

ДОНЕЦКАЯ НАРОДНАЯ РЕСПУБЛИКА



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

83003, г. Донецк-3, пр-т Ильича, 14-И Тел. (062)312-91-26, E-mail: minzdrav.dnr@mail.ru

от « 04 » 08 2015г.

ПРИКАЗ
г.Донецк

№ 012.1/ 244

Об утверждении Инструкций,
регламентирующих деятельность
учреждений службы крови

Министерства юстиции
Донецкой Народной Республики

ЗАРЕГИСТРИРОВАНО

390

10. 08. 2015
(дата заготовления)

С целью упорядочения регламентации производственной деятельности учреждений службы крови по заготовке, фракционированию донорской крови на ее компоненты, обеспечению контроля стерильности компонентов, а так же условий их заготовки, правильностью определения групповой и резусной принадлежности и переливания компонентов крови,

ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить:
 - 1.1. Инструкцию по фракционированию донорской крови на ее компоненты: плазма, эритроциты, тромбоциты, лейкоциты (прилагается).
 - 1.2. Инструкцию по донорскому плазмоферезу (прилагается).
 - 1.3. Инструкцию по контролю стерильности консервированной крови, ее компонентов, препаратов, плазмозамещающих и консервирующих растворов, условий их заготовки (прилагается).
 - 1.4. Инструкцию по определению групп крови по системе АBO, резус и иммунных антител (прилагается)
 - 1.5. Инструкцию по переливанию крови и ее компонентов (прилагается).
2. Главным врачам республиканских, городских и районных лечебно-профилактических учреждений, станций переливания крови:
 - 2.1. Обеспечить в подведомственных учреждениях внедрение и неуклонное четкое выполнение утвержденных инструкций.
3. Контроль за исполнением приказа возложить на директора департамента организации медицинской помощи населению Министерства здравоохранения Китик Л.И.
4. Контроль за исполнением данного приказа оставляю за собой.
5. Приказ вступает в силу со дня его официального опубликования.

Министр здравоохранения

В.В. Кучковой

**Инструкция
по фракционированию донорской крови на ее компоненты (плазма, эритроциты,
тромбоциты, лейкоциты) и их консервирование**

Общая часть

Фракционирование консервированной крови на компоненты и дифференцированное применение их в лечебной практике позволяет рационально использовать донорскую кровь в лечении больных. Основной клеточный компонент крови – эритроциты по физиологическим, функциональным и лечебным свойствами имеют преимущество над цельной консервированной кровью. Меньший объем эритроцитов вмещает значительно меньше цитрата, продуктов распада клеток, белковых антигенов и антител. Трансфузии эритроцитов занимают ведущее место в гемотерапии, направленной на восполнение дефицита красных клеток в случае острой и хронической анемий различной этиологии. Переливание концентратов тромбоцитов и лейкоцитов является средством терапии тяжелых заболеваний, которые сопровождаются дефицитом этих клеток. Оптимальное и рациональное фракционирование донорской крови на компоненты предусматривает их выделение в максимально возможном количестве и сохранение в функционально полноценном состоянии в течение определенного периода каждый компонент. С помощью фракционирования из дозы консервированной крови - 500 мл, может быть получено около 250 мл нативной плазмы и 250 мл эритроцитов, от $0,65 \times 10^{11}/\text{л}$ до $0,9 \times 10^{11}/\text{л}$ (в среднем $0,7 \times 10^{11}/\text{л}$) тромбоцитов и от $0,8 \times 10^9/\text{л}$ до $1,3 \times 10^9/\text{л}$ (в среднем $1,1 \times 10^9/\text{л}$) лейкоцитов.

1. Требования, предъявляемые к консервированной крови, предназначенной для фракционирования на компоненты

Консервированную донорскую кровь заготавливают в соответствии с действующим законодательством Донецкой Народной Республики.

1.1. При обследовании доноров, кровь которых предназначена для получения концентрата тромбоцитов, особое внимание необходимо обратить на отсутствие у них признаков кровоточивости (петехий, кровоподтеков и т.п.) и исключение приема ими аспирина в течение суток до кроведачи.

1.2. Донорскую кровь заготавливают в полимерные контейнеры на одном из консервантов, применяемых в службе крови.

1.3. Консервированную кровь, которая предназначена для фракционирования, хранят в холодильниках при температуре $+4 \text{ - } +6^\circ\text{C}$ (для последующего выделения плазмы, эритроцитов) или при температуре $+22 \pm 2^\circ\text{C}$ (для выделения тромбоцитов и лейкоцитов) не более 1 суток с момента заготовки крови.

1.4. Консервированная кровь, предназначенная для фракционирования на компоненты, должна отвечать следующим требованиям:

- время хранения крови, предназначенной для выделения тромбоцитов и лейкоцитов, должно быть ограничено 4 - 6 часами после заготовки от донора, для получения эритроцитов - до 7 суток;

- для изготовления антигемофильтральной плазмы или криопреципитата рекомендуется использовать плазму, полученную в стационарных условиях не позднее 2 часов от момента заготовки крови, а при условии использования плазмы, полученной из крови, заготовленной в выездных условиях - от 4 до 6 часов с момента заготовки.

- консервированная кровь, которая хранилась, должна иметь четко выраженную границу раздела между плазмой и клетками крови;

- плазма крови должна быть прозрачной, соломенно-желтого цвета, без муты, хлопьев, прожилок фибринов и признаков гемолиза, глобулярный слой крови должен быть равномерным, без неровностей.

1.5. Фракционирование крови, заготовленной в полимерные контейнеры, может проводиться в небоксированном помещении с соблюдением правил асептики.

2. Фракционирование консервированной крови для заготовки эритроцитов и плазмы

Для получения эритроцитов применяют методы спонтанного оседания (седиментации) эритроцитов или центрифугирование крови.

2.1. Заготовка эритроцитов и плазмы методом спонтанной седиментации крови в полимерных контейнерах

2.1.1. Контейнеры с кровью хранят в холодильнике при температуре +4 + 6° С.

2.1.2. Для заготовки плазмы и эритроцитов полимерный контейнер с осевшими форменными элементами крови осторожно помещают в плазмаэкстрактор этикеткой к задней его пластине, прижимая передней подвижной пластиной, снимают зажим с трубки, который ведет к спаренному пустому контейнеру и переводят в него плазму. Когда граница раздела плазмы и клеток крови оказывается возле входного отверстия главного контейнера, на трубку накладывают зажим на расстоянии 2 - 5 см от контейнера с плазмой. При отсутствии плазмаэкстрактора полимерный контейнер с кровью подвешивают на штативе, пустой контейнер размещают на столе. Ослабив зажим на соединительной трубке, осторожно сжимают рукой нижнюю часть контейнера с кровью и переводят плазму в пустой контейнер. Накладывают зажим на соединительную трубку на расстоянии 2 - 5 см от контейнера с кровью. Контейнеры, содержащие плазму и эритроциты герметизируют с помощью устройства для запаивания ПВХ трубок или другими способами (накладывают металлические кольца, завязывают два тугих узла).

2.1.3. Трубку между участками герметизации разрезают. Контейнер с плазмой отсоединяют, этиктируют, замораживают и хранят в холодильной камере, при соответствующей температуре в зависимости от дальнейшего использования.

2.1.4. Контейнер с эритроцитами этиктируют и хранят в холодильнике при температуре +4+6°C (длительность хранения эритроцитов определяется видом консерванта).

2.2. Заготовка эритроцитов и плазмы методом центрифугирования в полимерные контейнеры.

2.2.1. Проверяют герметичность полимерных контейнеров и соединительных трубок между главным и спаренными контейнерами.

2.2.2. Кровь тщательно перемешивают для равномерного распределения клеток крови в контейнере.

2.2.3. Контейнеры с кровью помещают в центрифужные стаканы, уравновешивают и центрифугируют при центробежном ускорении 1250g в течение 20 минут при температуре +4+6°C (приложение № 1).

2.2.4. Дальнейшее выделение плазмы и эритроцитов, их герметизация, паспортизация проводится согласно п.2.1.2.-2.1.4.

3. Заготовка эритроцитов обедненных лейкоцитами и тромбоцитами (ЭОЛТ)
Трансфузии эритроцитов, обедненных лейкоцитами и тромбоцитами (ЭОЛТ), показаны сенсибилизованным больным, которые имеют лейкоцитарные, тромбоцитарные

антитела, с целью предупреждения негемолитических посттрансфузионных реакций. Получение ЭОЛТ проводится методом центрифугирования и отмывания эритроцитов. Отмывающим раствором является стерильный апирогенный 0,9% раствор натрия хлорида. Заготовку вышеупомянутых компонентов крови осуществляют согласно поданным заявкам лечебных учреждений.

3.1. Получение ЭОЛТ из консервированной крови, заготовленной в полимерные контейнеры.

3.1.1. Для получения ЭОЛТ может быть использована кровь сразу же после заготовки, (параллельно с выделением концентратов тромбоцитов КТ, концентратов лейкоцитов КЛ и плазмы) или кровь от 2 - 7 суток хранения при температуре +4+6° С.

3.1.2. Контейнеры с консервированной кровью, предназначеннной для получения ЭОЛТ, после тщательного перемешивания помещают в центрифужные стаканы, уравновешивают и центрифицируют при центробежном ускорении 2000 г в течение 5мин. (см. приложение 1).

3.1.3. После остановки центрифуги спаренный контейнер с кровью осторожно извлекают из центрифуги и помещают в плазмаэкстрактор, этикеткой повернутой к задней пластине.

3.1.4. Передней подвижной пластиной плазмаэкстрактора нажимают на контейнер с кровью. Ослабляют зажим на соединительной трубке между основным и спаренным пустым контейнерами и переводят плазму в пустой контейнер. Когда над эритроцитами остается слой плазмы высотой 2 - 3 см, (объемом около 40 - 50 мл), на соединительную трубку накладывают зажим на расстоянии 2 - 5 см от основного контейнера.

3.1.5. Плазму, оставшуюся в основном контейнере вместе со слоем эритроцитов высотой 1 - 2 см (общим объемом 30 - 40 мл) переводят во второй пустой дополнительный или присоединенный контейнер.

3.1.6. На соединительную трубку на расстоянии 2 - 5 см от основного контейнера и на таком же расстоянии от спаренного контейнера накладывают зажим герметизируют и разъединяют контейнеры с эритроцитами, плазмой, лейкотромбомассой и лейкоцитами.

3.1.7. Контейнер с плазмой направляют для замораживания или приготовления препаратов плазмы.

3.1.8. Контейнер с лейкотромбомассой направляют на повторное центрифугирование с целью получения КТ и КЛ или утилизируют.

3.1.9. К эритроцитам, что остались в основном контейнере, с помощью одноразовой инфузационной системы, добавляют стерильный 0,9% раствор натрия хлорида в объеме удаленной плазмы и тщательно перемешивают. Трубку, что идет к контейнеру, герметизируют путем завязывания двух тугих узлов или запаивают. Контейнер помещают в центрифужный стакан, уравновешивают и центрифицируют при центробежном ускорении 2000 г в течение 5 мин. при температуре +5±2° С (приложение 1).

3.1.10. После центрифугирования контейнер осторожно переносят в бокс. Конец трубы обрабатывают 5% раствором йода и 96% этиловым спиртом, отсекают герметизирующие узлы, трубку контейнера соединяют стерильно с системой флакона, что остался после отмывающего раствора. С помощью плазмаэкстрактора в этот флакон перемещают надосадочную жидкость вместе со слоем лейкоцитов и эритроцитов высотой (0,5 ±0,2) см (10 - 15 мл). Не нарушая принцип закрытой системы отмывания, присоединяют другой флакон с 0,9% раствором натрия хлорида. Процедуру отмывания повторяют еще дважды, по п.3.1.9.

3.1.11.Отмытые эритроциты паспортизуют и выдают в лечебное учреждение для гемотрансфузии. Срок хранения отмытых эритроцитов 24 часа с момента приготовления. Хранение проводят в холодильнике при температуре +4+6°C.

3.2. Заготовка ЭОЛТ из эритроцитов.

3.2.1.Заготовленные эритроциты хранят в холодильнике при температуре +4+6°C от 2 до 7 суток.

3.2.2. Для приготовления ЭОЛТ используют методику описанную в п.3.1.9.-3.1.10.

3.2.3. Этикирование, хранение проводят согласно п. 2.1.2.-2.1.4.

4. Фракционирование консервированной крови для получения концентрата тромбоцитов (КТ)

Заготовленную в пластиковый контейнер консервированную кровь, предназначенную для выделения КТ, хранят при комнатной температуре $+22\pm2^{\circ}\text{C}$ не дольше 4 - 6 часов с момента заготовки.

4.1. Перед центрифугированием проверяют герметичность контейнера с кровью, а также целостность соединительных трубок между главным и дополнительными контейнерами емкостью 300/300 мл.

4.2. Кровь в контейнерах тщательно перемешивают, уравновешивают, помещают в центрифужные стаканы, центрифугируют при центробежном ускорении 680 g в течение 13 мин (приложение 1), при температуре $+22\pm2^{\circ}\text{C}$. Плазму, обогащенную тромбоцитами (ПОТ), переводят с помощью плазмаэкстрактора в спаренный контейнер без консерванта.

4.3. Контейнер с эритроцитами отсоединяют от спаренного контейнера с плазмой, этикируют и помещают в холодильник при температуре $+4+6^{\circ}\text{ C}$. Срок хранения эритроцитов для переливания - 21 - 35 дней (в зависимости от вида консерванта). Контейнеры с ПОТ центрифугируют при центробежном ускорении 2400 g в течение 20 мин. при температуре (4 + 2) град. С (см. приложение 1). При таком режиме тромбоциты оседают на дно контейнера, а над ними располагается обедненная клетками плазма.

4.4. После остановки центрифуги контейнеры осторожно извлекают из центрифужных стаканов и помещают между пластинами плазмаэкстрактора или подвешивают на штатив в вертикальном положении; дополнительный пустой контейнер располагают на столе.

4.5. Открывают зажим на соединительной трубке между контейнерами. Давлением пластины плазмаэкстрактора на контейнер большую часть плазмы переводят в пустой контейнер. Когда над тромбоцитами остается 50 - 60 мл плазмы, соединительную трубку перекрывают зажимом на расстоянии 2 - 5 см от контейнера с концентратом тромбоцитов (КТ).

4.6. Контейнер с КТ, вынимают из плазмаэкстрактора и, ослабляя зажим на трубке, выдавливают воздух из него в соединительную трубку или контейнер с плазмой (наличие воздуха в контейнере с КТ может привести к их агрегации). Контейнеры герметизируют.

4.7. Контейнер с плазмой после этикирования хранят и используют по назначению (п.2.1.3).

4.8. Контейнер с КТ оставляют без смещивания в спокойном состоянии на 1 час при температуре $+22\pm2^{\circ}\text{C}$. В таком состоянии происходит спонтанная дезагрегация тромбоцитов. Попытка ресусцинировать тромбоциты сразу же после отделения плазмы может привести к необратимой агрегации клеток, вследствие чего тромбоконцентрат окажется непригодным для переливания.

4.9. Через 1 час тромбоциты ресусцинируют осторожным размешиванием в плазме до гомогенной взвеси (не менее 20 минут).

4.10. Контейнер с КТ этикируют (на этикетке указывают название учреждения-заготовителя, объем и количество тромбоцитов (не менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$), дату и время их заготовки, срок хранения, группу крови и резус-фактор донора, регистрационный номер, дату заготовки крови). Для определения объема КТ от веса контейнера с клетками вычитывают массу пустого контейнера, равную ($23,0 \pm 1,0$) г.

5. Фракционирование консервированной крови для получения концентрата лейкоцитов (КЛ)

5.1. Кровь заготавливают в полимерные контейнеры.

5.2. Контейнеры с консервированной кровью, после проверки на герметичность и тщательного перемешивания, помещают в центрифужные стаканы, центрифугируют при центробежном ускорении 2150 g в течение 20 мин. при температуре (22 ± 2) град. С (см. приложение 1). При таком режиме эритроциты оседают на дно контейнера, над ними

располагается лейкоцитарно-тромбоцитарный слой (ЛТС) серо-розового цвета, сверху которого находится обедненная клетками плазма.

5.3. Основной контейнер с кровью, соединенный с пустыми контейнерами, осторожно извлекают из центрифужного стакана, не нарушая границу между слоями, и помещают в плазмаэкстрактор этикеткой к его задней пластине.

5.4. Переводят плазму сразу в спаренный контейнер, который после наполнения плазмой герметизируют, этиктируют и отделяют от основного контейнера. Для выделения ЛТС, на соединительной трубке между основным и первым пустым контейнерами, ослабляют зажим и переводят ЛТС вместе с плазмой, что осталась над слоем эритроцитов объемом $50,0 \pm 5,0$ мл, в пустой контейнер. Объем переведенной плазмы, лейкоцитов, тромбоцитов составляет примерно 110- 120 мл. На соединительную трубку на расстоянии 3 - 5 см от основного контейнера и на таком же расстоянии от контейнера с ЛТС накладывают зажим. Основной контейнер, в котором содержится концентрат эритроцитов (с гематокритным числом 0,80 - 0,90 л/л), отсоединяют и герметизируют, этиктируют и хранят согласно п.2.1.4.

5.5. Контейнер, который содержит ЛТС с плазмой и эритроцитами, помещают в центрифужный стакан в вертикальном положении, уравновешивают и центрифугируют при центробежном ускорении 190 g в течение 10 мин. при температуре ($+22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). В центрифужные стаканы вкладывают твердые пластины-вкладыши, которые сдавливают контейнеры по бокам, для обеспечения постоянной толщины слоя по всей высоте во время центрифугирования и фиксируют их резиновыми кольцами. При таком режиме эритроциты и лейкоциты оседают на дно контейнера, а концентрированные тромбоциты в состоянии взвеси в плазме располагаются над ними.

5.6. После остановки центрифуги контейнер осторожно извлекают и помещают в плазмаэкстрактор в вертикальном положении, присоединяют к нему контейнер 300/300мл без консерванта, который располагают ниже уровня стола. Ослабляют зажим на соединительной трубке, перемещают КТ в контейнер 300/300. Когда у выходного отверстия трубы контейнера появится слой лейкоцитов, накладывают зажимы на расстоянии 2 - 5 см от контейнера. Проводят герметизацию обоих контейнеров и разъединяют их.

5.7.Контейнер, содержащий концентрат лейкоцитов (КЛ) отсоединяют. На этикетке указывают название учреждения-заготовителя и количество лейкоцитов (не менее $0,8 \times 10^9/\text{л}$), дату его заготовки, срок хранения, группу крови и резус-фактор донора, регистрационный номер, дату заготовки крови.

5.8.Контейнер, содержащий концентрат тромбоцитов (КТ), этиктируют согласно п. 4.10.

6. Оценка качества компонентов крови

6.1. Перед тем, как выдать компоненты крови для трансфузии, проводят оценку их качества. Критериями пригодности для плазмы, во время визуального осмотра является: прозрачность плазмы (отсутствие мути, хлопьев, прожилок фибрина), для эритроцитов и ЭОЛТ – прозрачность надстоя, равномерность эритроцитного слоя, отсутствие видимых сгустков; для концентрата тромбоцитов (КТ) и концентрата лейкоцитов (КЛ) – гомогенность взвеси клеток и отсутствие агрегатов; для всех компонентов крови: целостность и герметичность полимерных контейнеров, наличие оформленных этикеток с указанием срока годности.

6.2. Правила и условия хранения компонентов крови.

6.2.1 Хранение КТ, полученного из свежезаготовленной донорской крови в полимерных контейнерах, проводят при комнатной температуре $+22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч или при условии постоянного перемешивания на автоматических мешалках в течение 72 ч при той же температуре. Возможно также хранение КТ в течение 24 ч в холодильнике при температуре $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, особенно в тех случаях, когда условия не дают возможности обеспечить режим комнатной температуры. Вынутый из холодильника полимерный контейнер с КТ может содержать видимые агрегаты тромбоцитов, которые исчезают при температуре $+22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ течение 1 ч в покое и при дальнейшем осторожном

перемешивании. В КТ, полученном из дозы консервированной крови, должно быть не менее $0,5 \times 10^{11}/\text{л}$ тромбоцитов в объеме плазмы не более 75 мл.

6.2.2.Хранение КЛ проводят при температуре $+22 \pm 2^\circ\text{C}$ или в условиях холодильника при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. В КЛ должно быть не менее $0,8 \times 10^9/\text{л}$ клеток в объеме плазмы не более 75 мл. Объем концентрата клеток определяют взвешиванием контейнера с КТ и КЛ, из массы которого вычитают вес пустого контейнера, что составляет в среднем 23 ± 1 г.

6.2.3.Эритроциты, эритроцитную взвесь хранят при температуре $+4 + 6^\circ\text{C}$ в холодильнике в течение срока, определенного рецептурой консерванта и ресуспендирующего растворов для крови и эритроцитов. Срок хранения ЭОЛТ - 24 часа при температуре $+4 + 6^\circ\text{C}$.

6.2.4. Свежезамороженную плазму хранят при температуре от минус 18 до минус 30°C в течение 3 месяцев с момента заготовки, при температуре минус 30°C и ниже на протяжении 36 месяцев.

