых карт.
7. Оценить результат реакции.

Интерпретация результатов

Отсутствие агглютинации свидетельствует, что в сыворотке/плазме крови реципиента нет IgG антител к эритроцитам донора, и проба совместима. Наличие агглютинации свидетельствует о том, что проба несовместима.

Проба на совместимость крови донора и реципиента может проводиться с помощью автоматических иммуногематологических анализаторов. Порядок проведения исследования регламентируется инструкциями производителя.

9.9. Исследование эритроцитарных аутоантител

Прямой антиглобулиновый тест методом агглютинации в геле

Порядок проведения исследования

1. В промаркированной пробирке приготовить 0,8% взвесь исследуемых эритроцитов для чего смешать в пробирке 10 мкл исследуемых эритроцитов и 1 мл раствора низкой ионной силы соли (название раствора зависит от фирмы изготовителя используемого оборудования). Выдержать при комнатной температуре 10 мин.
2. Промаркировать карту Coombs Anti-IgG (написать Ф.И.О. или штрих-код).
3. Внести 50 мкл 0,8% взвеси исследуемых эритроцитов в микропробирку.
4. Центрифугировать в центрифуге для пластиковых карт.
5. Оценить результат реакции.

Интерпретация результатов

Положительный результат свидетельствует о присутствии на исследуемых эритроцитах аутоантител. Отрицательный результат свидетельствует об отсутствии аутоантител на исследуемых эритроцитах.

9.10. Непрямой антиглобулиновый тест в общепринятой постановке

Непрямой антиглобулиновый тест используется для различных целей:

- для выявления антител, находящихся в сыворотке;
- для определения специфичности антител;
- для типирования антигенов эритроцитов;
- определения резус-принадлежности в сложнодиагностируемых случаях;
- для постановки пробы на совместимость крови донора и реципиента при гемотрансфузиях.

Ниже приводится описание метода для выявления аллоантител в сыворотке.

Реактивы и оборудование:

- эритроциты для скрининга антител группы крови О фенотипов CDe/CDe K– (образец I); cDE/cDEK– (образец II); cde/cde K+ (образец III);

- стерильный раствор натрия хлорида 0,9 %;
- реактив анти- IgG;
- пробирки, пипетки;
- центрифуга на 1000 об/мин;
- термостат.

Порядок проведения исследования

1. Каждый образец эритроцитов I, II, III отмыть 3-4 раза раствором натрия хлорида 0,9 % центрифугированием по 3 минуты при 1000 об/мин. После последнего отмывания над осадочную жидкость слить и приготовить 10% взвесь эритроцитов в растворе натрия хлорида.
2. Провести сенсibilизацию образцов эритроцитов исследуемой сывороткой, для чего:
 - а) взять три пробирки, промаркировать, добавить в первую пробирку одну каплю 10% взвеси отмытых эритроцитов I, во вторую пробирку – эритроцитов II, в третью пробирку – эритроцитов III. Затем в каждую пробирку добавить по три капли исследуемой сыворотки и перемешать;
 - б) встряхнуть пробирки 1, 2, 3 и инкубировать в термостате 45 минут при температуре 37°C.
 - в) отмыть сенсibilизированные эритроциты стерильным раствором натрия хлорида 4-5 раз центрифугированием по 3 минуты при 1000 об/мин.
 - г) приготовить 5% взвесь всех трех образцов отмытых сенсibilизированных эритроцитов в стерильном растворе натрия хлорида.
3. Постановка реакции:
 - а) в пробирку 4 поместить две капли 5% взвеси отмытых сенсibilизированных эритроцитов I;
 - б) в пробирку 5 поместить две капли 5% взвеси отмытых сенсibilизированных эритроцитов II;
 - в) в пробирку 6 поместить две капли 5% взвеси отмытых сенсibilизированных эритроцитов III;
 - г) в пробирки 4, 5, 6 добавить по две капли реактива анти- IgG. Контроль: 2 капли сенсibilизированных эритроцитов I, II, III + две капли физиологического раствора
 - д) центрифугировать пробирки 4, 5, 6 и пробирки с контролем 1 мин при 1000 об/ мин.
 - е) пробирки встряхнуть и оценить результаты визуально, а при получении отрицательного результата – микроскопировать.