7. Подготовка компонентов крови к трансфузии

Перед проведением трансфузии компонентов крови врач обязан проверить герметичность контейнеров и провести макроскопию (визуальную оценку) КТ, КЛ и эритроцитов. Трансфузию необходимо проводить, учитывая групповую и резус-принадлежность донора и больного, согласно Инструкции по переливанию крови и ее компонентов. При трансфузии КЛ необходимо учитывать антигенную совместимость донора и больного по системе HLA.

Концентраты тромбоцитов и лейкоцитов необходимо использовать в оптимальный срок - в день заготовки. Таким образом, обеспечивается функциональная полноценность клеток и максимальная лечебная эффективность.

Режимы центрифугирования консервированной крови для получения компонентов крови

Этапы работы	Марки центрифуг	
	PC-6	MPW
1. Центрифугирование крови на эритроциты и плазму (жесткое)	2000g (2600 об/мин) 20 мин, $t+5^\circ\text{C}$	2000g (2600 об/мин) 20 мин, $t+5^\circ\text{C}$
2. Центрифугирование крови на эритроциты и плазму	1250 g (2000 об/мин) 20 мин, $t+5^\circ\text{C}$	1250 g (2000 об/мин) 20мин, $t+5^\circ\text{C}$
3. Отмывание эритроцитов	2000g (2500 об/мин) 5 мин, $t+5^\circ\text{C}$	2000g (2600 об/мин) 5 мин, $t+5^\circ\text{C}$
4. Получение ТК	680g (1500 об/мин)	680g (1600 об/мин)
I – этап	13 мин	13 мин
II – этап	2400g (3000 об/мин) 20 мин	2400g (3000 об/мин) 20 мин
5. Получение ЛК	2150g 2800 об/мин	2150g 2700 об/мин
I- этап	20 мин	20 мин
II - этап	190g 800 об/мин 10 мин	190g 800 об/мин 10 мин

Министр здравоохранения



В.В. Кучковой



УТВЕРЖДЕНО
Приказ Министерства здравоохранения
Донецкой Народной Республики
от 01.08. 2015 № 012.1/244

Инструкция по проведению донорского плазмафереза

Общая часть

Современным эффективным методом заготовки плазмы крови от доноров является плазмаферез. Он предусматривает получения от донора только плазмы с возвратом (реинфузией) собственных форменных элементов. Преимуществом плазмафереза является получение за один сеанс от одного донора значительно большее количество плазмы, чем при обычном взятии крови. Правильное проведение процедуры плазмафереза не вредит здоровью донора. Каждый сеанс плазмафереза контролирует врач, а донор заранее должен быть ознакомлен с особенностями этой процедуры.

В зависимости от частоты получения плазмы, ее объема, а также времени восстановления концентрации белков крови донора, плазмаферез имеет три ступени интенсивности. Первая ступень интенсивности - однократный плазмаферез, предусматривает проведение плазмафереза 1-2 раза в год. Максимальная разовая доза сданной плазмы - не больше 600-800 мл в зависимости от массы тела донора. Вторая ступень интенсивности - многократный плазмаферез – это 1-2 процедуры, при объеме изъятой плазмы 10-15 л в год и третья ступень - при которой плазмаферез проводят 1 раз в неделю, объем изъятой плазмы не должен превышать 12 л в год.

В зависимости от способа проведения, донорский плазмаферез делится на ручной (мануальный) и аппаратный (автоматизированный). При ручном плазмаферезе кровь забирают в пластиковый контейнер и центрифицируют. Его можно проводить однократно и двукратно. Применение двукратного плазмафереза позволяет в течение одной операции получать от специально отобранных доноров вдвое больше плазмы, чем при однократном. Восстановление белков плазмы при этом проходит достаточно быстро, как правило, в течение нескольких дней.

При аппаратном плазмаферезе кровь непрерывным потоком поступает в фракционатор где разделяется на компоненты. Плазму отбирают, а концентрат эритроцитов реинфузируют. При его проведении применяются специальные системы, которые позволяют хранить весь экскорпоральный контур полностью закрытым в течение всей процедуры. Эти системы имеют многозначные индивидуальные номера, по которым можно идентифицировать донора и его форменные элементы.

Получение плазмы методом плазмафереза позволяет получить свежезамороженную плазму, а также плазму, пригодную для изготовления антигемоильных препаратов, гамма-глобулинов, тромбина, альбумина и т.д. Для получения плазмы с высокой концентрацией специфических антител, плазмаферез проводят у доноров, которым проведена соответствующая иммунизация или у реконвалесцентов, перенесших соответствующие инфекционные заболевания с высоким содержанием в плазме иммунных антител.

1. Подбор и обследование доноров

К однократному плазмаферезу допускаются доноры, которые прошли медицинский осмотр в установленном порядке.

1.1 При подборе доноров к многократному плазмаферезу (с интервалом 7-14 суток) учитывают требования настоящей Инструкции и обязательно перед каждой плазмодачей проводят:

- а) определение уровня гемоглобина (для мужчин - в пределах 130-160 г/л, для женщин - 120-140 г/л);
- б) определение показателя гематокрита (0,40-0,48 л/л);
- в) определение общего количества белка крови методом рефрактометрии (не ниже 65,0-85,0 г/л).

1.2 Обследование образцов крови:

- а) полного клинического анализа, который проводится один раз на каждые 5 плазмодач;
- б) подсчет количества тромбоцитов (1 раз на каждые 2 плазмодачи);
- в) подсчет количества ретикулоцитов (1 раз на каждые 5 плазмодач);
- г) функциональных проб печени (содержание билирубина в крови не выше 20,5 мк моль/л; тимоловая пробы - 0-5 ед.; активность аланинамино-трансферазы от 0,1 до 0,68 ммоль/час-л);
- д) иммуноферментного исследования на HBs-антител, наличие антител к HCV и ВИЧ-1/2, сифилис.

1.2.1 Термометрия (допустимые пределы температуры тела $36,6 \pm 0,3$ °C).

1.3 Измерение артериального давления (пограничные значения-110/70-140/90мм рт. ст. с учетом возраста донора).

1.4 Подсчет частоты пульса донора (ритмичный в пределах 60-80 пульсаций в 1 минуту).

1.5 Физикальный осмотр донора терапевтом, и дерматовенерологом, наркологом.

Если интервал между процедурами плазмафереза больше 2-х месяцев, донор обследуется как первичный. Если возраст донора более 40 лет, то 1раз в год ему надо сделать электрокардиограмму.

Доноров плазмы нецелесообразно допускать к кроведаче, потому что это нарушает цикличность плазмаферезов. В то же время, донор крови может быть допущен к процедуре плазмафереза.

В случае проведения аппаратного плазмафереза доза изъятой плазмы зависит от массы тела донора, роста, общего количества белка крови и показателей гематокрита. Ее определяют по соотношениям между показателями, которые приведены в приложении 3 таблиц 1 - 2 - для мужчин; 3 - 4 - для женщин.

К плазмаферезу допускаются доноры всех групп крови.

При проведении мануального плазмафереза делают перерыв на 1 месяц после первых 5-ти процедур с объемом изъятой плазмы до 3 литров. При повторном цикле плазмаферезов (7 процедур) с объемом плазмы 4,5 литров, перерыв увеличивается до 2-х месяцев. При проведении третьего цикла плазмафереза (7-процедур) с объемом изъятой плазмы, как во втором цикле, перерыв увеличивается до 3-х месяцев.

При проведении аппаратного плазмафереза делают перерыв на 1 месяц после первых 5-ти плазмаферезов с объемом изъятой плазмы до 3-х литров. При повторном цикле плазмафереза (6 процедур) с объемом изъятой плазмы 4,5 литра, перерыв увеличивается до 2-х месяцев. При проведении третьего цикла плазмафереза (6 процедур) с объемом изъятой плазмы 4,5 литра, перерыв увеличивается до 3-х месяцев.

2. Контроль за состоянием здоровья донора в процессе плазмафереза

Повторные плазмаферезы следует проводить под наблюдением, которое включает детальный осмотр доноров терапевтом и весь комплекс лабораторных исследований, перечисленный в разделе 1 (кроме протеинограммы, общего анализа крови и мочи, которые проводят после каждого перерыва).

В случае отклонения от нормальных величин любого из перечисленных показателей, донора временно не допускают к плазмаферезу. Возможность оставаться в рядах доноров решает врач-трансфузиолог(терапевт).

3.Организация проведения донорского плазмафереза

Процесс плазмафереза включает взятие крови и реинфузию клеток крови, и требует соблюдения « Инструкции по изготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови».

3.1 Проведение плазмафереза разрешается осуществлять одновременно нескольким донорам одной группы крови и резус – принадлежности, исходя из возможностей помещения и одновременного центрифугирования взятых доз крови.

3.2 Возвращать собственные форменные элементы крови следует последовательно каждому донору данной группы. Пробу на совместимость обязательно проводят перед каждой реинфузией.

3.3 При использовании специальных систем для плазмафереза, которые имеют многозначные индивидуальные номера на соединительных трубках, пробу на совместимость не проводят, а идентификацию донора и его форменных элементов осуществляют по указанным индивидуальным номерам.

3.4 В случае систематического проведения плазмафереза у одних и тех же доноров, целесообразно выделить отдельные дни для каждой группы крови.

4. Методика проведения мануального плазмафереза

У донора берут кровь в пластикатную тару (контейнер), отделяют форменные элементы крови путем центрифугирования и переводят плазму из контейнера с кровью в контейнер-приемник плазмы, отделяют контейнер с форменными элементами, идентифицируют и возвращают донору. Для проведения двукратного плазмафереза после окончания реинфузии первой дозы форменных элементов сразу же приступают к взятию второй дозы крови. В периоды центрифугирования, донору капельно вводят 200,0-250,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида.

Для ускорения реинфузии, в контейнер с форменными элементами разрешается вводить 100,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Процедура плазмафереза должна выполняться путем одной венепункции. Для этого применяют специально изготовленные для проведения плазмафереза одноразовые поливинилхлоридные системы. Весь процесс двукратного плазмафереза, от начала взятия первой дозы крови до окончания реинфузии второй дозы форменных элементов, должен занимать не более 90 минут.

4.1. Порядок взятия крови у донора

Перед началом взятия крови необходимо выяснить у донора его фамилия, имя и отчество, группу крови, резус-принадлежность и сверить их с записями в карте донора и на этикетках контейнера, в который будет производиться забор крови.

Паспортизацию пластиковых контейнеров проводят до начала взятия крови у донора методом нанесения сведений на этикетку (индивидуальный № донора, группа крови, резус-фактор, дата заготовки, вид продукции, срок годности).

Проверяют герметичность пластикового контейнера, срок хранения изделия согласно инструкции завода-изготовителя.

При использовании спаренных контейнеров перевести весь консервирующий раствор в контейнер вместимостью 450-500 мл и наложить зажим на соединительную трубку между контейнерами.

На донорской трубке на расстоянии 15-20 см от контейнера сделать петлю узла и наложить зажим между узлом и иглой. Перенести контейнер на весы или на аппарат для дозированного взятия и смешивания крови с консервирующим раствором, которые располагают на 50-60 см ниже уровня руки донора.

Наложить жгут, обработать кожу локтевого сгиба донора антисептиком.

Снять колпачок с иглы и провести венепункцию, снять зажим с трубки. Кровь, поступающая в контейнер, должна тщательно смешиваться с консервирующим раствором. После взятия дозы крови наложить зажим на трубку ближе к игле, туго затянуть узел на донорской линии системы и отрезать ножницами трубку между узлом и зажимом ближе к узлу. На отрезке трубки, что осталась возле контейнера, завязать еще два узла или герметизировать с использованием ПВХ запаивателя.

Снять зажим с трубки. Наполнить кровью две пробирки, промаркованные перед венепункцией. Одну из них оставить для проведения пробы на совместимость перед реинфузией донору собственных форменных элементов крови, вторую отправить на клинико-биохимические, иммунологические, серологические исследования. На контейнер с кровью наклеить этикетку с данными донора.

После отсоединения контейнера с кровью от вены донора и взятия крови в пробирки необходимо герметизировать донорский конец трубки наложением узла. Жгут снять. Для предупреждения тромбирования крови в трубке, необходимо сразу начать инфузию 200,0 мл 0,9% раствор натрия хлорида.

4.2. Контейнер с кровью, упакованный в полиэтиленовый мешок, помещают в металлический стакан центрифуги. Центрифужные стаканы уравновешиваются на весах.

Для получения плазмы и эритроцитов пластикатные контейнеры с кровью центрифугируют 20 мин. в режиме 2000 г при температуре 10+15° С.

4.3. Отделение донорской плазмы.

После центрифугирования пластикатный контейнер осторожно, чтобы не взболтать кровь, устанавливают между пластинаами плазмаэкстрактора. Снимают зажим между контейнерами. Легким нажимом руки на мешок с отцентрифужованной кровью, заполняют соединительную трубку с плазмой, которая по принципу сообщающихся сосудов, самотеком поступает в контейнер-приемник. Не допускается перевод в плазму форменных элементов крови. При необходимости проводят повторное центрифугирование плазмы и выделяют клетки крови в пустой мешок. Сведения о плазме вписывают в этикетку.

Образец этикетки:

Название Центра (СПК, ОПК, ОТ) заготовки крови _____

Индивидуальный № донора _____

вид плазмы, количество в ____ мл,

группа крови _____,

Дата заготовки плазмы: число _____, месяц _____, год _____

срок хранения плазмы

Подпись врача

Штрих код

Выход плазмы из одной дозы крови, должен составлять не менее 50% заготовленного объема.

4.4. Возврат (реинфузия) донору собственных форменных элементов крови

Реинфузию собственных клеток крови проводят в том же помещении, где осуществлялось взятие крови (СПК, ОПК, ОТ).

Использование индивидуально пронумерованных систем и контейнеров при плазмаферезе позволяет осуществлять идентификацию донора и его форменных элементов крови без проведения проб на совместимость, что сокращает время пребывания донора в центре крови.

4.4.1. Перед началом реинфузии необходимо выполнить следующие действия:

- спросить фамилию у донора и сверить с фамилией, написанной на этикетке контейнера,

- сверить номер марки плазмодачи и групповую принадлежность на этикетке контейнера с номером марки и группой крови на пробирке с кровью донора,
- если все данные совпадают, то необходимо показать донору его контейнер с форменными элементами и получить подтверждение,
- провести пробу на совместимость эритроцитов донора с одногруппной сывороткой.

4.4.2. Проверить этикетку на флаконе с 0,9% раствором натрия хлорида (пригодность к внутривенному введению, дату заготовки или срок годности).

4.4.3. Использовать V-образную систему для переливания крови, присоединив ее к контейнеру с форменными элементами крови, предварительно обработав трубку контейнера 70° этиловым спиртом и с помощью трех зажимов, размещенных на трубках системы, ввести 0,9% раствор натрия хлорида в контейнер в количестве 50% заготовленного объема крови, смешать форменные элементы крови с раствором.

Не разрешается использовать начатый флакон с 0,9% раствором натрия хлорида для другого донора.

4.4.4. При соответствии групповой принадлежности эритроцитов донора и пробы на совместимость, приступить к реинфузии эритроцитов.

4.4.5. Врач, который проводит донорский плазмаферез, заносит в журнал данные о проведении плазмафереза и ставит свою подпись. Во время реинфузии врач постоянно контролирует самочувствие донора. При возникновении реакций, реинфузию форменных элементов крови мгновенно прекращают, выясняют их причину и донору предоставляют медицинскую помощь.

4.4.6. При исполнении двукратного плазмафереза, взятие второй дозы крови начинают после возврата всего объема форменных элементов крови донору.

4.4.7. По завершении процедуры плазмафереза, иглу из вены донора извлекают и накладывают тугую асептическую повязку.

4.4.8. Контейнер с остатками эритроцитов хранят в течение 24 часов в холодильнике при температуре +4+6°C для выяснения причины возникновения реакций осложнений в посттрансфузионный период.

5. Аппаратный плазмаферез

5.1. Аппаратный плазмаферез может выполняться в одном помещении одновременно донорам различных групп крови.

5.2. До начала плазмафереза необходимо проверить соответствие фамилии и номера карты лица, которому проводят плазмаферез. Перед каждым плазмаферезом донора взвешивают. Лицу, масса тела которого меньше 50,0 кг, согласно рекомендациям ВОЗ, отказывают в донорстве. При уменьшении массы тела донора в течение двух месяцев более 4,5 кг, его должен осмотреть врач.

Получения плазмы современными аппаратами осуществляют согласно инструкции завода-изготовителя.

5.3. Подготовка оборудования:

В большинстве аппаратов плазмособирающая система работает по стандартным параметрам. Скорость взятия крови у донора не должна превышать 70,0 мл/мин. (при необходимости она может быть снижена, но не ниже 60,0 мл/мин.). Эти же параметры определяют скорость реинфузии компонентов крови. Скорость центрифugирования в аппарате является неизменным параметром (компьютерная программа).

5.4. Процесс подготовки аппарата к плазмаферезу включает ряд этапов:

- Сепаратор, соединительные трубы и иглы проверить на проходимость и герметичность,
- установить сепаратор в центрифугу,
- асептически присоединить к нему соединительные трубы и пакет для плазмы.
- зафиксировать сепаратор,
- установить фильтровальную камеру,
- заполнить систему антикоагулянтом,

- вставить трубку в помпу для антикоагулянта,
- вставить трубку в насос для крови,
- включить помпу подачи антикоагулянта и взятия крови и заполнить ими соответствующие системы.

5.5. Перед проведением венепункции медицинская сестра должна:

- проверить идентичность номера на контейнерах для плазмы и емкостях для образцов крови, правильность записи назначенной дозы взятия плазмы.
- подвесить контейнер к весам взвешивания плазмы и запрограммировать аппарат на своевременное прекращение процедуры, руководствуясь записью врача в донорской карте.

5.6. Порядок проведения венепункции:

- записать марку и номер аппарата в карту донора,
- провести венепункцию с соблюдением правил асептики и антисептики,
- взять образец цельной крови для исследования,
- присоединить иглу к системе, соблюдая правила асептики, начать взятие крови, нажав кнопку «Пуск».

5.7. Окончание плазмафереза:

5.7.1. После взятия определенной дозы плазмы, процедура автоматически заканчивается.

5.7.2. Отметить количество взятой плазмы в карте донора.

5.7.3. В случае несоответствия конечного веса плазмы, (более чем на 5,0 г или менее чем на 20,0 г, изменение веса полученной плазмы указать в графе «Комментарии» карты донора.

5.7.4. В случае отклонения аппарата от программы, необходимо записать номер аппарата, причину отклонения, какие меры проведены (например, дополнительная калибровка), в соответствующую форму, которая ведется для каждого аппарата отдельно.

5.7.5. Если причина отклонений не установлена, перед дальнейшим использованием аппарата необходимо убедиться в правильной калибровке его весов, используя стандартные весы. Записать результаты в соответствующую форму.

5.7.6. Кровь, что осталась в системе трубок, вернуть донору.

После этого отсоединить систему от донора по такой схеме: удалить пластырь, фиксирующий иглу; наложить стерильный ватный тампон на место венепункции; удалить иглу; прижать стерильный тампон, наложить повязку на руку донора; иглу поместить в контейнер для обеззараживания. Донор должен оставаться в кресле в течение 5-10 минут для предупреждения возможного развития трансфузионных реакций.

5.7.7. Для взятия 2-х образцов плазмы необходимо: снять колпачок с трубки пакета с плазмой, удалить воздух из пакета через открытое отверстие трубки; закрыть отверстие этой трубки; заполнить трубку плазмой; промаркировать все образцы наклейками с контрольными номерами, убедиться, что все они имеют тот же номер, что и пакет с плазмой (длина трубки каждого образца должна быть 25-30 см).

5.7.8. Конечный объем собранной плазмы записать на пакете, в карте донора и операционном журнале, переводя единицы веса (г) в единицы объема (мл). Плазма должна быть заморожена в кратчайший срок, не позже 4-х часов с момента заготовки.

5.7.9. Если во время проведения плазмафереза по каким-либо причинам донор потерял 500,0 мл цельной крови или 250,0 мл эритроцитов, необходимо освободить его от плазмадачи на 2 месяца. В карте донора сделать запись о дате возобновления взятия плазмы и причине изменения сроков. Повторный плазмаферез проводят после оценки клинико-биохимических показателей крови донора.

6. Бактериологический контроль плазмы

Бактериологический контроль плазмы проводят согласно « Инструкции по контролю стерильности консервированной крови, ее компонентов, препаратов, кровезаменителей, консервирующих растворов».

7. Эксплуатация и обслуживание аппарата для проведения плазмафереза

7.1. Информацию о нарушениях в работе аппарата необходимо заносить в соответствующий журнал.

7.2. Проверку и калибровку аппаратов должен проводить квалифицированный инженерно – технический персонал в соответствии инструкции фирмы производителя.

7.3. Обслуживание и ежегодная профилактика аппаратов проводится квалифицированным техническим персоналом в соответствии с планом регламентированных работ и требований инструкции фирмы производителя. Данные обслуживания фиксируют в соответствующем журнале.

7.4. Если кровь или плазма попали на одну из частей аппарата (помпу, детекторы воздуха, монитор, замок центрифуги), необходимо остановить процедуру плазмафереза, нажав кнопку «Стоп» и выключить аппарат от энергосети; отсоединить донора, если кровь или плазма вытекают в результате нарушения герметичности в одной из частей системы (магистральная трубка, антикоагулянтная система, сепаратор, пакеты для плазмы).

Возврат донору клеток крови в этих случаях недопустим, в связи с возможным их бактериальным или другим загрязнением. Процедура плазмафереза может быть продолжена на другом аппарате.

7.5. При очищении и мытье аппарата необходимо придерживаться инструкции фирмы изготовителя. Открыть заднюю панель аппарата и убедиться в отсутствии вытекания жидкости во внутренней его части. Если жидкость не выявлена, аппарат может использоваться для плазмафереза, если выявлена, то необходимо провести очищение всех доступных частей. Дальнейшую работу по проверке и очищению аппарата, должен провести технический персонал. Все выявленные недостатки аппарата следует задокументировать в журнале.

8. Мероприятия по оказанию неотложной медицинской помощи донорам

Все случаи реакций у доноров должны быть занесены в раздел «Комментарии» карты донора.

Набор медикаментов и расходных материалов и проведение неотложной терапии при реакциях и осложнениях:

8. Острая сосудистая недостаточность.

8.1. Потеря сознания.

Необходимые средства:

- нашатырный спирт;
- кислород;
- кофеин 2,0 мл;

Мероприятия:

- приведение донора в положение Тренделенбурга (голова ниже ног);
- нашатырный спирт поднести к носу донора на ватном тампоне;
- ингаляция увлажненного кислорода;
- кофеин 2,0 мл внутримышечно.

8.2. Колапс

Необходимые средства:

- кофеин 2,0 мл;
- мезатон 1,0 мл;
- 0,9 % раствор хлористого натрия 200,0 мл;
- преднизолон 90,0 мг;

Мероприятия:

- приведение донора в положение Тренделенбурга;
- ингаляция увлажненного кислорода;
- преднизолон 90,0 мг внутривенно;
- кофеин 1,0 – 2,0 мл внутривенно.

При отсутствии эффекта, внутривенно – 0,5 мл мезатона в 10,0 мл 0,9% раствора хлористого натрия.

8.3. Стенокардия напряжения

Необходимые средства:

- анальгин 50%
- димедрол 1%;
- платифилин 2,5%;
- преднизолон 90,0 мг;
- реополиглюкин 400,0 мл;
- нитросорбит.

Мероприятия:

- нитросорбит под язык;
- ингаляция увлажненного кислорода.

При отсутствии эффекта, внутримышечно 2,0 мл анальгина, 1,0 мл димедрола, 2,0 мл платифилина.

При развитии кардиогенного шока внутривенно- 90,0мг преднизолона и 0,5 мл мезатона, инфузия реополиглюкина.

8.4. Острая сердечная недостаточность

Симптомы: отдышка, холодный пот, бледность, тахикардия (брадикардия), гипотензия. Острая боль в области грудной клетки может быть симптомом коронарной недостаточности, инфаркта или эмболии легочной артерии.

Мероприятия:

- остановить процедуру плазмафереза (в зависимости от состояния донора возвратить ему клетки крови);
- перевести донора в полусидячее положение наладить вдыхание кислорода в количестве 3 литра в минуту;
- вызвать специализированную кардиологическую бригаду скорой медицинской помощи;
- при выявлении признаков у донора воздушной эмболии перевести его в положение Тренделенбурга и дать кислород;
- провести детальное описание состояния и оказания медицинской помощи в карте донора.

8.5. Пирогенные реакции.

Симптомы:

- трепет, лихорадка, отдышка, ощущение страха.

Мероприятия:

- остановить процедуру плазмафереза;
- перевести донора в полусидячее положение, накрыть одеялом;
- при повышении температуры провести десенсибилизирующую терапию(10% раствор хлористого кальция, 1% раствор димедрола);
- при необходимости наладить дыхание кислорода в количестве 3 л в минуту;
- через каждые 15 минут измерять следующие показатели: температуру тела, пульс, артериальное давление до полной стабилизации состояния;
- при отсутствии эффекта, госпитализировать донора в лечебное учреждение;
- сохранять флаконы с раствором, которые вызвали реакцию не меньше 72 часов;
- детально описать реакцию и оказание медицинской помощи в карте донора.

8.6. Анафилактический шок.

Необходимые средства:

- преднизолон для внутривенного введения 90,0мл;
- мезатон 1,0 мл;

- димедрол 1%;
- препарат высокомолекулярного декстрану или оксиэтиленового крахмала (пулифер);
- 0,9 раствор хлористого натрия 200,0 мл.

Мероприятия:

- ингаляция увлажненного кислорода;
- преднизолон 90 мл внутривенно;
- мезатон 0,5 мл внутривенно;
- диметрол 2,0 мл в 0,9% растворе хлористого натрия (10 мл). При отсутствии эффекта, проводится инфузия препарата высокомолекулярного декстрана или оксиэтиленового крахмала.

8.7. Клиническая смерть (остановка сердечной деятельности).

Необходимые средства:

- адреналин 0,1% - 1,0 мл;
- атропин 0,1 % - 1,0 мл;
- 0,9% раствор хлорида натрия 200,0 мл.

Мероприятия:

При остановке сердца донора необходимо уложить на ровную твердую поверхность, зафиксировать время, провести механическую дефибриляцию сердца (короткий резкий удар ребром ладони или кулаком по грудине), при отсутствии эффекта зафиксировать язык языодержателем, ввести дыхательную трубку; начать искусственное дыхание (рот в рот), одновременно проводить закрытый массаж сердца. При отсутствии эффекта проведенных реанимационных мероприятий провести электродефибриляцию сердца током от 3 до 5,5 кв, внутрисердечно ввести: 1,0 мл адреналина, 1,0 мл атропина, 5,0 мл 10% раствора кальция хлорида. На голову донора положить лед или полотенце смоченное холодной водой.

При каких либо осложнениях одновременно с оказанием неотложной медицинской помощи необходимо вызвать специализированную бригаду скорой медицинской помощи.

Перечень оснащения, необходимого для оказания неотложной медицинской помощи.

1. Ручной дыхательный аппарат типа АДР-1 или дп-10- 2 шт. или «Амбу».
2. Языодержатель – 2 шт.
3. Дыхательная трубка – 2 шт.
4. Шприцы разового использования – на 10,0 мл – 10 шт., на 5,0 мл – 10 шт.
5. Иголки одноразового использования для внутривенных и внутримышечных инъекций – 20 шт.
6. Иголки для внутрисердечных инъекций – 2 шт.
7. Ватные тампоны – 10 шт.
8. Спирт этиловый 70° - 50,0 мл.
9. Системы для внутривенного введения инфузионных растворов – 5 штук.
10. Дефибриллятор – 1 шт.

Приложение 1

Режимы центрифугирования консервированной крови заготовленной в пластикатный контейнер при проведении мануального плазмафереза

Режим фракционирования	Марки центрифуг	
	PC-6	MPW
Разделение крови на эритроциты и плазму	2000 g 20 мин, t+15°C	2000 g 20мин, t+15°C

Приложение 2

Оборудование, аппаратура, расходный материал необходимые для проведения ручного (мануального) плазмафереза

1. Рефрижераторная центрифуга (емкость стаканов 0,75-1,0л).
2. Запаиватель ПВХ – трубок или металлические кольца и зажимное устройство.
3. Плазмаэкстракторы.
4. Весы.
5. Штатив для подвешивания пластикатных контейнеров.
6. Бикс со стерильным материалом (тупфера, перевязочный материал, ватные шарики, медицинские инструменты – ножницы, зажимы и др.).
7. Пластикатные контейнеры различных модификаций (для однократного и двукратного плазмаферезов).
8. Системы для переливания инфузионных сред.
9. Стерильный апирогенный 0,9% раствор натрия хлорида для внутривенного введения (200 мл, 400мл).
10. Этикетки для контейнеров с плазмой и кровью.
11. Одноразовые планшеты для определения групповой принадлежности.
12. Емкости для дезинфекции отработанного материала и медицинского инструмента.

Приложение 3

Таблица 1

**Определение буквенных символов номограммы для расчета веса плазмы
(в граммах) у мужчин при автоматическом плазмаферезе по массе тела и росту**

Масса тела донора, кг	Рост, см							
	152–156	157–161	162–166	167–171	172–176	177–181	182–184	185 и выше
49,5–53,5	B	B	C	C	D	D	D	E
54,0–58,0	B	C	C	D	D	D	E	E
58,5–62,5	C	C	C	D	D	E	E	F
63,0–67,0	C	C	D	D	E	E	F	F
67,5–72,0	D	D	D	E	E	E	F	F
72,5–76,0	D	D	E	E	E	F	F	G
76,5–80,5	D	D	E	E	F	F	G	G
81 и больше	D	D	E	F	F	G	G	G

Таблица 2

Номограмма для расчета веса (в граммах) изъятой плазмы при автоматическом плазмаферезе в зависимости от гематокрита донора и буквенного символа из таблицы 1

Гематокрит донора, %	Символы из таблицы 1						
	A	B	C	D	E	F	G
38,0–41,5	577	648	720	791	850	850	850
41,6–45,5	543	610	677	744	812	850	850
45,6–49,5	509	572	635	698	761	824	850
49,6–54,0	470	528	587	645	703	761	819

Таблица 3

Определение буквенных символов номограммы для расчета веса плазмы у женщин при автоматическом плазмаферезе по массе тела и росту

Масса донора, кг	Рост, см							
	152–156	157–161	162–166	167–171	172–176	177–181	182–184	185 и выше
49,5–53,5	A	A	B	B	B	C	C	D
54,0–58,0	A	B	B	B	C	C	D	D
58,5–62,5	B	B	B	C	C	D	D	E
63,0–67,0	B	B	C	C	D	D	D	E
67,5–72,0	B	C	C	D	D	D	E	E
72,5–76,0	B	C	D	D	D	E	E	F
76,5–80,5	B	C	D	D	E	E	F	F
81 и больше	B	C	D	D	E	F	F	F

Таблица 4

Номограмма для определения веса (в граммах) изъятой плазмы при автоматическом плазмаферезе в зависимости от гематокрита донора и буквенного символа из таблицы 3

Гематокрит донора, %	Символы из таблицы 3						
	A	B	C	D	E	F	G
38,0–41,5	577	648	720	791	850	850	850
41,6–45,5	543	610	677	744	812	850	850
45,6–49,5	509	572	635	698	761	824	850
49,6–54,0	470	528	587	645	703	761	819

Замораживание, хранение и доставка плазмы проводится согласно «Инструкции по фракционированию донорской крови на компоненты (плазма, эритроциты, лейкоциты) и их консервирование».

Плазма хранится в температурных режимах, соответствующих цели дальнейшего использования.

Приложение 4

Интервалы между процедурами плазма – цитофереза (в днях)

Название процедуры	Следующие процедуры			
	Кроведача	Плазмаферез	Тромбо – цитоферез	Лейко - цитоферез
Кроведача	60	30	30	30
Плазмаферез: доза 250-300 мл	7-14	7-14	7-14	7-14
доза 500 – 600 мл	14	14	14	14
Тромбоцитоферез	14	14	14	14
Лейкоцитоферез	30	14	14	30

Министр здравоохранения

В.В. Кучковой



УТВЕРЖДЕНО
Приказ Министерства здравоохранения
Донецкой Народной Республики
от 04.08.2015 № 012.1/244

**Инструкция
по контролю стерильности консервированной крови, ее компонентов, препаратов,
плазмозаменяющих и консервирующих растворов, условий их заготовки**

Общие положения

Исследование на стерильность консервированной крови, ее компонентов, препаратов, кровезаменителей и консервирующих растворов проводят с целью выявления возможной контаминации аэробными и анаэробными микроорганизмами.

Контроль стерильности может осуществлять персонал бактериологических лабораторий станций переливания крови, а также центральных районных больниц и санэпидстанций, в регионах которых расположены отделения переливания крови.

1. Требования, которые предъявляют к бактериологической лаборатории

1.1 Оборудование бактериологической лаборатории

Лабораторию размещают в специальном помещении, оснащение и оборудование которого приспособлено для выполнения исследований в асептических условиях и предотвращает заражение персонала.

В структуре лаборатории предусмотрены помещения специального назначения;

- лабораторная комната ;
- бокс и предбокс;
- термостатная;
- комната для приготовления питательных сред;
- стерилизационная;
- препараторская.

Лабораторная комната - светлое, просторное помещение для подготовительной работы в боксе и учета результатов исследований.

В лабораторной комнате должны быть:

- рабочие места врача и лаборанта, оснащенные бинокулярным световым микроскопом, газовыми или спиртовыми горелками, а также инструментами для бактериологических исследований;

- стол для окраски мазков;
- потенциометр;
- центрифуга;
- термостаты;
- холодильники длядельного хранения питательных сред, реактивов и культур микроорганизмов.

Бокс - изолированное помещение для проведения бактериологических исследований в асептических условиях.

Бокс должен быть светлым, обеспеченным приточно-вытяжной вентиляцией и оборудованным бактерицидными лампами из расчета 1 лампа БУФ-30 на 12 м³ объема

помещения или от 2 до 2,5 Вт на 1 м² помещения. Лампы размещают на потолке, стенах, над входом в бокс, выключатели располагают вне бокса.

Бокс должен быть оборудован рабочим и вспомогательным столами, табуретками, газовыми или спиртовыми горелками.

Оборудование боксов и конструкция мебели должны обеспечивать легкость и надежность дезинфекционной обработки. Газовые, водопроводные трубы и провод располагают в толще стен, батареи отопления должны быть ровными. Стены облицовывают метлахскими плитками или, как и потолок, красят масляной краской светлых оттенков. Пол покрывают линолеумом, метлахскими плитками или пластиком, что позволяет использовать для уборки дезинфицирующие растворы.

Для проведения контроля стерильности разрешается использовать настольные боксы с ламинарным потоком стерильного воздуха.

Предбокс с передаточным окном должен примыкать к боксу. В предбокс вносят материал, приготовленный для посева, питательные среды, пипетки и бикс со стерильным бельем. В предбоксе персонал готовится к работе в боксе.

В термостатной располагают термостаты для инкубирования бактериологических посевов при температуре от 30 до 35 ° С и от 20 до 25 ° С.

Комнту для приготовления питательных сред оборудуют рабочими столами, газовой или электрической плитой, шкафами для хранения сухих питательных сред, химических реагентов и лабораторной посуды, холодильниками.

В стерилизационной устанавливают оборудование для стерилизации посуды, питательных сред, одежды, обеззараживания отработанного материала.

Препараторская приспособлена для предстерилизационной обработки посуды. В ней должны находиться электрическая или газовая плита, рабочие столы, стеллажи и сушильные шкафы.

Перед входом в каждую комнату должен быть коврик, увлажненный дезинфектантом.

В бактериологической лаборатории должна быть холодная и горячая вода.

1.2 Подготовка бокса для работы

Ежедневно бокс и предбокс тщательно убирают и дезинфицируют путем протирания поверхности стен, пола, мебели стерильной тряпкой, которую смачивают в 4% растворе перекиси водорода с моющими средствами или в мыльно-содовом растворе (1% раствор соды или моющего средства и 0,5% нашатырного спирта), с последующим протиранием одним из дезинфицирующих растворов: 3% раствором хлорамина, 3% раствором фенола, 1% раствором кальция гипохлорита, раствором Антисептол или одним из иностранных дезинфектантов, зарегистрированных в Украине .Норма затрат дезинфицирующих растворов - 70-100 мл / м².

За 1,5-2,0 ч до работы в боксе включают бактерицидные лампы. Воздух бактериологического бокса контролируют седиментационным методом не реже двух раз в неделю до и после работы. Для этого на рабочий стол ставят чашки Петри с мясопептонным и 5% кровяным агаром и открывают их на 15 мин. Посевы воздуха инкубируют в термостате при температуре от 30 до 35 ° С в течение (21 ± 3) ч, затем оставляют еще на (21 ± 3) ч при температуре от 20 до 25 ° С. В случае роста на любой чашке Петри более 3 колоний микроорганизмов в начале работы и более 15 - в конце проведение дальнейших работ запрещается и бокс подлежит тщательной обработке. Если в боксе выявлены спорообразующие бактерии, грибы или гемолитические формы микроорганизмов, концентрацию перекиси водорода для уборки увеличивают до 6%.

В случае появления колоний грибов применяют меры по снижению влажности в помещении (обогреватели и т.п.).

По окончании работы бокс проветривают. Инвентарь для уборки тщательно высушивают, тряпки стерилизуют и хранят в специально отведенном месте.

Один раз в год проводят санитарный ремонт бактериологического бокса и предбокса.

1.3. Подготовка лабораторной посуды и питательных сред

1.3.1.Подготовка лабораторной посуды для питательных сред

Новую лабораторную посуда кипятят в течение 30 мин в 1-2% растворе соляной кислоты, чтобы избежать вылущивания стекла, с последующим промыванием дистиллированной водой до нейтральной реакции. Посуду, бывшую в употреблении, моют горячей водой с моющим средством, промывают проточной водой, споласкивают дистиллированной водой и высушивают.

Предназначенные для стерилизации пробирки, колбы, бутылки закрывают ватно-марлевыми пробками. Шейки колб и бутылок обертывают бумажными колпачками. Чашки Петри и пипетки заворачивают в бумагу или помещают в металлические пеналы, лотки. Посуду стерилизуют паровым или воздушным методом.

1.3.2.Подготовка питательных бактериологических сред

Для бактериологического контроля консервированной крови, ее компонентов, препаратов, кровезаменителей и консервирующих растворов, а также условий их заготовки применяют такие питательные среды: питательная среда для контроля стерильности (тиогликоловая), среда Сабуро (жидкая) и 2% питательный агар (кровяной и мясопептонный). "Входной" контроль каждой новой серии тиогликоловой среды предполагает оценку ее качества по стерильности и ростовым свойствам. Контроль качества каждой из последующих партий среды, приготовленной из одной серии сухого препарата прошедшего полный "входной" контроль, проводят только на стерильность.

Для оценки стерильности среды пробирки с образцами готовой тиогликоловой среды в объеме 10 мл и 20 мл после автоклавирования в количестве от 2 до 5% в зависимости от объема приготовленной партии помещают в термостат и выдерживают при температуре от 30 до 35 ° С в течение (45 ± 3) ч. Учет результатов осуществляют визуально. Среду Сабуро жидкую выдерживают при температуре от 20 до 25 ° С в течение (69 ± 3) ч.

В случае прорастания среды хотя бы в одной пробирке бракуют всю партию.

Образцы тиогликоловой среды, которые были выдержаны в термостате, для дальнейшей работы не используют.

Определение ростовых свойств тиогликоловой среды осуществляется с помощью тест-культур микроорганизмов:

Staph. aureus 209Р

Clostridium sporogenes 272.

Готовая к употреблению тиогликоловая питательная среда должна быть стерильной и обеспечивать рост тест-культур микроорганизмов. Срок хранения тиогликоловой питательной среды - 2 нед при температуре от 10 до 20 ° С в защищенном от света месте. Срок хранения среды Сабуро, мясопептонного бульона и мясопептонного агара - 3 мес при температуре от 4 до 10 ° С или 1 мес - при температуре от 18 до 20 ° С.

2. Бактериологический контроль условий заготовки

Объектами исследований при проведении бактериологического контроля условий заготовки являются:

- режим стерилизации;
- материал, подлежащий стерилизации;
- воздушная среда производственных боксов;
- руки персонала и кожа локтевых сгибов доноров.

2.1. Контроль режима работы паровых и воздушных стерилизаторов

Контроль режима работы стерилизаторов осуществляют физическим, химическим и бактериологическим методами.

2.1.1. Физический метод контроля.

Предназначен для оперативного контроля параметров режимов работы паровых и воздушных стерилизаторов (температура, давление, и время стерилизации, стерилизационной выдержки). Результаты контроля позволяют оперативно выявлять повреждения аппарата, контрольно-измерительных приборов и ориентировочно оценивать правильность загрузки стерилизатора в каждом конкретном случае.

Физический метод контроля работы стерилизаторов осуществляют путем измерения температуры, давления и времени.

Параметры режима работы стерилизатора следует проверять в течение цикла стерилизации.

Контроль параметров режимов работы паровых стерилизаторов

Контроль температурных параметров режима работы паровых стерилизаторов проводят с использованием термометров ртутных стеклянных максимальных с диапазоном измерения температуры от 0 до 150 ° С (ТП-7). Термометры нумеруют и размещают в разных местах стерилизационной камеры. По окончании цикла стерилизации регистрируют показатели термометров и сравнивают их между собой, а также с номинальной температурой стерилизации.

Отклонение в показателях максимальных термометров допустимы в указанных пределах.

Давление в стерилизационной камере парового стерилизатора измеряют с помощью мановакуумметра. Класс точности мановакуумметра должен быть не ниже 2,5. Предел измерения - от 0,1 до 0,5 МПа (от 1 до 5 кгс / см²).

Хронометраж цикла стерилизации проводят с помощью механического секундометра (класс точности 2,0) или наручных механических часов с погрешностью суточного хода ± 1 мин.

Контроль параметров работы воздушных стерилизаторов

Контроль температурных параметров работы воздушных стерилизаторов в течение цикла стерилизации проводят путем наблюдения за показателями приборов, установленных на стерилизаторе (термометр, индикаторное оборудование на панели аппарата).

Распределение температур в середине загруженной стерилизационной камеры определяют, используя термометры ртутные стеклянные максимальные с диапазоном измерения температур от 0 до 200 ° С (ТП-25). Максимальные термометры нумеруют и размещают в разных местах камеры воздушных

стерилизаторов. По окончании цикла стерилизации регистрируют показатели термометров и сопоставляют их с номинальной температурой стерилизации.

Отклонение в показателях максимальных термометров допустимо в указанных пределах.