Трактовка результатов:

Наличие агглютинации при визуальном или микроскопическом наблюдении (положительный результат) в пробирках 4, 5 или 6 свидетельствует о присутствии антител в исследуемой сыворотке.

Отсутствие агглютинации (отрицательный результат) – исследуемая сыворотка не содержит антител.

Контроль должен быть отрицательным.

9.11. Посттрансфузионные гемолитические осложнения

Для исследования причин посттрансфузионного осложнения в лабораторию учреждения, откуда была получена или где была заготовлена гемотрансфузионная среда, направляют образцы крови больного, взятые до трансфузии, после трансфузии, и остатки гемотрансфузионной среды в контейнере.

Выполнить следующие исследования:

- визуально оценить окраску сыворотки посттрансфузионного образца на предмет гемолиза;
- провести контроль правильности определения АВО, резус-принадлежности, фенотипа антигенов эритроцитов больного (на образцах, взятых до и после трансфузии) и донора;
- выполнить пробы на совместимость и осуществить скрининг аллоантител методами, которыми пользовались в учреждении здравоохранения, а также методом с применением антиглобулинового теста;
- при обнаружении аллоантител осуществить их идентификацию, при необходимости подтвердить специфичность антител реципиента, провести типирование антигенов эритроцитов других систем;
- провести прямой антиглобулиновый тест на образце крови реципиента, взятом после трансфузии; провести исследование аллоантител в элюате, полученном с эритроцитов реципиента (наиболее информативный тест выявления антигена и антител, ставших причиной посттрансфузионных осложнений);
- при необходимости трансфузий реципиенту выполнить индивидуальный подбор крови донора.

9.12. Причины ошибок при проведении иммуногематологических исследований

Ошибки при проведении иммуногематологических исследований могут быть обусловлены:

- несоблюдением инструкций;
- неправильной маркировкой пробирок с кровью;
- ошибочным порядком нанесения реактивов;
- использованием реактивов с истекшим сроком годности или низкой активностью антител;
- неправильным соотношением моноклональных антител, эритроцитов, сыворотки;
- сокращением времени наблюдения за реакцией;
- недостаточным освещением;

- неприемлемым диапазоном температуры в помещении;
- неправильной интерпретацией результатов исследования;
- исследованием крови с признаками гемолиза.

10. Требования безопасности

Работа в лаборатории осуществляется в соответствии с санитарными правилами противозидемического режима работы с возбудителями III и IV групп патогенности и инструкциями по технике безопасности.

Иммуногематологические исследования проводятся в соответствии с требованиями, предъявляемыми к работе с потенциально инфицированной кровью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методические указания содержат требования, выполнение которых при проведении иммуногематологических исследований доноров и реципиентов обеспечит достоверную диагностику антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител.

Документ содержит описание общих требований к оборудованию и реактивам, включает правила отбора проб и доставки их в лабораторию, условия и сроки использования и хранения образцов. Составлен перечень документации, позволяющей проследить процесс исследования и анализировать возможные расхождения результатов и ошибки при исследовании. Приведены алгоритмы иммуногематологических исследований доноров и реципиентов с описанием конкретных методик, использование которых поможет правильно провести и оценить полученный результат исследования.

Предложен алгоритм выбора реципиентам совместимых эритроцитов доноров в зависимости от присутствия у них антиэритроцитарных антител и количества трансфузий, а также приведена таблица совместимости фенотипов антигенов эритроцитов, которая поможет врачам трансфузиологам в выборе эритроцитов доноров для конкретного больного.

Использование методических указаний в практике работы медицинских учреждений будет способствовать повышению иммунологической безопасности гемотрансфузий.

Таблица А.1 – Подбор совместимых по антигенам эритроцитов пар донор-реципиент

Фено- типы доноров	Фенотипы больных											
	CcDeeK-CcDeeK+	ccddeekK+	ccddeekK-	CcddeeK+	CcDEeK-	CcDEeK+	CCDeeK-	CCDeeK+	ccDEeK-	ccDEeK+	CcddeeK-	ccDeeK-
CcDeeK-	+	+	CD	CD	+	+	c	c	C	C	D	Ce
CcDeeK+	K	+	CDK	CD	K	+	cK	c	CK	C	DK	CeK
ccddeekK-	+	+	+	+	+	+	c	c	+	+	+	e
ccddeekK+	K	+	K	+	K	+	cK	c	K	+	K	eK
CcDEeK-	E	E	CDE	CDE	+	+	cE	cE	C	C	DE	Ce
CcDEeK+	EK	E	CDEK	CDE	K	+	cEK	cE	CK	C	DEK	CeK
CCDeeK-	+	+	CD	CD	+	+	+	+	C	C	D	Ce
CCDeeK+	K	+	CDK	CD	K	+	K	+	CK	C	DK	CeK
ccDEeK-	E	E	DE	DE	+	+	cE	cE	+	+	DE	e
ccDEeK+	EK	E	DEK	DE	K	+	cEK	cE	K	+	DEK	eK
CcddeeK-	+	+	C	C	+	+	c	c	C	C	+	Ce
CcddeeK+	K	+	CK	C	K	+	cK	c	CK	C	K	CeK
ccDeeK-	+	+	D	D	+	+	c	c	+	+	D	e
ccDEEK-	E	E	DE	DE	+	+	cE	cE	+	+	DE	+
CCddeekK-	+	+	C	C	+	+	+	+	C	C	+	Ce
ccDEEK+	EK	E	DEK	DE	K	+	cEK	cE	K	+	DEK	K

Примечания – совместимый фенотип заштрихован серым цветом и отмечен знаком (+);

– несовместимый фенотип с указанием несовместимого антигена (белый фон).

Таблица Б.1– Подбор донорской крови и (или) ее компонентов для трансфузий детям до четырех месяцев жизни при гемолитической болезни новорожденных по системе АВО или подозрении на гемолитическую болезнь новорожденных

N п/п	Мать	Ребенок	Переливаемая среда	
			эритроцитная масса или взвесь	свежезамороженная плазма
1.	O	A	O	A, AB
2.	O	B	O	B, AB
3.	A	B	O	B, AB
4.	B	A	O	A, AB
5.	A	AB	A, O	AB
6.	B	AB	B, O	AB

Выявление иммунных IgG антител после разрушения IgM антител унитиолом***Назначение метода:***

1. Определение IgG антител к антигенам эритроцитов системы ABO проводится при иммуногематологическом обследовании доноров, беременных, новорожденных с признаками гемолитической болезни, а также при исследовании причин гемотрансфузионных осложнений гемолитического типа;
2. Определение специфичности IgG антител к антигенам эритроцитов, выявленных при скрининге антител при наличии у пациента неспецифических IgM антител (бактериальных, лекарственных, прививочных и т.д).

Характеристика метода

Для инактивации IgM используют 5% раствор унитиола (2,3-димеркаптопропансульфонат Na), разрушающий дисульфидные связи в молекулах иммуноглобулинов. Выявление IgG антител проводят после разрушения IgM антител. Метод пригоден для дифференциальной диагностики IgG и IgM антител к антигенам эритроцитов любой специфичности в сыворотке крови человека, молоке, а также моноклональных антителах.

Меры предосторожности

При проведении исследования необходимо надевать одноразовые резиновые перчатки или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Выявление IgG анти-А, анти-В антител

Выявление IgG антител к антигенам эритроцитов системы ABO затруднено из-за одновременно присутствия в сыворотке естественных изогемагглютининов, относящихся к классу IgM. В данном методе иммунные IgG анти-А, анти-В антитела выявляются после полного разрушения унитиолом естественных IgM антител системы антигенов эритроцитов ABO. Выявление IgG анти-А, анти-В затем проводится методом прямой агглютинации с эритроцитами А и В.

Оборудование и реактивы

Оборудование и реактивы

- 5% раствор унитиола (готовая лекарственная форма);
- моноклональные антитела анти-D IgM;
- тест- эритроциты групп крови А, В, а также эритроциты О резус—положительной принадлежности;
- реактив анти- IgG; или карты для агглютинации в геле, содержащие анти- IgG; и карты с нейтральным гелем для постановки контроля.
- раствор натрия хлорида 0,9%;
- термостат лабораторный на +37°C;
- планшеты с белой смачиваемой поверхностью;
- пробирки вместимостью 5–10 мл;
- пипетки;
- штативы;
- палочки аппликаторы;
- часы (секундомер);
- перчатки резиновые хирургические.