Хронометраж цикла стерилизации проводят аналогично указанному выше.

Примечание. Правильность показателей максимальных термометров устанавливают путем погружения их в открытую емкость с кипящей водой на 6-7 мин

(ртутный шарик термометра не должна касаться стенок сосуда). Если термометры показывают температуру $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$, их считают исправными.

Стерилизационные коробки не перегружают материалом, который стерилизуется. Свернутое хирургическое белье закладывают так, чтобы между ним свободно проходила рука. После извлечения средств контроля со стерилизационных коробок с изделиями без индивидуальной упаковки последние подлежат повторной стерилизации.

2.1.2.Химический метод контроля.

Предназначен для оперативного контроля одного или нескольких параметров режимов работы паровых и воздушных стерилизаторов

Химический метод контроля работы стерилизаторов проводят с помощью химических тестов и термохимических индикаторов.

Химический тест - это запаянная с обоих концов стеклянная трубка, заполненная смесью химического соединения с органическим красителем или только химическим соединением (веществом), которая меняет свое агрегатное состояние и цвет при достижении необходимой для нее температуры плавления.

Упакованные химические тесты нумеруют и размещают в разных местах стерилизационной камеры. По окончании стерилизации химические тесты вынимают из стерилизатора и визуально определяют изменения их агрегатного состояния и цвета. В случае положительного результата контроля химические тесты должны равномерно расплавиться и изменить цвет, что свидетельствует о достижении заданной температуры стерилизации.

Термохимические индикаторы предназначены для осуществления оперативного контроля одного или нескольких параметров режимов работы паровых и воздушных стерилизаторов.

Термохимический индикатор - это полоска бумаги, на которую нанесена термоиндикаторная краска.

Пронумерованные термохимические индикаторы размещают в разных местах стерилизаторов (прикрепляют на пакеты с контрольными тестами или на упаковки с изделиями, которые стерилизуются).

По окончании стерилизации термохимические индикаторы вынимают из стерилизатора и визуально определяют изменение их цвета.

В случае положительного результата контроля термохимические индикаторы должны изменить цвет на указанный в инструкции, что свидетельствует о соблюдении параметров режима стерилизации.

2.1.3.Бактериологический метод контроля

Бактериологический метод предназначен для контроля эффективности работы стерилизаторов на основе гибели спор микроорганизмов, находящихся в биотестах.

Биотестами могут быть образцы грунта или микробные тест-объекты.

Во время бактериологического контроля работы паровых стерилизаторов пронумерованные биопробы закладывают в упаковки с материалом, который стерилизуют. В каждую упаковку помещают по 2 пробы и 2 пробы закладывают за упаковками в верхней и нижней частях стерилизационной камеры.

По окончании стерилизации биотесты в тот же день доставляют в бактериологическую лабораторию, где проводят посев каждого биотеста в 2 пробирки с 10 мл тиогликолевой среды (исследуемые пробы). Посевы инкубируют в термостате при температуре от 30 до 35°C в течение 7 суток.

Для контроля качества биотестов одну пробу оставляют в лаборатории без стерилизации, ее засевают и культивируют параллельно с опытными пробами.

В пробирке с посевом контрольного биотеста должен наблюдаться рост спорообразующих микроорганизмов. При отсутствии роста в контрольном биотесте устанавливают причину (нежизнеспособность тест-объекта, нарушения методики приготовления биотестов, питательных сред, культивирования).

В этом случае результаты бактериологического контроля аннулируют и повторяют контроль работы стерилизатора.

Ни в одной из исследуемых пробирок не должно быть роста спорообразующих микроорганизмов.

При наличии роста спорообразующих микроорганизмов хотя бы в одной из исследуемых пробирок бактериологический контроль повторяют.

Стерилизатор можно использовать после устранения неисправностей и получения положительных результатов физического, химического и бактериологического контроля.

Методика приготовления биопроб грунта

Образцы почвы высушивают на воздухе, измельчают в ступке и просеивают через мелкое сито.

Образцы грунта массой ($3,0 \pm 0,5$) г помещают в бактериологические пробирки, закрывают ватно-марлевыми пробками и упаковывают в бумагу.

Пробы, не менее 3 от каждого образца грунта, помещают в паровой стерилизатор и после продувки доводят давление пара в автоклаве до ($0,11 \pm 0,02$) МПа (($1,1 \pm 0,2$) кгс / см²) при температуре (121 ± 1) °C - экспозиция - 5 мин. Подъем давления в течение 8 мин, спуск пара - 3 мин. Ограничение времени подъема давления и спуска пара необходимо для уменьшения времени действия пара на микрофлору почвы, после чего пробы грунта подлежат бактериологическому исследованию.

В тех случаях, когда во время экспозиции 5 мин во всех пробирках с засеянными пробами грунта нет роста, в случае дальнейшей проверки экспозицию сокращают до 3 мин.

Если и при такой экспозиции все пробы почвы окажутся стерильными, образец почвы считают непригодным для контроля паровых стерилизаторов.

Подсущенный, просеянный, маркованный образец почвы, содержащей термостойкие спорообразующие микроорганизмы, необходимо хранить в емкости с притертой пробкой при комнатной температуре в защищенном от света месте. Срок использования его для бактериологического контроля режимов работы паровых стерилизаторов составляет 7 мес. Через 3-4 мес проверяют сохранность термостойкости микрофлоры в этом образце грунта.

2.2.Контроль простерилизованного материала

Стерильный материал необходимо хранить в специальном помещении.

Контаминацию воздуха помещений для хранения стерильного материала проверяют не реже 1 раза в неделю (п. 1.2).

Предполагается рост не более 10 колоний сапрофитов. Стерильность изделий определяют не реже одного раза в неделю перед началом работы и не менее чем с 3 образцов одного вида, которые были простерилизованы в одном стерилизаторе. Посев каждого образца изделий (или их отдельных узлов и составных частей) осуществляют в две пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды. Посевы помещают в термостат: одну пробирку выдерживают при температуре от 30

до 35 °C, вторую - от 20 до 25 °C в течение 8 суток (в случае контроля изделий, которые были простерилизованы паровым или воздушным методом).

Посев на стерильность ампул, игл и шприцов малой емкости, а также образца резиновой трубы с иглой от системы для взятия крови многоразового использования проводят путем погружения их в пробирки с тиогликолевой средой.

Стерильность белья, хирургических инструментов, резиновых перчаток, внешние и внутренние поверхности шприцев большой емкости контролируют путем смывов стерильными тампонами, которые смачивают в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида, а затем вносят в пробирки с тиогликолевой средой.

Стерильность посуды проверяют путем смывов с внешней и внутренней поверхности. Смыв с внешней поверхности проводят стерильными тампонами, которые смачивают в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида; смыв с внутренней поверхности проводят путем ополаскивания ее 10 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида и по $(1,0 \pm 0,1)$ мл засевают в пробирки с питательной средой.

2.3. Контроль микробной контаминации воздуха производственных боксов

Подготовку боксовых помещений к работе и бактериологический контроль воздуха проводят согласно п.1.2.

2.4. Контроль эффективности обработки рук персонала производственных боксов и кожи локтевых сгибов доноров

Руки персонала, который работает в производственных боксах, один раз в неделю проверяют на стерильность следующим образом: пальцами касаются поверхности мясопептонного агара в чашке Петри, плотно прижимают их, не повреждая питательной среды, и делают несколько круговых движений. Чашки Петри с посевами термостатируют при температуре от 30 до 35°C в течение (45 ± 3) ч.

Кожу локтевых сгибов после соответствующей обработки контролируют 2 раза в неделю в 3% доноров путем смывов стерильными марлевыми салфетками 4x4 см, увлажненными стерильным раствором нейтрализатора (для нейтрализации йода используют 1% раствор натрия гипосульфита, для нейтрализации катион- активных кожных антисептиков - 0,2% раствор сульфанола в 10% растворе обезжиренного молока).

После смывов салфетки помещают в пробирки или колбы с 20 мл нейтрализатора или стерильного изотонического раствора натрия хлорида со стеклянными бусами и встряхивают в течение 10 мин, после чего по 0,5 мл жидкости пипеткой переносят в чашки Петри и заливают охлажденным до температуры 45°C 2% мясопептонным агаром. Салфетки погружают в пробирки с 10 мл тиогликолевой среды. Оба посева инкубируют в термостате при температуре от 30 до 35°C в течение (45 ± 3) ч.

Посевы рук медицинского персонала и кожи локтевых сгибов доноров должны быть стерильными.

3. Исследование на стерильность образцов консервированной крови, ее компонентов, препаратов, плазмозамещающих и консервирующих растворов

Образец для контроля - это количество препарата, необходимое для посева на питательную среду.

3.1 Отбор образцов при производственном контроле

Отбор образцов проводят от каждого бокса, стерилизатора, стерилизующей системы, сублимационного аппарата.

Контроль стерильности консервированной крови и ее компонентов проводят путем исследования образцов, избирательно взятых из общего количества заготовленных емкостей.

Количество проб крови составляет 2% от числа заготовленных бутылок или 1% от числа заготовленных полимерных контейнеров, но должно быть не менее одной пробы.

Компоненты (препараты) крови - эритроцитную массу, эритроцитную взвесь, плазму нативную, в том числе иммунную, криопреципитат и т.д. - отбирают объемом от 3 до 5 мл в пустые стерильные флаконы в начале, в середине и в конце работы производственного бокса.

Компоненты, заготовленные в полимерные контейнеры, отбирают выборочно в количестве 1% от числа заготовленных емкостей, но не менее одного образца.

Концентраты лейкоцитов, тромбоцитов и отмытые размороженные эритроциты не контролируются, так как они должны быть использованы в течение 24 часов с момента заготовки.

Препараты крови и плазмозаменителей - растворы альбумина, иммуноглобулинов, полибиолин, аминокровин и т.д. контролируют в процессе стерилизующей фильтрации и розлива. Для контроля отбирают не менее чем по 5 мл в начале, в середине и в конце розлива в пустые стерильные флаконы (ампулы).

В случае разлива препаратов, в дальнейшем подлежащих лиофильной сушке, до окончания конгроля стерильности оставляют удвоенное количество образцов для возможного исследования.

Полибиолин контролируют:

- после сублимационной сушки в бутылках, отбирая по одному образцу от каждой кассеты, этажерки или полки; затем в процессе стерильной расфасовки - каждый тридцатый флакон готового препарата
- после сублимационной сушки готового препарата во флаконах - по два образца от каждой кассеты-лотка.

3.2 Отбор образцов, проводим отдель технического контроля

В отдел технического контроля предъявляют готовую серию препарата.

Готовая серия препарата - это совокупность емкостей, которые были разлиты из одной емкости в течение не более 4 ч работы, запаянных или герметизированных тем или иным путем, что обеспечивает отсутствие контаминации во время разлива или высушивания. Для сухих препаратов - это количество бутылок, флаконов или ампул с препаратом, которые были высушены в одном аппарате за один цикл сушки. Для продукции, подлежащей автоклавированию, - это количество емкостей с препаратом, которые были простерилизованные в одном автоклаве.

Образцы готовой продукции отбирают для контроля от каждой серии в количествах, которые зависят от вида стерилизации и числа емкостей в серии.

Для определения минимального количества емкостей (единиц), необходимых для контроля стерильности, следует провести расчет по формуле:

$$n = 0,4\sqrt{N} \mid,$$

Где N - количество единиц в исследуемой серии препарата, при этом n должно

быть от 3 до 40 единиц.

3.3. В случае, если продукцию стерилизуют паром под давлением (0,11±0,02) МПа ((1,1±0,2) кгс/см²) и температуре (121±1) °С, для контроля отбирают 10 единиц.

Кроме образцов, направленных непосредственно на исследование стерильности, отбирают дубликаты в двойном количестве, которые используют в случае повторного контроля.

При отсутствии роста в первичных посевах дубликаты подлежат реализации.

Для проведения предварительного и арбитражного государственного контроля стерильности отбирают по 2 бутылки от серии; флаконы, ампулы - не менее 4 от серии. Количество емкостей с препаратами иммуноглобулинов - в соответствии с формулой.

Для проведения дальнейшего государственного контроля направляют по одной бутылке от серии; флаконов, ампул - не менее 2 от серии; количество емкостей с иммуноглобулинами рассчитывают по указанной формуле.

3.4 Техника проведения контроля стерильности

В предбоксе бутылки, флаконы, ампулы, полимерные контейнеры с препаратами проверяют на наличие этикеток, на герметичность, затем протирают 4% раствором перекиси водорода или 70% этиловым спиртом.

Образцы, поступающие в тканевой или бумажной упаковке, перед внесением в бокс от нее избавляют.

Специалисты, которые осуществляют контроль стерильности, непосредственно перед работой в боксе тщательно моют руки с мылом, вытирают их стерильным полотенцем, одевают стерильные халаты, шапочки или косынки, четырехслойные марлевые маски, бахилы или боксовую обувь. В боксе руки обрабатывают 70% этиловым спиртом.

Для работы используют стерильные пипетки, закрытые ватными пробками, резиновые груши, простерилизованные инструменты, которые во время работы находятся в емкости с 96% этиловым спиртом.

Перед посевом жидких образцов содержимое бутылок, флаконов, ампул встряхивают, концы ампул и шейки флаконов, бутылок фламбируют.

Лиофилизированные образцы растворяют тем же растворителем и в том же объеме, которые указаны на этикетке продукта.

- Посев каждого образца проводят в толщу питательной среды без выдувания отдельной пипеткой с помощью груши без предварительного прокаливания в пламени горелки. Использованные пипетки помещают в дезинфицирующий раствор.

Образцы, исследуемые на стерильность, засевают не менее чем по 1 мл каждый в две пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. При посеве плазмозамещающих и консервирующих растворов, кроме тиогликолевой среды, используют одну пробирку с 20 мл среды Сабуро (жидкой). Параллельно две пробирки с тиогликолевой средой и одну со средой Сабуро оставляют незасеянными для контроля стерильности питательных сред на весь период инкубации исследуемых образцов. Посевы в тиогликолевой среде и контрольные пробирки инкубируют в термостате при температуре от 20 до 25 ° С и при температуре от 30 до 35 ° С, со средой Сабуро - при температуре от 20 до 25 ° С.

Срок инкубации посевов в термостате в обоих питательных средах составляет 14 суткам.

В случае посева образцов крови и компонентов, заготовленных в полимерных контейнерах, трубку контейнера зажимают выше узла и отрезают между узлом и зажимом. Обрезанный конец трубы быстро проводят сквозь пламя, вводят в него пипетку, ослабляют зажим и путем нажатия на контейнер набирают в пипетку не менее 2 мл материала.

Посевы образцов консервированной крови, эритроцитной массы, эритроцитной взвеси, нативной плазмы, в том числе иммунной, выдерживают двое суток при соответствующей температуре, после чего проводят посев по 0,5 мл с каждой пробирки в другие две пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды.

Пересев инкубируют при тех же температурах, что и пробирки, из которых был проведен посев. Результаты регистрируют через сутки после пересева.

При контроле образцов препаратов, не вызывающих помутнение питательной среды (альбумин, препараты иммуноглобулинов, плазмозамещающие и консервирующие растворы), посевы инкубируют 14 суток при соответствующей температуре.

В случае контроля образцов препаратов, вызывающих помутнение питательной среды (полибиолин), через 7 суток с каждой пробирки делают пересев по 0,5 мл в другие две пробирки с

10 мл тиогликолевой среды, которые термостатируют при тех же температурах в течение 7 суток. Пробирки, из которых проведен пересев, сохраняют до окончания контроля стерильности. Общий период инкубации - 14 суток.

Стерильность растворителя для сухих препаратов проверяют путем посева по 1 мл в две пробирки с тиогликолевой средой.

Если во время посева используют несколько бутылок растворителя, стерильность каждого проверяют аналогичным способом.

Если объем содеримого одной единицы продукции превышает 100 мл, целесообразно использовать метод мембранный фильтрации.

3.5 Учет и интерпретация результатов исследования на стерильность

Посевы просматривают ежедневно. При отсутствии роста микроорганизмов в питательных средах считают, что образцы соответствуют требованиям стерильности.

Наличие роста микроорганизмов в питательных средах оценивают визуально макроскопически (муть, пленка, осадок, включение) и микроскопически. Отмечают температуру, при которой произошел рост, морфологию клеток и окраску по Граму.

В случае выявления роста даже в одной пробирке проводят повторный контроль удвоенного количества образцов данной серии. В случае прорасту среды хотя бы в одной пробирке при повторном контроле препарат считают нестерильным.

Разрешается до получения заключения о стерильности образца использовать консервированную кровь, эритроцитную массу, эритроцитную взвесь, нативную плазму, нативную свежезамороженную плазму, в том числе и иммунную, в течение 3 суток с момента их заготовки, если во время ежедневного бактериологического контроля исследуемые образцы были стерильными, а условия их заготовки отвечали требованиям в течение предыдущих 3 мес работы.

Результаты всех видов контроля стерильности и условий работы регистрируют в журналах, пронумерованных, прошнурованных, скрепленных печатью и заверенных руководителем.

Во время проведения исследований персонал бактериологической лаборатории обязан соблюдать правила техники безопасности.

РЕЦЕПТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

Питательная среда для контроля стерильности (тиогликоловая)

Панкреатический гидролизат казеина	- 15 г/л
Дрожжевой экстракт	- 5 г/л
Натрия хлорид	- 2,5 г/л
Глюкоза	- 5 г/л
Цистин (цистеин)	- 0,75 г/л
Тиогликоловая кислота	- 0,3 г/л
или натрия тиогликолят	- 0,5 г/л

Раствор натрия резазурина1: 1000 свежеприготовленного (можно без натрия резазурина)	1 г/л
Агар микробиологический	- 0,75 г/л
Вода дистиллированная	- до 1000 мл
pH после стерилизации	- 7,0 ± 0,2

Среда Сабуро (редкая)

Пептон ферментативный	10 г/л
Глюкоза	- 40 г/л
Вода дистиллированная	- до 1000 мл
pH после стерилизации	- 5,5 ± 0,2

Мясопептонный бульон

Пептон ферментативный	10 г/л
Натрия хлорид	- 5 г/л
Мясная вода	- до 1000 мл
pH после стерилизации	- 7,3 ± 0,2

Бульон Хоттингера

Гидролизат Хоттингера	- 20 г/л
Натрия хлорид	- 5 г/л
Вода дистиллированная	- до 1000 мл
pH после стерилизации	- 7,1 ± 0,1

Мясопептонный агар

Пептон ферментативный	10 г/л
Натрия хлорид	- 5 г/л

Агар микробиологический

Мясная вода (1: 2)	- 20 г/л
pH после стерилизации	- до 1000 мл

Агар Хоттингера

Гидролизат Хоттингера	- 20 г/л
-----------------------	----------

Натрия хлорид	- 5 г/л
Агар микробиологический	- 20 г/л
Вода дистилированная	- до 1000
pH после стерилизации	- 7,1 ±0,1

Кровяной агар (ex tempore)

Агар Хоттингера или мясопептоный агар стерильный (расплавленный и охлажденный при температуре $(45^{+}5)^{\circ}\text{C}$	- до 1000 мл
Свежая дефибринированная кровь (волова, кролика, человека)	- 50 мл

Полужидкий агар

Пептон ферментативный	10 г/л
Глюкоза	- 5 г/л
Агар микробиологический	- 0,5 г/л
Натрия хлорид	- 5 г/л
Мясная вода	-до 1000 мл
pH после стерилизации	- 7,2 ± 0,2

Среда Китта-Тароцци

Гидролизат Хоттингера	- 25 г/л
Глюкоза	- 5 г/л
Натрия хлорид	- 5 г/л
Агар микробиологический	1 г/л
Мясной фарш (на 1 пробирку с 10 мл среды)	- 0,3-0,5 г
Вода дистиллированная	- до 1000 мл
pH после стерилизации	- 7,3 ±0,1

Вышеупомянутые питательные среды стерилизуют насыщенным паром под давлением
 $(0,11 \pm 0,02)$ МПа ($(1,1 \pm 0,2)$ кгс/см²) при температуре $(121 \pm 1) ^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

1 .Определение ростовых свойств тиогликоловой среды.

Для определения ростовых свойств тиогликоловой среды используют тест-культуры микроорганизмов

Staphylococcus aureus 209 P
Clostridium sporogenes 272.

1.1 Выращивание и хранение тест-культур

1.1.1 *Staphylococcus aureus* 209 Р

Открывают ампулу с лиофилизированной культурой *Staphylococcus aureus* 209 Р, стерильной пастеровской пипеткой добавляют 0,5 мл бульона Хоттингера или мясопептонного бульона, тщательно перемешивают до получения гомогенной суспензии и переносят в пробирку с аналогичной средой. Посевы инкубируют при температуре от 30 до 35 ° С в течение (21 ± 3) ч.

Затем культуру пересевают на чашки Петри с агаром Хоттингера или мясо пептонным агаром, инкубируют при указанных выше условиях, выделяют типичные колонии (гладкие, с ровными краями, золотисто-желтого цвета) и пересевают их на скошенный агар Хоттингера или мясо пептонный агар. Посевы инкубируют в термостате при температуре от 30 до 35 ° С в течение (21 ± 3) ч, затем выдерживают (21 ± 3) ч при комнатной температуре.

Культуральные свойства: культура на поверхности агара растет в виде равного налета или гладких колоний с равномерной золотисто-желтой пигментацией.

Морфологические свойства: в мазке, окрашенном по Граму, должны наблюдаться однородные по размеру и расположенные в виде грозди коки с хорошо выявленной грамположительных окраской.

Культуру пересевают для хранения в 5-10 пробирок, содержащих по 10 мл полужидкого агара. Посевы инкубируют в термостате при температуре от 30 до 35 ° С в течение (21 ± 3) ч. Затем пробки пробирок парафинируют и закрывают резиновыми колпачками. После выращивания в термостате культуру хранят при температуре от 2 до 10 ° С. Пересев проводят не реже одного раза в 4 мес.

1.1.2 *Clostridium sporogenes* 272

Открывают ампулу с лиофилизированной культурой *Clostridium sporogenes* 272, стерильной пастеровской пипеткой добавляют 1 мл предварительно регенерированной среды Китта-Тароцци, тщательно перемешивают и гомогенную суспензию переносят в две пробирки с той же средой (посевной материал вносят на дно пробирки без выдувания).

Посевы инкубируют при температуре от 30 до 35 ° С в течение (21 ± 3) ч.

Культуральные свойства: культура в полужидкой среде сначала вызывает диффузное помутнение, затем образуется осадок и надосадочный прозрачный слой питательной среды.

Морфологические свойства: в мазке, окрашенном по Граму, должны наблюдаться большие грамположительные споровые палочки. Споры овальной формы, располагаются субтерминально.

Культуру переносят для хранения в 5-10 пробирок, содержащих по 10 мл регенерированной среды Китта-Тароцци.

Для определения чистоты культуры при всех пересевах рекомендуется проводить висев на скошенный агар Хоттингера. Посевы инкубируют в термостате при температуре от 30 до 35 ° С. Пробирки с культурой (вторая генерация) запаивают или заливают поверх посева слоем стерильного вазелинового масла высотой (1,5 ± 0,1) см. На пробки пробирок, в которых находится культура, одевают резиновые колпачки.

Культуру хранят при температуре от 2 до 10 ° С и пересевают на такую же среду не реже одного раза в 4 мес.

1.2. Подготовка тест-штаммов микроорганизмов для контроля тиогликоловой среды

1.2.1. *Staphylococcus aureus* 209 P

(21 ± 3)-часовую культуру *Staphylococcus aureus* 209 P, которая была выращена на скошенном агаре Хоттингера или мясо-пептонном агаре (вторая генерация), смывают с поверхности агара стерильным физиологическим раствором натрия хлорида (1,0 ± 0,1) мл и тщательно перемешивают с помощью стерильной пипетки. Затем некоторое количество полученной суспензии переносят в пустую стерильную пробирку, доводят концентрацию микробной взвеси до 10 единиц по стандартному образцу (ОСВ 42-28-59-85).

Приведенную к стандарту суспензию культуры *Staphylococcus aureus* 209 P в количестве 1 мл переносят в первую из 8 пробирок, содержащих по 9 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Это первое разведение тест-культуры - 10^{-1} . Таким же образом последовательно получают десятикратное разведение культуры до восьмой пробирки (разведение 10^{-8}).

Для переноса взвеси культуры с одной пробирки в другую каждый раз необходимо пользоваться отдельной стерильной пипеткой объемом 1 мл.

Для контроля тиогликолевой среды используют разведения культуры *Staphylococcus aureus* 209 P 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

1.2.2 *Clostridium sporogenes* 272

Культуру *Clostridium sporogenes* 272, которая была выращена в среде Китта - Тароцци (вторая генерация)*, центрифугируют при скорости вращения от 2700 до 3000 об /мин в течение (20 ± 1) мин, затем удаляют надосадочную жидкость.

Полученную в осадке биомассу разводят стерильным физиологическим раствором натрия хлорида до концентрации микробной взвеси, которая соответствует 10 единицам по стандартному образцу мутности (ОСВ 42-28-59-85). Во время работы с анаэробной культурой перемешивания осуществляют с помощью пипетки. Для того, чтобы избежать попадания воздуха в культуру, пипетку не вынимают из жидкости.

1 мл полученной суспензии клеток стерильной пипеткой переносят в стерильную пробирку, которая содержит 9 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида (разведение 10^{-1}). Полученную взвесь культуры доводят до разведения 10^{-8} десятикратным разбавлением. Для контроля питательной среды используют разведения культуры *Clostridium sporogenes* 272 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

1.3 Посев тест-штаммов микроорганизмов в тиогликолевую среду и учет результатов.

По 0,1 мл микробной взвеси *Staph. aureus* 209P (каждое из разведенных 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) и *Cl. sporogenes* 272 (каждое из разведенных 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) вносят соответственно в три пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды, погружая пипетку внутрь столбика среды. Посевы осуществляют начиная с последнего разведения. Через (21 ± 3) ч и (45 ± 3) ч инкубации в термостате при температуре от 30 до 35 ° С проводят учет результатов.

Серию среды признают пригодной по ростовым свойствам, если не позже (45 ± 3) ч инкубации посевов визуально проявляется рост тест-культур *Staph. aureus* 209P и *Cl. sporogenes* 272 по разведению 10^{-7} не менее чем в 2 из 3 засеянных пробирок.

Допускается возможность признать пригодной серию среды при таких результатах роста тест-штаммов:

- 10^{-6} - не менее чем в 2 пробирках;
- 10^{-7} - не менее чем в 1 пробирке;
- 10^{-8} - не менее чем в 1 пробирке.

Если по окончании гарантийного срока ростовые свойства питательной среды не изменились, она подлежит дальнейшему использованию после переконтроля. Переконтроль среды проводят в бактериологической лаборатории станции переливания крови.

В случае получения положительных результатов срок годности питательной среды продлевают на 1 год.

* Для выращивания суточной рабочей культуры Cl. sporogenes 272 можно использовать тиогликолевую среду, отконтролированную по всем показателям.

Обработка антисептиками рук медицинского персонала и кожи локтевых сгибов доноров

Объект обработки	Антисептик
Руки медицинского персонала	Раствор первомура (рецептура С-4) АХД 2000 Стериллиум Метод Спасокукоцкого
Кожа локтевых сгибов доноров	Раствор первомура (рецептура С-4) АХД 2000 Стериллиум Растворы: аммиака - 0,5% этилового спирта - 70% йода - 5%

Раствор первомуром (рецептура С-4)

Характеристика. Прозрачная бесцветная жидкость с запахом надмуравьиной кислоты; оказывает выраженное бактерицидное и спороцидное действие. В состав входят муравьиная кислота, перекись водорода, вода.

Приготовление раствора первомура и срок его реализации

Руки медицинского персонала обрабатывают 2,5% раствором первомура. Для приготовления 1л 2,5% раствора первомура отмеряют 17,1 мл 30% раствора перекиси водорода и 6,9 (8,1) мл 100% (85%) муравьиной кислоты, смешивают их в стеклянной посуде, которую помещают в холодную воду на 1,0-1,5 ч и периодически встряхивают до полного растворения смеси (раствор можно хранить в течение трех суток в стеклянной посуде с герметичной пробкой в защищенном от света месте). Содержимое колбы доводят дистиллированной водой до 1л.

Водный раствор первомура необходимо использовать в день приготовления.

Способ применения

Перед обработкой раствором первомура медицинский персонал моет руки с мылом (без щеток) в течение 1 мин, вытирает насухо стерильной салфеткой. Затем руки в течение 1 мин обрабатывают раствором первомура в эмалированной или полиэтиленовой посуде, вытирают стерильной салфеткой и надевают стерильные резиновые перчатки.

Обработка рук персонала ПО МЕТОДУ Спасокукоцкого

(Применяют при отсутствии вышеуказанных средств)

Используют такие растворы антисептиков:

0,5% раствор аммиака (свежеприготовленный теплый);

96% этиловый спирт;

5% раствор йода.

Способ обработки

0,5% раствор аммиака наливают в два стерильные сосуды. Руки моют 3 мин в одной, а затем 3 мин во второй емкости стерильными марлевыми салфетками. Высушивают стерильной салфеткой и обрабатывают 96% этиловым спиртом в течение 5 мин. Ногтевые ложа смазывают 5% раствором йода.

По окончании работы рекомендуется помыть руки водой и смазать обычными средствами, смягчающими кожу.

Обработка кожи локтевых сгибов доноров растворами аммиака, спирта и йода

При отсутствии указанных выше антисептиков кожу локтевого сгиба доноров последовательно обрабатывают 0,5% раствором аммиака, 70% этиловым спиртом и 5% спиртовым раствором йода.

Отбор образцов препаратов крови отделом технического контроля

Количество образцов рассчитывают по формуле:

$$n = 0,4\sqrt{N} \lfloor,$$

где N - количество единиц в исследуемой серии препарата;

n - количество единиц, необходимое для контроля стерильности (должно быть от 3 до 40).

Для удобства расчетов предлагается таблица, которая позволяет определить количество единиц, необходимое для контроля стерильности.

N		n	N		N
от	до		от	до	
	< 100	3	3200	3400	23
100	120	4	3500	3700	24
130	190	5	3800	4000	25
200	260	6	4100	4300	26
270	350	7	4400	4700	27
360	450	8	4800	5000	28
460	550	9	5100	5400	29
600	650	10	5500	5800	30
700	800	11	5900	6200	31
850	950	12	6300	6600	32
1000	1100	13	6700	7000	33
1200	1300	14	7100	7400	34
1400	1500	15	7500	7800	35
1600	1700	16	7900	8300	36
1800	1900	17	8400	8700	37
2000	2100	18	8800	9200	38
2200	2300	19	9300	9700	39
2400	2600	20	9800	10000	40
2700	2800	21	> 10000		
2900	3100	22			

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПЕРСОНАЛА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ В УЧРЕЖДЕНИЯХ СЛУЖБЫ КРОВИ

Основной опасностью для персонала в учреждениях службы крови и для окружающей среды является кровь и продукты ее переработки, так как они могут быть инфицированными вирусами гепатитов, иммунодефицита человека, возбудителями паразитарных и других инфекционных заболеваний.

В связи с этим работа в бактериологической лаборатории станции переливания крови должна быть организована так, чтобы обеспечить стерильность при проведении исследований и исключить возможность заражения работников возбудителями инфекционных заболеваний.

Размещение помещений бактериологической лаборатории должно обеспечивать поточность движения материала, поступающего для исследования.

- 1) Рабочие комнаты должны быть обеспечены бактерицидными лампами.
- 2) На всех рабочих местах должны находиться емкости с дезинфицирующими растворами с указанием:

- названия дезинфицирующего раствора,
- концентрации,
- назначение,
- даты приготовления.

В лаборатории необходимо иметь запас дезинфицирующих средств, которые нужно хранить в защищенном от света месте.

Приготовление дезинфицирующих растворов необходимо проводить в помещении, которое хорошо проветривается, с использованием средств индивидуальной защиты (резиновые перчатки, респираторы, герметичные очки).

Емкости с дезинфицирующими растворами должны плотно закрываться. Ответственность за обеззараживание биологического материала несет заведующий лабораторией. К работе в бактериологической лаборатории допускаются специалисты, которые ознакомлены и соблюдают правила режима и техники безопасности при работе с инфекционным или подозрительным на зараженность биологическим материалом.

Для обеспечения режима работы в бактериологической лаборатории каждый работник обязан:

- использовать индивидуальную спецодежду (медицинский халат, шапочку или платок, сменную обувь);
- строго соблюдать личную гигиену;
- содержать в чистоте помещения лаборатории;
- не выходить за пределы лаборатории в спецодежде, а не надевать на него верхнюю одежду;
- прием посетителей проводить в специально отведенном помещении;
- личные вещи хранить в приспособленном для этого помещении;
- не курить и не есть в помещении лаборатории.

При бактериологическом исследовании биологического материала необходимо:

- строго придерживаться принятых в бактериологической практике технических приемов, исключающих возможность контакта исследователя с инфицированным материалом;
- пользоваться индивидуальными средствами защиты (резиновые перчатки, респираторы, очки и т.д.);
- набирать материал только с помощью резиновой груши или автоматической пипетки с одноразовыми наконечниками;
- все виды использованных пипеток, резиновых груш и т.д. обеззараживать погружением в посуду с дезинфицирующим раствором;
- четко маркировать посуду с бактериологическими посевами;

- ампулы с лиофилизованными микробными культурами открывать над емкостью с дезинфицирующим раствором;
- после окончания исследований отработанный материал необходимо вкладывать в специальные маркированные емкости, пломбировать и передавать для утилизации;
- в случае попадания биологического материала на поверхность лабораторной мебели обеззараживание проводить следующим образом: залить участок дезинфицирующим раствором на определенный срок, затем удалить смесь материала и дезинфектанта тампоном, поместить его в дезинфицирующий раствор, а поверхность несколько раз протереть 70% этиловым спиртом;
- в случае попадания биологического материала на спецодежду немедленно обработать этот участок дезинфицирующим раствором, затем погрузить его в дезинфицирующий раствор;
- в случае попадания материала на лицо сотрудника необходимо тщательно вымыть лицо с мылом, глаза промыть водой или физраствором;
- в процессе работы и после ее окончания руки обрабатывать 70% этиловым спиртом.

В случае инфицирования рук обработать их 70% этиловым спиртом, затем тщательно вымыть водой с мылом;

Ежедневно после окончания работы проводить влажную уборку помещений лаборатории с применением дезинфицирующих средств и обеззараживать воздух с помощью бактерицидных ламп в течение 1 ч, избегая попадания прямых лучей на глаза и кожу работников.

Для оказания первой медицинской помощи при несчастных случаях в лаборатории должна быть аптечка.

Медицинская документация
НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ

Форма № 257/У

Рабочий журнал
регистрации режима работы стерилизаторов

Начат 20____ г.

Закончен 20____ г.

Регистрационный номер	Дата стерилизации	Учреждение (Отдел)	Марка № стерилизатора	Изделия, подлежащие стерилизации		Упаковка	Термин стерилизации, мин.	Режим		Тест-контроль			Регистрационный номер	Дата стерилизации	
				наименование	количество шт			начало	конец	давление МПа (кгс / см ²)	температура, °C	физический	химический	бактериологический	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	п	12	13	14	15	16

Медицинская документация НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ

Форма № 381/У

Рабочий журнал

микробиологических исследований смывов со на контроль стерильности

Начат 20 г.

Закончен 200 г.

Реестрационный номер	Дата стерилизации	Дата контроля	Учреждение (отдел)	Объект исследования	Место смыча	Результаты исследования	Дата окончания исследования, подпись лица, проводившего исследования	Принятые меры
----------------------	-------------------	---------------	--------------------	---------------------	-------------	-------------------------	--	---------------

РАБОЧИЙ ЖУРНАЛ
приготовления и контроля бактериологических сред

Начат " _ " ____ 200__ г.

Закончен « _____ » 200__ г.

Регистрационный номер	Наименование среды	Серия и дата изготовления компоненты из которых приготовлена среда	Количество приготовленной среды	Дата		Оценка качества питательной среды				Заключения о пригодности питательной среды	Дата и подпись лица, проводившего исследования		
				приготовления среды	контроля среды	стерильность	ростовые свойства						
							тесткультура микроорганизма	Рост тесткультуры по разведению					
1	2.	3	4	5	6	7	8	9	10	11			

Медицинская документация
НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ

Форма № 380/У

РАБОЧИЙ ЖУРНАЛ
микробиологических исследований воздуха

Начат “_” ____ 20__ г.

Закончен «_____» 200__ г.

Регистрационный номер	Дата контроля	Учреждение (отдел) место забора проб	Количество колоний на питательном агаре				Характер микрофлоры	Дата окончания исследования. Подпись лица, проводившего исследования	Принятые меры			
			До работы		После работы							
			мясопептонный	кровяной	мясо пептонный	кровяной						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

Медицинская документация
НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ

Форма № 258/У

РАБОЧИЙ ЖУРНАЛ
исследований на стерильность

Начат “_” ____ 20__ г.

Закончен «_____» 200__ г.

Регистрационный номер	Учреждение (отдел), который прислал образец	Наименование, серия, регистрационный номер образца	Количество исследованного материала, образцов	Фамилия врача, который заготовил материал	Дата				Результаты бактериологического исследования		Подпись лица, проводившего исследования	
					заготовки	поступления	посева	окончания исследования	Макроскопического			
									(20-25)°C	(30-35)°C		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Министр здравоохранения



В. В. Кучковой

**Инструкция
по определению групп крови по системе АВО, Резус, иммунных антител**

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Организационные требования

роль для обеспечения качественной медицинской помощи при проведении трансфузий играет выполнение пациентам иммуногематологических исследований по определению группы крови по системе АВО и системе Резус. При проведении этих исследований все пациенты рассматриваются как реципиенты гемокомпонентов.

иммуногематологические исследования проводятся аккредитованными и сертифицированными лабораториями, имеющими соответствующее оборудование и квалифицированный обученный персонал.

группы крови по системе АВО первично определяется лечащим или дежурным врачом соответствующего отделения, прошедшем обучение по вопросам трансфузиологии, простой и крестовой агглютинации (стандартными изогемагглютинирующими сыворотками или специальными антителами). Далее промаркированный образец крови пациента вместе с направлением в подтверждающую лабораторию ЛПУ для выполнения дальнейших иммуногематологических исследований.

Подтверждающей лаборатории ЛПУ врач, прошедший специальную подготовку по трансфузиологии, выполняет определение группы крови (АВО) перекрестным методом определения (D)-принадлежности крови пациента, а также проводит при необходимости исследование образца крови на наличие аллоиммунных антител.

В исключительных случаях идентификация антигенов и антител проводится в специализированными лабораториями учреждений службы крови (УСК).

В экстренных показаниях к трансфузии гемокомпонентов и невозможности выполнения иммуногематологического исследования в подтверждающей лаборатории (в выходные и праздничные дни) исследования групповой принадлежности проводятся дежурным врачом, при этом в обязательном порядке заготавливается образец крови пациента и передается в подтверждающую лабораторию в часы ее работы.

Необходимо переносить данные о группе крови и резус-принадлежности в медицинскую документацию реципиента с медицинской документации других организаций, где ранее пациенту была оказана медицинская помощь, в том числе включающая трансфузию (или) донорской крови и (или) ее компонентов, или проводилось его медицинское лечение.

Определение антигенов эритроцитов крови пациентов по системам АВО, Резус, определение аллоантител и тесты на совместимость перед трансфузиями проводятся на донорах.

Донорам крови или ее компонентов, должны быть выполнены необходимые иммуногематологические исследования. При проведении этих исследований все доноры рассматриваются как доноры гемокомпонентов. При внесении данных о групповой и резус-принадлежности в документ донора он рассматривается как реципиент гемокомпонентов.

Иммуногематологические исследования крови доноров проводятся лабораториями службы крови (УСК) или отделениями переливания крови (ОПК). Группу

крови у доноров определяют 2 раза: первый раз, при первичном обращении донора непосредственно перед кроводачей прямой реакцией агглютинации (с помощью стандартных сывороток или/и моноклональных антител). Второй раз, после кроводачи из промаркированного образца крови, взятого в пробирку-спутник (перекрестным методом, т.е. одновременно с помощью стандартных сывороток или/и моноклональных антител и стандартных эритроцитов). В дальнейшем группа крови у доноров определяется во время каждой следующей кроводачи два раза, как указано ранее.

Если группа крови по системе АВО у донора определялась дважды из образцов крови при разных кроводачах (перекрестным методом) и результаты тестирования совпали, то при последующих кроводачах допускается проводить определение группы крови одной серией стандартных сывороток или моноклональных антител.

Учреждения службы крови (УСК) осуществляют организационно-методическую помощь ЛПУ, предоставляют консультации по вопросам определения специфичности аллоантител, сложных вариантов групп крови, проводят индивидуальный подбор крови сенсибилизованным больным, организуют семинары, курсы, где предоставляются теоретические и практические знания.

1.2. Требования к оборудованию

Необходимое оборудование и оснащение для выполнения иммуногематологических исследований:

- термостат (37°C);
- водяная баня для инактивации сыворотки (70°C);
- водяная баня, суховоздушный термостат (46-48°C);
- термометр;
- секундомер;
- лабораторная центрифуга;
- микроскоп;
- бытовой холодильник;
- полуавтоматические, автоматические иммуногематологические анализаторы;
- лупа с 6-8-кратным увеличением;
- тарелки или планшеты со смачиваемой поверхностью, штативы, пробирки (возможно использование пластиковых, вакуумных пробирок одноразового использования);
- стеклянные или пластмассовые палочки и пипетки, предметные и покровные стекла.

1.3. Требования к реагентам

Реагенты для определения групповой и резус принадлежности должны быть стандартны, активны, специфичны, не обладать гемолизирующими свойствами и не вызывать неспецифическую агглютинацию. Прежде чем приступить к исследованию, необходимо произвести макроскопическую оценку диагностических стандартов: реактивы должны быть прозрачными, без осадка и других признаков загрязнения; вскрытые ампулы (флаконы) должны быть закрытыми для предотвращения подсыхания содержимого. Категорически запрещается применять реагенты с истекшим сроком годности. Следует обращать внимание на срок годности реагента после вскрытия ампулы (флакона) (согласно инструкции к реагентам).

Перед выполнением исследований иммунологические стандарты выдерживают при комнатной температуре не менее 1 часа.