Порядок проведения исследования

1. В сухой чистой пробирке смешать равные объемы испытуемой сыворотки и 5% раствора унитиола – опыт.
2. Во второй пробирке смешать равные объемы моноклональных антител анти-D IgM и 5% раствора унитиола – контроль.
3. Все пробы инкубировать 24 часа при комнатной температуре (не ниже 16°C) или в термостате при +37° С.
4. Сыворотки, после обработки раствором унитиола, исследуют с эритроцитами А и/или В в не-
прямом антиглобулиновом тесте в общепринятой постановке и реактивом анти- IgG, или агглю-
тинацией в геле с использованием карт, содержащих анти- IgG реактив.
5. Контроль исследуют с эритроцитами группы крови О резус-положительной принадлежности на
плоскости без подогрева (время наблюдения – 5 мин) или методом агглютинации в геле с исполь-
зованием карт с нейтральным гелем.

Интерпретация результатов

Сыворотки, инкубированные с раствором унитиола и сохранившие способность агглютинировать эритроциты групп А и/ или В, содержат анти-А или анти-В антитела класса IgG — **положительный** результат. Отрицательный результат свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце IgG антител к антигенам эритроцитов, при этом сыворотки, утрачивают способность агглютинировать эритроциты групп А и/или В.

В контрольной пробе результат должен быть всегда отрицательным, что свидетельствует о разрушении антител класса IgM в моноклональных антителах анти-D и эффективности действия унитиола.

Для установления титра IgG антител производят последовательное разведение сывороток, обработанных унитиолом. За титр принимают величину наибольшего разведения, в котором отчетливо видна агглютинация со стандартными эритроцитами А и/или В.

Выявление IgG антител к антигенам эритроцитов после разрушения антител IgM

Определение специфичности и наличия IgG антител к антигенам эритроцитов затрудняется одновременным присутствием в сыворотке неспецифических или аутоантител, относящихся к классу IgM. В данном методе специфические IgG антитела (имеющие клиническое значение) выявляются после полного разрушения IgM антител унитиолом.

Оборудование и реактивы

- 5% раствор унитиола (готовая лекарственная форма);
- моноклональные антитела анти-D IgM;
- тест-эритроциты для скрининга антител, а также эритроциты О резус—положительной принадлежности;
- раствор натрия хлорида 0,9%;
- лабораторный термостат на +37°C;
- планшеты с белой смачиваемой поверхностью;
- пробирки вместимостью 5–10 мл;
- пипетки;
- штативы;
- палочки аппликаторы;
- часы (секундомер);
- перчатки резиновые хирургические.

Порядок проведения исследования

1. В сухой чистой пробирке смешать равные объемы испытуемой сыворотки и 5% раствора унитиола – опыт.

2. Во второй пробирке смешать равные объемы моноклональных антител анти-D IgM и 5% раствора унитиола – контроль.

3. Все пробы инкубировать 24 часа при комнатной температуре (не ниже 16°C) или в термостате при +37° C.

4. Сыворотки, после обработки раствором унитиола, исследуют методом и с эритроцитами, которые использовали для скрининга антител. В контрольной пробе результат должен быть всегда отрицательным, что свидетельствует о разрушении антител класса IgM в моноклональных антителах анти-D и эффективности действия унитиола.

5. Специфичность антител подтверждают при идентификации с расширенной панелью тест-эритроцитов.

Условия хранения и эксплуатации

Срок хранения вскрытой ампулы 5% раствора унитиола (2,3- димеркаптопропансульфоната натрия) не должен превышать 5 дней при хранении в холодильнике (t° +2°–8°C).

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

Примечание: для контроля полного разрушения IgM антител унитиолом используют только анти-D, содержащие IgM и не используют реактивы содержащие смесь анти-D IgM +IgG антител (которые иногда поставляют зарубежные производители).

Список исполнителей

Федеральное медико-биологическое агентство

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»

**Иммуногематологическое обследование доноров крови и (или)
ее компонентов и реципиентов**

Методические указания

МУ ФМБА России 11.61 – 2017

Директор – д.м.н., профессор
Заместитель директора, д.м.н., профессор

А.В. Чечеткин
С.С. Бессмельцев

Исполнители:

д.б.н., профессор
к.м.н.

Н.В. Минеева
Е.В. Бутина