В настоящее время для определения групп крови по системе АВО, системе Резус и выявления аллоиммунных антител используются следующие реагенты:

- моноклональные антитела (МКА) для определения групп крови по системе АВО анти-А, анти-В, анти-AB или стандартные сыворотки групп O_{αβ}(I), A_β(II), B_α(III), AB_ο(IV);
 - моноклональные антитела (МКА) для определения резус-принадлежности крови анти-D(IgM), анти-D(IgG), анти-C; анти-E; анти-с; анти-е или стандартные сыворотки анти-резус соответствующей специфичности;
 - антиглобулиновый реагент (AGR) полиспецифический (сыворотка для пробы Кумбса) или моноспецифический АГР;
 - 0,9 % раствор натрия хлорида, 10% раствор желатина;
- Примечание.** Раствор желатина перед употреблением необходимо тщательно осмотреть, если он не застывает в холодильнике, мутный или образует хлопья - желатин к использованию непригоден. Желатин нельзя замораживать.
- панель стандартных эритроцитов для скрининга и идентификации аллоиммунных антител;
 - стандартные эритроциты для определения групп крови по системе АВО перекрестным методом O(I), A₁(II) и B(III) групп и резус-принадлежности (D+) и (D-) эритроциты. Стандартные эритроциты хранят в холодильнике при температуре +(6±2)°С. Срок хранения – до 3 суток.

1.4. Требования к образцам крови

Для исследования используют цельную кровь без консерванта; кровь, стабилизированную любым консервантом; отмытые эритроциты; эритроциты в плазме, сыворотке или физиологическом растворе.

Иммуногематологические исследования могут быть выполнены как с сывороткой, так и с плазмой больного. Хотя при использовании для исследования плазмы существует опасность не выявления слабоактивных антител за счет разведения стабилизирующим раствором.

Если кровь набиралась с консервантом, то для исследования эритроциты необходимо трижды отмыть. Для этого в пробирку с эритроцитами доливают 0,9% физиологический раствор в соотношении 1:10, содержимое пробирки осторожно перемешивают и центрифицируют при 1500 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре. Надсадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой.

Перед процедурой забора крови на иммуногематологические исследования у пациента уточняют его фамилию, имя и отчество. Берут сухую чистую пробирку, на которую наносят следующую информацию о пациенте: Ф.И.О., номер медицинской карты, наименование отделения ЛПУ, результат первичного исследования группы крови по системе АВО, дату забора крови.

Кровь пациента забирают из вены в количестве 5,0-10,0 мл (в зависимости от вида и количества исследований) и переносят в промаркованную пробирку.

Вместе с пробиркой в подтверждающую лабораторию передается направление, в котором указывается: Ф.И.О. пациента, год рождения, номер медицинской карты, отделение ЛПУ, результат первичного исследования группы крови по системе АВО с обязательным указанием наименований, серий и сроков годности диагностических стандартов, дата исследования, фамилия и подпись врача, проводившего определение.

У новорожденных из вены производится забор крови не более 1,5 мл; у детей грудного возраста и старше из вены производится забор крови 1,5-3,0 мл в пробирку без антикоагулянта. Пробирка должна быть промаркована с указанием фамилии и инициалов пациента детского возраста (в случае новорожденных первых часов жизни указывается фамилия и инициалы матери), номера медицинской документации, наименования отделения ЛПУ, результата

первичного исследования группы крови по системе АВО, даты взятия образца крови.

Образец крови для проведения иммуногематологических исследований должен храниться в холодильнике при температуре 4°C не более 48 часов.

Если результаты при первичном и повторном определении группы крови не совпали, проводят первичное и подтверждающее исследования из свежезаготовленного образца крови.

При сомнительном результате повторных иммуногематологических исследований образец крови пациента необходимо направить в специализированную лабораторию Центра крови.

В этом случае следует заготовить свежий образец крови (10 мл) в промаркированную чистую сухую пробирку. Образец крови доставляется с направлением, в котором указывают: Ф.И.О. пациента, год рождения, диагноз, трансфузионный анамнез (кол-во трансфузий и реакции на них) и акушерский анамнез (кол-во беременностей, кол-во родов, ГБН детей, выкидыши, мертворождения, abortion), результаты иммуногематологического исследования крови, полученные в ЛПУ (группа крови по системам АВО, Резус, наличие антиэритроцитарных аллоантител), названия, серии и сроки годности диагностических стандартов, наименование отделения ЛПУ, контактный телефон, дату взятия образца крови, фамилию врача и его подпись.

Примечание. При тестировании не допустимо использовать гемолизированные и хилезные образцы крови. Они должны быть заменены новыми образцами.

1.5. Требования к методикам исследования

Технические описания методик находятся: в данной инструкции «Определение групп крови по системам АВО, резус и иммунных антител»; инструкциях по применению, прилагаемых к реагентам; в соответствующих методических рекомендациях.

Все методики и реагенты, которые используются, для исследований должны быть разрешены в установленном законодательством порядке. Если в работе используются реактивы собственного производства, они должны иметь результаты внешнего контроля качества.

1.6. Квалификационные требования к персоналу

Врачи, врачи-лаборанты, биологи и средний медперсонал, который выполняет иммуногематологические исследования, должны иметь специальную подготовку и соответствующий документ, подтверждающий обучение.

Подготовка специалистов проводится на курсах специализации, на факультетах последипломного образования ВУЗов, на курсах стажировки и информации в Центрах крови.

Предварительный и технический этапы проведения исследований может выполнять подготовленный лаборант под руководством врача. Заключительный контроль и оценка результата проводится только врачами, врачами-лаборантами, биологами.

1.7. Требования к оформлению результатов исследования

В клинических отделениях результат первичного определения группы крови по системе АВО записывается в специальный журнал. Оформляется направление в подтверждающую лабораторию.

В подтверждающей лаборатории результаты определения группы крови, резус-принадлежности, наличие аллоантител записываются в специальный журнал и выдается бланк, на котором указывается результат исследования, дата его проведения, ставится подпись врача, который проводил исследования. Бланк подклеивается в историю болезни, а результат, который указан на этом бланке,

лечащий врач переносит на титульную страницу истории болезни, ставит свою подпись и дату проведения исследования.

Лаборатория выдает результат исследования в том случае, когда совпали результаты при первичном и повторном определении группы крови.

Результаты определения группы крови, резус-принадлежности доноров фиксируются в рабочих журналах и на титульном листе донорской карты с указанием даты и за подписью лиц, проводивших определения, и вносятся в электронную картотеку базы данных доноров.

1.8. Контроль качества

Процедуры контроля качества в определении групп крови следует проводить раздельно для оборудования, методик и реактивов.

Все оборудование, которое используется для иммуногематологических исследований, должно проходить обязательный метрологический контроль с установленной периодичностью.

Необходимо контролировать соблюдение сотрудниками стандартных операционных процедур методик иммуногематологических исследований.

При внутреннем контроле качества реактивов контролируются следующие параметры: определение группы крови по системе АВО перекрестным методом, определение резус-принадлежности, фенотипирование антигенов системы Резус и других систем групп крови. Для контроля используют образцы стандартных эритроцитов. Контролю качества подвергается каждая тестируемая серия, но не реже одного раза в день при использовании одних и тех же иммунологических стандартов.

Результаты ежедневного контроля качества заносятся в рабочие журналы с указанием названий, серий используемых реагентов, сроком их годности.

Лаборатории, осуществляющие иммуногематологические исследования, должны принимать участие в системе внешней оценки контроля качества.

II. ИНСТРУКЦИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГРУПП КРОВИ ПО СИСТЕМЕ АВО

Группа крови человека по системе АВО - это набор групповых антигенов А и В и естественных анти-А (α) и анти-В (β) антител. Антигенная структура эритроцитов (фенотип) определена генотипом и не меняется в течение жизни.

Групповые антигены А и В - это структурные образования, расположенные на внешней поверхности мембранных эритроцитов, обладающие способностью взаимодействовать с соответствующими антителами и образовывать комплекс антиген-антитело. Групповые антигены А и В обладают высокой иммуногенностью, что и определяет их клиническое значение в развитии немедленных посттрансфузионных осложнений гемолитического типа.

Система АВО включает четыре группы крови. В группе 0(I) на эритроцитах отсутствуют оба антигена, в группе A(II) — на эритроцитах присутствует только антиген А, в группе B(III) — на эритроцитах присутствует только антиген В и в группе AB(IV) — на эритроцитах одновременно присутствуют оба антигена — А и В.

В норме у неиммунизированных людей в плазме имеются естественные антитела к отсутствующему антигену: у лиц группы 0(I) обнаруживаются антитела против обоих антигенов А и В; у лиц группы A(II) — анти-В (β) антитела; у лиц группы B(III) — антитела анти-А (α) и, наконец, у лиц группы AB(IV) антитела этой системы в плазме отсутствуют.

Естественные анти-А (α) и анти-В (β) антитела - это иммуноглобулины класса IgM, которые постоянно находятся в сыворотке крови человека без всякого иммунного стимула. Они являются врожденными (регулярными) и не меняются в течение жизни.

Следует иметь в виду, что существуют разновидности как антигена В, так и, в большей степени, антигена А. Наиболее частыми разновидностями А антигена являются A_1 и A_2 . Эритроциты подгруппы A_2 обладают пониженными агглютинабельными свойствами. Слабо выраженная агглютинация может оставаться незамеченной, и лица подгруппы A_2 (II) могут быть ошибочно отнесены к группе O(I), а лица с подгруппой A_2B (IV) могут быть причислены к группе B(III). Антиген A_2 встречается примерно у 1% людей групп A(II) и у 20% AB(IV).

У части людей групп A_2 (II) (1-8%) и A_2B (IV) (22-35%) в сыворотке крови присутствуют антитела против антигена A_1 (экстраагглютинины). Они не активны при 37°C и клинического значения не имеют, однако вызывают агглютинацию эритроцитов при перекрестном определении группы крови и проведении проб на индивидуальную совместимость крови донора и реципиента.

При обнаружении анти- A_1 антител у таких лиц полезно подтвердить наличие антигена A_2 специальными реагентами (моноклональный реагент против антигена A_1 или анти- A_1 (лектин)), агглютинирующими только A_1 эритроциты.

Различные сочетания групповых антигенов эритроцитов и антител сыворотки образуют четыре группы крови:

- 1) $O_{\alpha\beta}$ (I);
- 2) A_{β} (II) с подгруппами $A_{1\beta}$ (II) и $A_{2\beta}$ (II);
- 3) B_{α} (III);
- 4) AB_o (IV) с подгруппами A_1B_o (IV) и A_2B_o (IV).

В связи с тем, что совместимость по системе АBO наиболее важна при осуществлении гемотрансфузий, установление группы крови по системе АBO необходимо производить перекрестным методом, т.е. по антигенам эритроцитов и по антителам в плазме (сыворотке). Перекрестное исследование антигенов эритроцитов и антител в сыворотке обязательно и у доноров, и у реципиентов.

У детей до 4 месяцев природные антитела системы АBO в плазме могут частично или полностью отсутствовать, поэтому определение группы крови проводят только по антигенам эритроцитов (с помощью стандартных сывороток и моноклональных антител). У детей старше 4 месяцев группа крови, как и у взрослых, определяется перекрестным методом.

Определение группы крови по системе АBO - это идентификация антигенов и антител с помощью иммунологических стандартов:

I. Прямым методом на эритроцитах определяют наличие антигенов А и В с помощью:

- 1) стандартных сывороток;
- 2) моноклональных антител.

II. Перекрестным методом в сыворотке определяют наличие антител анти-А (α) и анти-В (β) с помощью стандартных эритроцитов известной группы крови.

2.1. Определение группы крови по системе АВО с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток

Определение группы крови при помощи стандартных изогемагглютинирующих сывороток заключается в выявлении групповых антигенов на эритроцитах исследуемой крови в реакции прямой агглютинации.

Специальные реагенты и оборудование:

- стандартные изогемагглютинирующие сыворотки $O_{\alpha\beta}$ (I), A_{β} (II), B_{α} (III) групп двух серий и стандартная сыворотка AB_o (IV);
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- белые тарелки, пластины или планшеты со смачиваемой поверхностью, штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

2.1.1. Техника определения групп крови по системе АВО с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Под соответствующими обозначениями нанести по одной большой капле (0,1 мл) каждой сыворотки двух серий, которые образуют два ряда по три капли в следующем порядке $O_{\alpha\beta}$ (I), A_{β} (II), B_{α} (III). На каждую серию сывороток используют отдельную пипетку.
2. Рядом с каплями сыворотки нанести по одной маленькой капле (0,01 мл) исследуемой крови (эритроцитов).
3. Перемешать каждую каплю исследуемой крови (эритроцитов) с соответствующей сывороткой отдельными стеклянными палочками. Можно перемешивать кровь с сывороткой одной и той же палочкой, но в этом случае необходимо после размешивания каждой капли промывать палочку в стакане с физиологическим раствором и насухо её вытирать.
4. После размешивания всех капель пластинку покачивают, затем на 1-2 минуты оставляют в покое и снова периодически покачивают.
5. Наблюдение за ходом реакции проводят не менее пяти минут. Хотя агглютинация начинается в течение первых 10-30 секунд, наблюдение следует вести и далее - до пяти минут ввиду возможности более поздней агглютинации, например, с антигеном A_2 .
6. По мере наступления агглютинации, но не ранее чем через 3 минуты, в капли смеси сыворотки с эритроцитами, в которых наступила агглютинация добавляют по одной капле (0,05 мл) изотонического раствора натрия хлорида для разрушения иногда наступающей ложной агглютинации - неспецифического склеивания эритроцитов, в том числе в так называемые «монетные столбики», и продолжают наблюдение при периодическом покачивании пластинки до истечения 5 минут.
7. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

2.1.2. Трактовка результатов реакции при определении групп крови по системе АВО с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток

Реакция изогемагглютинации в каждой капле может быть положительной или отрицательной.

При положительной реакции обычно в течение первых 10-30 секунд от начала перемешивания в смеси появляются видимые невооруженным глазом мелкие красные зёрнышки (агглютинаты), состоящие из склеенных эритроцитов. Мелкие зёрнышки постепенно сливаются в более крупные, а иногда в хлопья неправильной формы. При этом сыворотка полностью или частично обесцвечивается.

При отрицательной реакции жидкость все время (5 минут) остается равномерно окрашенной в красный цвет и в ней не обнаруживается никакой зернистости (агглютинатов).

Результаты реакций в каплях с сывороткой одной и той же группы (двух серий) должны совпадать.

Результаты с сыворотками трех групп: $O_{\alpha\beta}$ (I), A_{β} (II), B_{α} (III) могут дать четыре различные комбинации (табл.1).

Таблица 1

Трактовка результатов определения групп крови по системе АВО с помощью изогемагглютинирующих сывороток двух серий каждой группы

Результат реакции с изогемагглютинирующими сыворотками группы:			Исследуемая кровь принадлежит к группе
$O_{\alpha\beta}$ (I)	A_{β} (II)	B_{α} (III)	
-	-	-	$O(I)$
+	-	+	$A(II)$
+	+	-	$B(III)$
+	+	+	$AB(IV)$
Контроль с сывороткой группы AB_o (IV) -			

Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации, знаком минус (-) - отсутствие агглютинации

- Если сыворотки всех трех групп дали отрицательную реакцию, т.е. все смеси остались равномерно окрашенными в красный цвет без признаков агглютинации, это значит, что кровь не содержит антигенов А и В, т.е. принадлежит к группе $O(I)$.
- Если сыворотки групп $O_{\alpha\beta}$ (I) и B_{α} (III) дали положительную реакцию, а сыворотка группы A_{β} (II) - отрицательную, это значит, что кровь содержит антиген А, т.е. принадлежит к группе $A(II)$.
- Если сыворотки групп $O_{\alpha\beta}$ (I) и A_{β} (II) дали положительную реакцию, а сыворотка группы B_{α} (III) - отрицательную, то исследуемая кровь содержит антиген В, т.е. принадлежит к группе $B(III)$.
- Если сыворотки всех трех групп дали положительную реакцию, это указывает на то, что исследуемая кровь содержит оба антигена - А и В и принадлежит к группе $AB(IV)$. Однако в этом случае для исключения неспецифической агглютинации исследуемых эритроцитов необходимо провести контроль специфичности реакции агглютинации со стандартной сывороткой группы AB_o (IV).

Для этого на пластинку наносят большую каплю (0,1 мл) сыворотки группы AB_o (IV) и к ней добавляют маленькую (0,01 мл) каплю исследуемой крови (эритроцитов). Сыворотку и кровь перемешивают, после чего наблюдают за результатом в течение 5 минут при периодическом покачивании пластиинки. Лишь отсутствие агглютинации в этой капле, при наличии ее в каплях, содержащих стандартные сыворотки групп $O_{\alpha\beta}$ (I), A_{β} (II) и B_{α} (III), позволяет считать реакцию специфической и отнести исследуемую кровь к группе $AB(IV)$.

2.2. Определение групп крови по системе АВО перекрестным методом с

помощью

стандартных изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов

Определение группы крови перекрёстным методом заключается в одновременном выявлении групповых антигенов на эритроцитах исследуемой крови с помощью стандартных сывороток и групповых антител в сыворотке с помощью стандартных эритроцитов в реакции прямой агглютинации.

Специальные реагенты и оборудование:

- стандартные изогемагглютинирующие сыворотки $O_{\alpha\beta}(I)$, $A_{\beta}(II)$, $B_{\alpha}(III)$ групп двух серий и стандартная сыворотка $AB_{\alpha}(IV)$;
- стандартные эритроциты групп $O(I)$, $A_1(II)$ и $B(III)$;
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- белые тарелки, пластины или планшеты со смачиваемой поверхностью, штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки, предметные и покровные стекла;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- лабораторная центрифуга;
- микроскоп;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

2.2.1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Для приготовления стандартных эритроцитов используют кровь без консерванта или кровь, стабилизированную любым консервантом. Маркируют чистые сухие пробирки. В одну пробирку отбирают кровь 3-5 доноров $O(I)$, в другую 3-5 доноров $A(II)$, в третью 3-5 доноров $B(III)$ так, чтобы в пробирках получилась смесь крови доноров в количестве 0,5-2 мл.

Далее в пробирки добавляют изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, осторожно перемешивают содержимое пробирок и центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют трижды, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используются в качестве стандартов. К отмытым стандартным эритроцитам добавляют 0,9% раствор натрия хлорида до начального объема крови. Содержимое пробирок тщательно перемешивают для получения равномерной взвеси стандартных эритроцитов.

Необходимо проводить контрольное исследование приготовленных стандартных эритроцитов при помощи стандартных сывороток или моноклональных антител.

Примечание. Отмытые стандартные эритроциты не должны содержать сгустки крови. Не допускается использование лизированных стандартных эритроцитов.

2.2.2. Техника определения групп крови по системе АВО перекрестным методом с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Под соответствующими обозначениями наносят по одной большой капле (0,1 мл) каждой сыворотки двух серий, которые образуют два ряда по три капли в следующем порядке $O_{\alpha\beta}$ (I), A_β (II), B_α (III). На каждую серию сывороток используют отдельную пипетку.

2. На нижнюю часть пластинки (третий ряд) под соответствующими обозначениями наносят по одной маленькой капле (0,01 мл) стандартных эритроцитов в следующем порядке слева направо: O (I), A_1 (II) и B (III).

3. Из пробирки с исследуемым образцом крови пипеткой извлекают сыворотку (осторожно, чтобы не взболтать эритроциты) и наносят ее по одной большой капле (0,1 мл) рядом со стандартными эритроцитами.

Этой же пипеткой набирают со дна пробирки эритроциты исследуемой крови и наносят их по маленькой капле (0,01 мл) рядом с каждой каплей подготовленной стандартной сыворотки.

4. Во всех каплях сыворотку тщательно перемешивают с эритроцитами (чистой стеклянной палочкой), пластинку покачивают, затем на 1-2 минуты оставляют в покое и снова периодически покачивают. Наблюдение за ходом реакции проводят не менее 5 минут.

5. По мере наступления агглютинации, но не ранее чем через 3 минуты в те капли, в которых она наступила, добавляют по одной капле изотонического раствора натрия хлорида и продолжают наблюдение при покачивании пластинки до истечения 5 минут.

6. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

2.2.3. Трактовка результатов определения групп крови по системе АВО перекрестным методом с помощью изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов

Трактовку результатов реакций проводят по оценке и сопоставлению результатов, полученных при помощи стандартных сывороток (два верхних ряда) и при помощи стандартных эритроцитов (нижний ряд).

Результаты реакций, полученных при помощи стандартных сывороток и стандартных эритроцитов, должны совпадать - указывать на наличие антигенов и антител одной и той же группы. Возможны четыре разных комбинации результатов (табл. 2).

Таблица 2

Трактовка результатов при определении групп крови по системе АВО перекрестным методом с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов

Результат реакции с изогемагглютинирующими сыворотками группы:			Реакция исследуемой сыворотки со стандартными эритроцитами групп			Исследуемая кровь принадлежит к группе
$O_{\alpha\beta}$ (I)	A_β (II)	B_α (III)	O (I)	A_1 (II)	B (III)	
-	-	-	-	+	+	O (I)
+	-	+	-	-	+	A (II)
+	+	-	-	+	-	B (III)
+	+	+	-	-	-	AB (IV)
Контроль с сывороткой группы AB_o (IV) -						

Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации, знаком минус (-) - отсутствие агглютинации

1. Отсутствие агглютинации со стандартными сыворотками двух серий (два верхних ряда) указывает на отсутствие групповых антигенов А и В, при этом сыворотка исследуемой крови (нижний ряд) дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами группы О(I) и положительную - с эритроцитами групп А₁(II) и В(III), что указывает на наличие в исследуемой крови антител анти-А и анти-В, т.е. подтверждает принадлежность исследуемой крови к группе О(I).

2. Наличие агглютинации со стандартными сыворотками групп О_{αβ}(I) и В_α(III) двух серий (два верхних ряда) указывает на то, что в исследуемых эритроцитах имеется антиген А, а агглютинация со стандартными эритроцитами (нижний ряд) группы В(III) указывает на наличие в исследуемой сыворотке антител анти-В. Следовательно, кровь относится к группе А(II).

3. Наличие агглютинации со стандартными сыворотками групп О_{αβ}(I) и А_β(II) двух серий (два верхних ряда) и со стандартными эритроцитами (нижний ряд) группы А₁(II) указывает на то, что в исследуемых эритроцитах имеется антиген В, а в исследуемой сыворотке антитела анти-А. Следовательно кровь относится к группе В(III).

4. При помощи стандартных сывороток двух серий (два верхних ряда) в исследуемой крови устанавливается наличие антигенов А и В. При этом сыворотка исследуемой крови дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами (нижний ряд) всех трех групп, что указывает на отсутствие антител в исследуемой крови, т.е. подтверждает принадлежность испытуемой крови к группе AB(IV).

Примечание. При определении группы крови AB(IV) необходимо провести контрольное исследование эритроцитов с сывороткой AB_o(IV) для исключения неспецифической агглютинации исследуемых эритроцитов. Подтверждением принадлежности к этой группе является отсутствие агглютинации с сывороткой AB_o(IV).

При наличии неспецифической (спонтанной) агглютинации в контролльном исследовании рекомендуется провести повторное определение группы крови после отмывания эритроцитов исследуемого образца крови физиологическим раствором. Если после 3-х кратного отмывания эритроцитов группу крови определить не удалось, следует заново набрать кровь в сухую промаркированную пробирку и доставить образец с направлением в специализированную лабораторию учреждения службы крови.

2.3. Определения групп крови по системе АВО с помощью моноклональных антител

Моноклональные реагенты анти-А, анти-В, анти-AB предназначены для определения групп крови человека по системе АВО в прямой реакции агглютинации и применяются взамен или параллельно со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками. Моноклональные анти-А и анти-В антитела производятся двумя мышевыми гибридомами, и принадлежат к иммуноглобулинам класса М. Реагент анти-AB представляет собой смесь моноклональных анти-А и анти-В антител. Технология изготовления реагента исключает возможность его контаминации патогенными для человека вирусами.

Типирование антигенов крови по системе АВО должно проводиться двумя сериями реагентов анти-А и анти-В, либо одной серией каждого реагента, если используется и реагент анти-AB, который является дополнительным контролем правильности определения группы крови.

Специальные реагенты и оборудование:

- моноклональные антитела анти-А, анти-В, анти-АВ;
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- белые тарелки, пластины или планшеты со смачиваемой поверхностью, штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

2.3.1. Техника определения групп крови по системе АВО с помощью моноклональных антител

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Наносят на планшет или пластину индивидуальными пипетками МКА анти-А, анти-В и анти-АВ по одной большой капле (0,1 мл) под соответствующими надписями.
2. Рядом с каплями антител наносят по одной маленькой капле (0,01-0,02 мл) исследуемой крови.
3. Тщательно перемешивают реагент с кровью чистой стеклянной палочкой.
4. Наблюдают за ходом реакции визуально при легком покачивании пластины или планшета в течение 3-5 минут (согласно инструкции). Агглютинация эритроцитов обычно наступает в первые 3-6 секунд, но наблюдение следует вести 3-5 минут ввиду более позднего появления агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности антигенов А или В.
5. Оценивают результат реакции. Положительный результат выражается в агглютинации (склеивании) эритроцитов. Агглютинаты видны невооруженным глазом в виде мелких красных агрегатов, быстро сливающихся в крупные хлопья. При отрицательной реакции капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинаты в ней не обнаруживаются.
6. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

2.3.2. Трактовка результатов при определении групп крови по системе АВО с помощью моноклональных антител

Возможны четыре разных комбинации результатов (табл. 3).

Таблица 3

Трактовка результатов при определении групп крови по системе АВО с помощью моноклональных антител

Результат реакции с МКА:			Исследуемая кровь принадлежит к группе
анти-А	анти-В	анти-АВ	
–	–	–	O(I)
+	–	+	A(II)
–	+	+	B(III)
+	+	+	AB(IV)
Контроль с изотоническим раствором NaCl –			

Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации, знаком минус (–) - отсутствие агглютинации.

1. Отсутствие агглютинации с реагентами анти-А, анти-В, анти-АВ указывает на то, что исследуемые эритроциты не имеют антигенов А и В, следовательно, кровь принадлежит к группе 0(I).
2. Наличие агглютинации с реагентами анти-А и анти-АВ указывает на то, что в исследуемых эритроцитах имеется антиген А – кровь принадлежит к группе A(II).
3. Наличие агглютинации с реагентами анти-В и анти-АВ указывает на то, что в исследуемых эритроцитах имеется антиген В – кровь принадлежит к группе B(III).
4. Агглютинация с реагентами анти-А, анти-В, анти-АВ указывает на то, что в исследуемых эритроцитах устанавливается наличие антигенов А и В – кровь принадлежит к группе AB(IV).

Примечание. При установлении группы крови AB(IV), необходимо провести дополнительное контрольное исследование эритроцитов с 0,9% раствором натрия хлорида. Для этого необходимо смешать на плоскости одну каплю исследуемой (крови) эритроцитов 0,01 мл, с каплей физиологического раствора 0,1 мл. Наблюдать за ходом реакции 3-5 минут. Кровь можно отнести к группе AB(IV) только при отсутствии агглютинации эритроцитов в физиологическом растворе.

При наличии неспецифической агглютинации (положительная реакция в контрольной капле) рекомендуется повторить определение группы крови, используя отмытые эритроциты данного образца крови.

2.4. Определение групп крови по системе АВО перекрестным методом с помощью

моноклональных антител и стандартных эритроцитов

Определение группы крови перекрёстным методом заключается в одновременном выявлении групповых антигенов на эритроцитах испытуемой крови с помощью моноклональных антител и групповых антител в сыворотке с помощью стандартных эритроцитов в реакции прямой агглютинации.

Специальные реагенты и оборудование:

- моноклональные антитела анти-А, анти-В, анти-АВ;
- стандартные эритроциты групп О(I), А₁(II) и В(III);
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- белые тарелки, пластины или планшеты со смачиваемой поверхностью, штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки, предметные и покровные стекла;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- лабораторная центрифуга;
- микроскоп;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

2.4.1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Для приготовления стандартных эритроцитов используют кровь без консерванта или кровь, стабилизированную любым консервантом. Маркируют чистые сухие пробирки. В одну пробирку отбирают кровь 3-5 доноров О(I), в другую 3-5 доноров А(II), в третью 3-5 доноров В(III) так, чтобы в пробирках получилась смесь крови доноров в количестве 0,5-2 мл.

Далее в пробирки добавляют изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, осторожно перемешивают содержимое пробирок и

центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют трижды, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используются в качестве стандартов. К отмытым стандартным эритроцитам добавляют 0,9% раствор натрия хлорида до начального объема крови. Содержимое пробирок тщательно перемешивают для получения равномерной взвеси стандартных эритроцитов.

Необходимо проводить контрольное исследование приготовленных стандартных эритроцитов при помощи стандартных сывороток или моноклональных антител.

Примечание. Отмытые стандартные эритроциты не должны содержать сгустки крови. Не допускается использование лизированных стандартных эритроцитов.

2.4.2. Техника определения групп крови по системе АВО перекрестным методом с помощью моноклональных антител и стандартных эритроцитов

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Наносят на планшет или пластину индивидуальными пипетками МКА анти-А, анти-В и анти-АВ по одной большой капле (0,1 мл) под соответствующими надписями.
2. На нижнюю часть пластиинки или планшета (второй ряд) под соответствующими обозначениями наносят по одной маленькой капле (0,01 мл) стандартных эритроцитов в следующем порядке слева направо: O(I), A₁(II) и B(III).
3. Из пробирки с исследуемым образцом крови пипеткой извлекают сыворотку (осторожно, чтобы не взболтать эритроциты) и накапывают ее по одной большой капле (0,1 мл) рядом со стандартными эритроцитами. Этой же пипеткой набирают со дна пробирки эритроциты исследуемой крови и наносят их по маленькой капле (0,01 мл) рядом с каждой каплей подготовленных МКА.
4. Во всех каплях реагенты тщательно перемешивают с эритроцитами, а стандартные эритроциты с исследуемой сывороткой (сухой стеклянной палочкой), пластиинку покачивают, затем на 1-2 минуты оставляют в покое и снова периодически покачивают. Наблюдение за ходом реакции проводят не менее 5 минут.
5. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

2.4.3. Трактовка результатов определения групп крови по системе АВО перекрестным методом с помощью моноклональных антител и стандартных эритроцитов

Результат реакции в каждой капле может быть положительным или отрицательным. Положительный результат выражается в агглютинации (склеивании) эритроцитов. Агглютинаты видны невооруженным глазом в виде мелких красных агрегатов, быстро сливающихся в крупные хлопья. При отрицательной реакции капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинаты в ней не обнаруживаются.

Трактовку результатов реакций проводят по оценке и сопоставлению результатов, полученных при помощи моноклональных антител анти-А, анти-В, анти-АВ и при помощи стандартных эритроцитов.

Результаты реакций, полученных при помощи реагентов и стандартных эритроцитов, должны совпадать - указывать на наличие антигенов и антител одной и той же группы. Возможны четыре разных комбинации результатов (таблица 4).

**Трактовка результатов при определении групп крови по системе АВО
перекрестным методом с помощью моноклональных антител и стандартных
эритроцитов**

Результат реакции с МКА:			Реакция исследуемой сыворотки со стандартными эритроцитами групп			Исследуемая кровь принадлежит к группе
анти-А	анти-В	анти-AB	O(I)	A ₁ (II)	B(III)	
-	-	-	-	+	+	O(I)
+	-	+	-	-	+	A(II)
-	+	+	-	+	-	B(III)
+	+	+	-	-	-	AB(IV)
Контроль с изотоническим раствором NaCl -						

Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации,
знаком минус (-) - отсутствие агглютинации

1. Отсутствие агглютинации с реагентами анти-А, анти-В, анти-AB указывает на то, что исследуемые эритроциты не имеют антигенов А и В, а агглютинация со стандартными эритроцитами групп A₁(II) и B(III) подтверждает наличие антител анти-А и анти-В в исследуемой сыворотке – кровь принадлежит к группе O(I).
2. Наличие агглютинации с реагентами анти-А и анти-AB указывает на то, что в исследуемых эритроцитах имеется антиген А, а агглютинация со стандартными эритроцитами группы B(III) подтверждает наличие антител анти-В в исследуемой сыворотке – кровь принадлежит к группе A(II).
3. Наличие агглютинации с реагентами анти-В и анти-AB указывает на то, что в исследуемых эритроцитах имеется антиген В, а агглютинация со стандартными эритроцитами группы A₁(II) подтверждает наличие антител анти-А в исследуемой сыворотке – кровь принадлежит к группе B(III).
4. Агглютинация с реагентами анти-А, анти-В, анти-AB указывает на то, что в исследуемых эритроцитах устанавливается наличие антигенов А и В, а отсутствие агглютинации со стандартными эритроцитами групп A₁(II) и B(III) подтверждает отсутствие антител анти-А и анти-В в исследуемой сыворотке – кровь принадлежит к группе AB(IV).

Примечание. При установлении группы крови AB(IV), необходимо провести дополнительное контрольное исследование эритроцитов с изотоническим раствором натрия хлорида. Для этого необходимо смешать на плоскости одну маленькую каплю (0,01мл) исследуемой крови (эритроцитов) с большой каплей (0,1мл) физиологического раствора. Наблюдать за ходом реакции 3-5 минут. Кровь можно отнести к группе AB(IV) только при отсутствии агглютинации эритроцитов в физиологическом растворе.

При наличии неспецифической (спонтанной) агглютинации в контролльном исследовании рекомендуется провести повторное определение группы крови после 3-х кратного отмывания эритроцитов исследуемого образца крови. Если после отмывания эритроцитов группу крови определить не удалось, следует заново набрать кровь в сухую промаркованную пробирку и доставить образец в специализированную лабораторию учреждения службы крови.

В случае расхождения результатов определения группы крови с помощью моноклональных антител и стандартных эритроцитов как у реципиентов, так и у

доноров, кровь также необходимо направить для проведения исследования в условиях специализированной лаборатории.

2.5. Причины ошибок при определении групп крови по системе АВО и меры их предупреждения

Ошибки при определении групп крови могут зависеть от трёх причин:

- I. Технических.
- II. Неполноценности стандартных сывороток и стандартных эритроцитов.
- III. Биологических особенностей исследуемой крови.

I. К ошибкам по техническим причинам относят:

- 1) неправильный порядок расположения реагентов в штативах или на планшете, поэтому каждый раз при определении группы крови следует проверять расположение реагентов;
- 2) неправильное количественное соотношение реагентов и исследуемых эритроцитов. Оптимальное для реакции агглютинации соотношение эритроцитов и тестовых реагентов - 1:10 при использовании гемагглютинирующих сывороток и 2-3:10 при использовании моноклональных антител. При значительном избытке эритроцитов агглютинация может быть не замечена, особенно в тех случаях, когда агглютинационные свойства эритроцитов снижены - подгруппа A₂. При недостаточном количестве эритроцитов агглютинация медленно появляется, что также может привести к неправильной трактовке результатов в случае исследования эритроцитов со слабой агглютинабельностью;
- 3) применение недостаточно чистых планшетов, палочек и других предметов, соприкасающихся с кровью. Нужно избегать загрязнения стандартных реагентов реагентами другой группы, поэтому для каждого реагента должна быть отдельная пипетка, для промывания пипеток следует применять только изотонический раствор натрия хлорида;
- 4) неправильная маркировка реагентов, стандартных эритроцитов, образцов исследуемой крови. Не допускается доставка в лабораторию непромаркированных пробирок с образцами для иммуногематологических исследований;
- 5) неправильная запись результатов исследования, поэтому нужно записывать результаты реакции немедленно после определения;
- 6) несоблюдение положенного для реакции агглютинации времени. Агглютинация эритроцитов появляется в течение первых 10 с, однако наблюдение за ходом реакции следует проводить не менее 5 мин, особенно внимательно наблюдая за каплями, в которых агглютинация не появилась. Это позволяет выявить слабый антиген A₂, характеризующийся замедленной агглютинацией. При учете реакции после 5 минут может произойти подсыхание капель по краям, имитирующее агглютинацию, что также приведет к ошибочному заключению;
- 7) присутствие агглютинации при температуре окружающего воздуха ниже 15°C, поскольку исследуемая кровь может содержать поливалентные холодовые антитела, вызывающие неспецифическое склеивание эритроцитов при пониженной температуре (при фактическом отсутствии агглютинации). При температуре окружающего воздуха выше 25°C агглютинация может отсутствовать (когда агглютинация фактически должна присутствовать);
- 8) неправильное центрифugирование: недостаточное может привести к ложноотрицательному результату, а избыточное – к ложноположительному.

II. Ошибки, зависящие от применения неполноценных стандартных сывороток и стандартных эритроцитов:

- 1) слабые стандартные сыворотки с титром ниже, чем 1:32 или с истекшим сроком годности могут вызывать позднюю и слабую агглютинацию;
- 2) применение негодных стандартных сывороток или эритроцитов, которые были приготовлены нестерильно и недостаточно законсервированы, ведет к возникновению неспецифической «бактериальной» агглютинации.

III. Ошибки, зависящие от биологических особенностей исследуемой крови

1. Ошибки, зависящие от биологических особенностей исследуемых эритроцитов:

1) поздняя и слабая агглютинация объясняется слабыми формами антигенов эритроцитов, чаще – наличием в группах A(II) и AB(IV) слабого антигена A₂. При этом в случае определения группы крови без исследования сыворотки на наличие антител (простая реакция) могут наблюдаться ошибки, вследствие которых кровь группы A₂ определяют как группу 0(I), а кровь группы A₂B определяют как группу B(III). Поэтому, во избежание ошибок, определение группы крови как доноров, так и реципиентов необходимо проводить с использованием стандартных эритроцитов (двойная или перекрестная реакция). Для идентификации антигена A₂ рекомендуется повторить исследование с другими видами (сериями) реагентов, используя другую посуду, с увеличением времени регистрации реакции.

Примечание. Специфическими реагентами уточнения группы крови при наличии слабых вариантов антигена A (A₁, A₂, A₃ и т.д.) методом прямой реакции агглютинации являются цоликлоны анти-A₁, анти-A₁(лекチン) и анти-A_{сл.}.

2) «панагглютинация», «аутоагглютинация» эритроцитов, т.е. способность крови давать одинаковую неспецифическую агглютинацию со всеми сыворотками и даже со своей собственной. Это явление наиболее часто встречается у гематологических, онкологических, обожженных больных и др. В этом случае необходимо провести контрольное исследование эритроцитов данного образца со стандартной сывороткой AB(IV) группы (если типирование осуществлялось иммунными сыворотками) или с изотоническим раствором натрия хлорида (если использовали моноклональные реагенты). Панагглютинацию можно устраниćь после трехкратного отмывания эритроцитов, но не всегда. В этом случае определение группы крови необходимо производить при температуре 37°C, для чего используют реактивы, изотонический раствор и планшет, предварительно подогретые. Для устранения неспецифической агглютинации планшет помещают в термостат при температуре 37°C на 5 минут, после чего неспецифическая агглютинация исчезает, а истинная остается. Если отмывание эритроцитов не дает желаемого результата, т.е. группу крови больного установить не удается, заключение о групповой принадлежности крови не выдают. Необходимо произвести повторное взятие образца крови в предварительно согретую пробирку, поместить пробирку в термоконтейнер для поддержания температуры 37°C и доставить в специализированную лабораторию на исследование.

3) образование «монетных столбиков» может быть принято за агглютинацию. В этом случае при добавлении 1-2 капель физиологического раствора и покачивании пластиинки ложная агглютинация обычно исчезает;

4) смешанная или неполная агглютинация («кровяная химера»), когда часть эритроцитов собраны в агглютинаты, а часть остается свободной. Наблюдается у пациентов групп A(II), B(III) и AB(IV) после трансплантации костного мозга или в течение первых трех месяцев после переливания крови группы 0(I), реже – у

разногруппных близнецов. Тщательный анамнез быстро выявляет такую ситуацию.

2.Ошибки, зависящие от биологических особенностей исследуемой сыворотки:

- 1) стандартные эритроциты в присутствии исследуемой сыворотки образуют «монетные столбики», что имитирует положительный результат. Для дифференцировки «монетных столбиков» и истинных агглютинатов добавляют 1-2 капли изотонического раствора натрия хлорида и покачивают планшет, при этом «монетные столбики» разрушаются. Аномальный результат необходимо подтвердить, используя стандартные эритроциты группы 0(I).
- 2) в сыворотке отсутствуют анти-А или анти-В антитела, что наблюдается у новорожденных, а также у пациентов с тяжелыми нарушениями иммунной системы. Заключение о группе крови делается по результатам исследования антигенов эритроцитов.
- 3) в сыворотке присутствуют антитела другой специфичности или избыточные антитела (например анти-A1 у людей со слабым A2 антигеном). При невозможности определить специфичность антител и подобрать типированные эритроциты пробы на совместимость является в таких случаях единственным критерием для подбора крови.
- 4) агглютинация стандартных эритроцитов, в том числе и 0(I) группы в присутствии исследуемой сыворотки, связана с присутствием специфических и неспецифических холодовых антител. Исчезновение агглютинации при проведении исследования при температуре 37°C верифицирует неспецифические холодовые агглютинины. Если исследуемая сыворотка взаимодействует с некоторыми образцами эритроцитов группы 0(I) – это свидетельствует о присутствии в сыворотке специфических холодовых антител.

III. ИНСТРУКЦИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ.

Система Резус - одна из наиболее полиморфных антигенных систем эритроцитов человека. Она включает около 50 серологически различных антигенов, не считая слабых, переходных и парциальных форм. На эритроцитах человека имеются 5 основных антигенов системы Резус (D, C, c, E, e). В отличие от системы АВО, в сыворотке крови человека практически не бывает природных антител к антигенам системы Резус. Антитела системы Резус имеют исключительно иммунный характер и образуются в результате резус-несовместимой трансфузии или беременности.

В трансфузиологической практике подлежат учету, в первую очередь, три антигена - D(Rh_0), C(rh') и E(rh''). Наибольшее клиническое значение имеет антиген-D, который и подразумевается под термином резус-фактор. Обладая выраженным иммуногенными свойствами, антиген D в 95% является причиной гемолитической болезни новорожденных, а также причиной тяжелых посттрансфузионных осложнений.

Иммуногенность других (минорных) антигенов системы Резус значительно ниже и убывает в следующем порядке: c>E>C>e.

Наличие или отсутствие антигена-D определяет резус-принадлежность крови реципиентов: лица, содержащие D-антigen, принадлежат к группе резус-положительных (среди лиц белой расы их приблизительно 85%); лица, не содержащие D-антigen, относятся к резус-отрицательным (их, соответственно, около 15%) (табл. 5).

Таблица 5

Наиболее распространенные группы крови по системе Резус

Резус-положительные (Rh+) 85%	Резус-отрицательные (Rh-) 15%
CDE (Rh_0''')	cde (rh_0)
CDe (Rh_0')	Cde (rh')
cDE (Rh_0'')	cdE (rh'')
cDe (Rh_0)	CdE ($rh' rh''$)

Характерной особенностью антигенов системы Резус является полиморфизм, который обуславливает наличие большого количества разновидностей антигенов.

Антиген D имеет слабые варианты, объединяемые в группу D^U , численность которой составляет около 1% популяции.

Рецipiенты, содержащие антиген D^U , должны быть отнесены к резус-отрицательным и им должна быть перелита только резус-отрицательная кровь, так как нормальный антиген D может вызвать у таких лиц иммунный ответ. Поэтому кровь реципиентов обязательно тестировать на присутствие D^U .

Доноры, содержащие антиген D^U , должны быть отнесены к резус-положительным, так как переливание их крови сенсибилизированным к D-антителу резус-отрицательным реципиентам может вызывать тяжелые трансфузионные реакции. Кровь доноров должна обязательно тестироваться на присутствие D^U и, в случае его обнаружения, быть отнесеной к резус-положительной.

Беременным, у которых выявлен антиген- D^U , должны проводиться исследования на наличие аллоантител и профилактика иммуноглобулином анти-резус также, как и резус-отрицательным беременным.

Определение антигена- D^U у новорожденных от резус-отрицательной матери является обязательным. Его выявление служит показателем для назначения матери иммуноглобулина анти-резус.

Эритроциты D^U не всегда определяются моноклональными антителами или желатиновым методом. Для их определения следует использовать неполные анти-резус антитела в реакции агглютинации с антиглобулиновым реагентом (непрямая проба Кумбса).

Большинство резус-отрицательных лиц имеет фенотип dce, однако 2-5% лиц, не несущих на эритроцитах антигена-D и резус-отрицательных по определению, имеют фенотип dCe или dcE. Такие эритроциты могут вызывать иммунный ответ при переливании их реципиентам с группой dce. Поэтому для определения резус-принадлежности крови доноров недостаточно разделения их только на резус-положительных и резус-отрицательных по антигену-D, а необходимо дополнительно исследовать кровь D-отрицательных доноров с помощью моноклональных антител или/и стандартных сывороток анти-C и анти-E. Допускается применение полиспецифических сывороток или реагентов анти-DCE, анти-DC или анти-DE.

В число резус-отрицательных доноров зачисляются только лица, кровь которых не содержит ни одного из трех антигенов системы Резус D, C, E.

При последующих кроводачах, если резус-принадлежность донора определена дважды на образцах крови, взятых от разных кроводач каждый раз двумя сериями сывороток или реагентов, то исследование резус-принадлежность крови проводится с применением одной серии сывороток или реагентов.

Метод определения антигенов системы Резус зависит от класса антител в реагенте: если в нем присутствуют полные антитела (класса IgM), то реагент используется для определения резус-принадлежности методом прямой

агглютинации в солевой среде; если в нем содержатся неполные антитела (класса IgG), то он используется в непрямом антиглобулиновом тесте, в реакции агглютинации в присутствии высокомолекулярных усилителей (полиглюкина, альбумина, желатина и др.), или с эритроцитами, обработанными протеолитическими ферментами. Метод использования реагентов антирезус указывается в сопроводительной инструкции.

При определении резус-принадлежности независимо от метода определения результат учитывается как истинный после проверки контрольных образцов, подтверждающих специфичность и активность каждой серии реагентов антирезус, т.е. при отсутствии агглютинации со стандартными резус-отрицательными эритроцитами и наличии агглютинации со стандартными резус-положительными, а также после отрицательного результата контроля специфичности. При апробации донорской крови желательно также включение контрольных образцов со слабовыраженным D^U антигеном.

Наличие агглютинации в контроле специфичности указывает на неспецифическое склеивание эритроцитов из-за аутоантител (это наблюдается при гемолитической болезни, аутоиммунной гемолитической анемии, некоторых инфекционных заболеваниях и др.) и, следовательно, положительный результат с реагентами антирезус не может быть учтен как истинный.

В этом случае исследование нужно повторить после трехкратного отмывания эритроцитов физиологическим раствором. Если неспецифическую агглютинацию эритроцитов устраниТЬ не удается, заключение о резус-принадлежности крови не выдают. В случае невозможности определения резус-принадлежность крови, реципиенту переливают резус-отрицательные эритроциты содержащие компоненты, пока резус-принадлежность крови не будет установлена.

Если при определении резус-принадлежности наблюдается слабая или сомнительная реакция, то следует повторно исследовать кровь данного лица другими сериями реагентов антирезус и другими методами. В случае необходимости промаркированный образец крови должен быть направлен на исследование в специализированную лабораторию Центра крови.

3.1. Определение антигена-Д системы Резус с помощью полных анти-D IgM антител

Моноклональные реагенты, содержащие IgM антитела, предназначены для определения групп крови человека по системе Резус в прямой реакции агглютинации и применяются взамен или параллельно со стандартными изоиммунными сыворотками. Моноклональные анти-D тест-реагенты – это человеческие анти-D антитела, которые секретируются *in vitro* гетерогибридомной клеточной линией. Изготовлены моноклональные антитела на основе культуральной жидкости, кондиционированной клетками-продуцентами анти-D антител. Технология изготовления реагента исключает возможность его контаминации патогенными для человека вирусами.

Наилучшие результаты тест дает при использовании высокой концентрации эритроцитов и температуре около 37-40°C, поэтому желательно использовать подогретую пластинку. Для исследования используют цельную кровь, отмытые эритроциты, эритроциты в плазме, сыворотке, консерванте или физиологическом растворе.

Специальные реагенты и оборудование:

- моноклональные антитела анти-D IgM;

- стандартные (D+) и (D-) эритроциты;
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- белые тарелки, пластины или планшеты со смачиваемой поверхностью, штативы, пробирки, микроплаты;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки;
- секундомер;
- лабораторная центрифуга;
- термостат (37°C);
- бытовой холодильник;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

3.1.1. Техника определения антигена-Д системы Резус с помощью полных анти-D IgM антител

Реакцию агглютинации с помощью полных анти-D IgM антител можно ставить на плоскости, в пробирках и в микроплатах.

Определения проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

Тест на плоскости

1. Наносят на планшет или пластину индивидуальными пипетками анти-D моноклональные антитела по одной большой капле (0,1 мл) под соответствующими надписями.
2. Рядом с каплями антител наносят по одной маленькой капле (около 0,03 мл) исследуемой крови (эритроцитов), а в контрольные лунки вносят образцы стандартных (D+) и (D-) эритроцитов.
3. Тщательно смешивают реагент с кровью чистой стеклянной палочкой.
4. Наблюдают за ходом реакции визуально при легком покачивании пластины или планшета в течение 3-5 минут (согласно инструкции). Агглютинация эритроцитов обычно наступает в первые 30 секунд, но наблюдение следует вести 3-5 минут ввиду более позднего появления агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности антигена-Д.
5. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

Трактовка результатов

При наличии агглютинации исследуемая кровь реципиентов маркируется как резус-положительная, при отсутствии агглютинации – как резус-отрицательная.

Тест в пробирках

1. Приготавливают 3-5% взвесь трижды отмытых в физиологическом растворе исследуемых эритроцитов. Для этого помещают в пробирку 5 капель (около 0,25 мл) исследуемой крови, трижды отмывают в 5-10 мл физиологического раствора; к осадку полученных эритроцитов добавляют 2-3 мл физиологического раствора.
 2. В промаркованные пробирки вносят по 1 капле (0,1 мл) 3-5% взвеси исследуемых эритроцитов, а в контрольные пробирки вносят образцы стандартных (D+) и (D-) эритроцитов.
 3. Добавляют во все пробирки по 1 капле (0,1 мл) моноклонального реагента анти-D IgM.
 4. Встряхивают пробирки до полного перемешивания реагента с кровью.
 5. Центрифугируют пробирки при 1000 об/мин на протяжении 60 секунд.
- Примечание.** Допускается предварительная (перед центрифугированием) инкубация при комнатной температуре или при температуре 37°C на протяжении 15-30 минут.

6. После центрифугирования осторожно встряхивают осадок в пробирке.

7. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

Трактовка результатов реакции

Если результат отрицательный, осадок эритроцитов легко разбивается, образуя гомогенную непрозрачную суспензию.

Если результат положительный, осадок не разбивается, оставаясь в виде одного или нескольких больших агглютинатов на фоне прозрачной жидкости.

Тест в микроплате

1. Приготавливают 3-5% взвесь трижды отмытых в физиологическом растворе исследуемых эритроцитов. Для этого помещают в пробирку 5 капель (около 0,25 мл) исследуемой крови, трижды отмывают в 5-10 мл физиологического раствора; к осадку полученных эритроцитов добавляют 2-3 мл физиологического раствора.

2. В промаркованные лунки круглодонной микроплаты вносят по 1 капле (0,05 мл) 3-5% взвеси исследуемых эритроцитов, а в контрольные лунки вносят образцы стандартных (D+) и (D-) эритроцитов.

3. Добавляют во все лунки по 1 капле (0,05 мл) моноклонального реагента анти-D IgM.

4. Встряхивают микроплату до полного перемешивания реагента с кровью.

5. Инкубируют микроплату 45-60 минут при комнатной температуре.

6. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

Трактовка результатов реакции

Визуально оценивают результат реакции по рисунку осадка эритроцитов на дне лунки: при отрицательном результате осадок эритроцитов собирается в точку, при положительном – имеет большой диаметр, располагается неравномерным слоем, имеет неровные или завернутые края.

3.1.2. Трактовка результатов реакции при определении антигена-Д системы Резус с помощью полных анти-D IgM антител

При наличии агглютинации исследуемая кровь реципиентов маркируется как резус-положительная, при отсутствии агглютинации – как резус-отрицательная. Результат учитывают как истинный после проверки контрольных образцов, т.е. при отсутствии агглютинации со стандартными D-отрицательными эритроцитами и наличии агглютинации со стандартными D-положительными эритроцитами. У доноров, если агглютинация сомнительна или отсутствует, исследование обязательно проводят со вторым реагентом, содержащим IgG (неполные) анти-D антитела для уточнения принадлежности такого образца крови к группе D^U. У реципиентов проведение второго этапа тестирования с неполными антителами не обязательно.

3.2. Определение антигена-Д с помощью неполных анти-D IgG антител реакцией конглютинации с применением желатина

Для проведения этого теста могут быть использованы моноклональные реагенты и стандартные аллоиммунные анти-резус сыворотки с неполными IgG антителами. Необходимо проведение контроля с раствором желатина без анти-резус реагента (прямая желатиновая проба).

Примечание. Перед употреблением ампулу с желатином необходимо тщательно осмотреть. При помутнении или появлении хлопьев, а также при потере свойств застудневать при температуре 4-8°C раствор желатина непригоден.

Специальные реагенты и оборудование:

- сыворотка антирезус анти-D двух серий или неполные моноклональные анти-D IgG антитела одной серии;
- стандартные (D+) и (D-) эритроциты;
- 10% раствор желатина;
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- штативы, пробирки, предметные и покровные стекла;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки;
- водяная баня, суховоздушный термостат (46-48°C);
- термометр;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- микроскоп;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

3.2.1. Техника определения антигена-Д с помощью неполных анти-D IgG антител реакцией конглютинации с применением желатина

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. В штатив устанавливают три ряда промаркированных пробирок по числу исследуемых образцов эритроцитов в каждом ряду и две пробирки для стандартных (D+) и (D-) эритроцитов.
2. В одинаково обозначенные пробирки (в три ряда) вводят по 1 капле (0,05 мл) исследуемых эритроцитов, а в контрольные пробирки - по одной капле (0,05 мл) стандартных (D+) и (D-) эритроцитов.
3. Во все пробирки (в три ряда) добавляют по две капли (0,1 мл) 10% раствора желатина, предварительно подогревшего до разжижения на водяной бане при температуре 46-48°C.
4. Во все пробирки первого ряда добавляют по одной капле (0,05 мл) сыворотки антирезус одной серии.
5. Во все пробирки второго ряда добавляют по одной капле (0,05 мл) сыворотки антирезус другой серии.

Примечание. При постановке реакции с неполными моноклональными антителами анти-D IgG используют одну серию реагента.

6. Третий ряд является контролем для исключения возможного неспецифического склеивания исследуемых эритроцитов, и туда сыворотку антирезус не добавляют (прямая желатиновая проба).
7. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием и штатив с пробирками помещают в водяную баню при 46-48°C на 15 минут или в суховоздушный термостат на 30 минут.
8. После извлечения пробирок из водяной бани или термостата доливают в них 5-8 мл изотонического раствора NaCl и перемешивают содержимое путем 1-2-кратного перевертывания пробирок.
9. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

3.2.2. Трактовка результатов определения антигена-Д с помощью неполных анти-D IgG антител реакцией конглютинации с применением желатина

Пробирки просматривают на свет невооруженным глазом или через лупу 6-8-кратного увеличения. Для достоверности полученных проб и в сомнительных

случаях результат контролируют под микроскопом. Вывод о резус-принадлежности делают по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов.

При положительном результате агглютинаты легко различимы в виде красных комочеков в прозрачной, почти обесцвеченной жидкости.

При отрицательном результате в пробирке видна равномерно окрашенная в светло-красный цвет, опалесцирующая жидкость.

Образцы эритроцитов, давшие агглютинацию с сывороткой анти-D, являются резус-положительными. Образцы эритроцитов, не давшие агглютинации с сывороткой анти-D, - резус-отрицательными

При определении резус-принадлежности двумя сериями стандартных сывороток результат учитывают как истинный при условии совпадения его в обеих сериях после проверки контрольных образцов, подтверждающих специфичность и активность сывороток антирезус, т.е. при отсутствии агглютинации со стандартными D-отрицательными эритроцитами и наличии агглютинации со стандартными D-положительными эритроцитами. В пробирках третьего (контрольного) ряда агглютинации быть не должно.

Наличие агглютинации в какой-либо пробирке контрольного ряда (прямая желатиновая проба положительная) говорит о неспецифичности реакции. При этих условиях положительный результат с сывороткой антирезус не может быть учтен как истинный. В таких случаях рекомендуется отмыть исследуемые эритроциты теплым изотоническим раствором NaCl для элюирования с них аутоантител и повторить исследование.

3.3. Непрямой антиглобулиновый тест (непрямая проба Кумбса) с помощью неполных анти-D IgG антител

Этот метод является наиболее чувствительным для выявления антигена-D и особенно его слабых вариантов D^U.

Специальные реагенты и оборудование:

- моноклональные анти-D IgG антитела;
- антиглобулиновый реагент (сыворотка для пробы Кумбса);
- стандартные (D+) и (D-) эритроциты;
- 10% раствор желатина;
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- раствор низкой ионной силы (LISS);
- штативы, пробирки, предметные и покровные стекла;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки;
- водяная баня, суховоздушный термостат (46-48°C);
- термометр;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- микроскоп;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

3.3.1. Техника непрямого антиглобулинового теста (непрямая проба Кумбса) с помощью неполных анти-D IgG антител

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Приготавливают 2-5% взвесь трижды отмытых в физиологическом растворе исследуемых эритроцитов. Для этого помещают в пробирку 5 капель (около 0,25 мл) исследуемой крови, трижды отмывают в 5-10 мл физиологического раствора;

к осадку полученных эритроцитов добавляют 2-3 мл физиологического раствора или, предпочтительнее, 2-3 мл раствора низкой ионной силы (LISS), в котором фиксация антител на эритроцитах прочнее и происходит быстрее, чем в физиологическом растворе.

2. Вносят по 1 капле анти-D реагента в чистые промаркованные круглодонные пробирки.

3. Добавляют в пробирки по 1 капле 2-5% взвеси исследуемых эритроцитов, а в контрольные пробирки - по одной капле стандартных (D+) и (D-) эритроцитов.

4. Инкубируют смесь 45-60 минут при температуре 37°C (если эритроциты в физиологическом растворе) или 15 минут (если эритроциты в LISS).

5. Отмывают эритроциты 1 раз (в случае использования моноклонального реагента) или 3 раза (в случае использования иммунной анти-D сыворотки) большим объемом (5-10 мл) физиологического раствора. Однократная отмывка допустима только при использовании моноклональных реагентов. Полностью удаляют физиологический раствор после отмывания.

6. Добавляют к осадку во все пробирки по 2 капли антиглобулинового реагента и тщательно смешивают.

7. Центрифугируют в течение 1 минуты при 1500 об/мин немедленно или после короткой инкубации при комнатной температуре (10-15 минут).

8. Мягко покачивая пробирку, отделяют осадок от дна и макро- или микроскопически определяют наличие агглютинации.

9. Записывают результаты реакции немедленно после определения.

3.3.2. Трактовка результатов непрямого антиглобулинового теста (непрямая проба Кумбса) с помощью неполных анти-D IgG антител

При отсутствии агглютинации кровь реципиентов считается резус-отрицательной, при положительной реакции - резус-положительной; подгруппы D^U могут вызывать слабую агглютинацию даже в этом высокочувствительном тесте. Прежде чем отнести донора D^U к резус-положительным, подтвердите заключение контрольным исследованием антиглобулиновой сыворотки со стандартными D-отрицательными эритроцитами. Если контрольный тест положителен, интерпретация не является достоверной, и кровь такого донора не должна использоваться для трансфузий до окончательного выяснения его резус-принадлежности.

3.4. Типирование крови по другим антигенам систем Резус и системы Келл

С целью формирования реестра типированных доноров и доноров стандартных эритроцитов для скрининга и идентификации аллоантител, а также проведения специальных отборов и индивидуальных подборов крови, учреждениям службы крови рекомендуется проводить типирование крови доноров по антигенам системы Резус: D, C (C^W), E, c, e и антигенам системы Келл. Для этого используют сыворотки или моноклональные реагенты, которые имеют специфичность: анти-c, анти-C (C^W), анти-e, анти-E, анти-K в реакциях на плоскости, в пробирках. Аналогично выполняется типирование эритроцитов по другим антигенным системам. Методики проведения типирования представлены в инструкциях по применению, прилагаемых к реагентам. Для контроля используют стандартные эритроциты, которые имеют соответствующий антиген.

Фенотипирование крови доноров проводится при каждой донации с применением различных серий реагентов. При совпадении результатов

исследований после 3-х разового фенотипирования при 3-х различных донациях - фенотип по системам антигенов эритроцитов считается определенным и при следующих донациях не определяется.

Результаты фенотипирования крови доноров фиксируют в журнале и на титульном листе донорской карточки с указанием даты и подписью лица, проводившего определение. Эта информация переносится в электронную базу данных учреждения службы крови.

Примечание. Наиболее выраженные антигенные свойства среди минорных антигенов эритроцитов имеют антигены К и с. Фактор К стоит на втором месте после антигена D в шкале трансфузационно опасных антигенов эритроцитов. Третье место занимает фактор с. Реципиентам «с»-отрицательным следует переливать эритроцитсовместимые гемокомпоненты только «с»-отрицательные.

Определение у пациентов минорных антигенов системы резус (фенотип) и антигенов системы Келл следует проводить при индивидуальном подборе крови для многократных трансфузий, в тех случаях, когда в сыворотке реципиента обнаружены иммунные антитела, а также детям, женщинам детородного возраста, беременным женщинам с подозрением на резус-конфликтную беременность.

3.5. Возможные ошибки при определении групп крови по системе Резус

Ошибки при определении резус-принадлежности доноров и реципиентов и как следствие этого переливание резус-несовместимой крови могут явиться причиной возникновения тяжелых посттрансфузионных осложнений гемолитического типа. Поэтому достоверная диагностика антигенов системы Резус очень важна в трансфузиологической практике.

I. Ошибки организационно-технического характера:

- ошибочное использование реактива другой специфичности;
- неправильный порядок размещения сывороток, реагентов или исследуемой крови в штативах, на планшетах;
- неправильное соотношение реагентов и эритроцитов (эритроцитов должно быть примерно в 10 раз меньше, чем сыворотки);
- реактив антирезус или раствор желатина не добавлены в исследуемый образец;
- чрезмерно-интенсивное перемешивание взвеси эритроциты-реактив при проведении исследования, что приводит к распаду мелких агглютинатов;
- несоблюдение необходимой температуры в водяной бане (при температуре ниже 42°C агглютинация может не наступить, при температуре выше 48°C капли быстро высохнут);
- несоблюдение времени, необходимого для проведения реакции;
- использование для определения резус-принадлежности старой, гемолизированной или инфицированной крови;
- определение резус-принадлежности при помощи одной серии антирезусной сыворотки.

II. Ошибки, связанные с использованием некачественных реактивов:

- использование просроченных сывороток и реагентов;
- использование сывороток и реагентов недостаточно высокого качества, о чем свидетельствует слабоположительная реакция контрольных образцов с резус-положительной принадлежностью;
- использование загрязненных, инфицированных сывороток и реагентов.

III. Ошибки, обусловленные биологическими особенностями исследуемой крови:

- феномен «панагглютинации» (полиагглютинабельности) эритроцитов из-за присутствия на исследуемых эритроцитах аутоантител. Полиагглютинацию удается устраниить с помощью отмывания эритроцитов физиологическим раствором, хотя и не всегда;
- наличие антигена D^U (слабая разновидность антигена D). Эритроциты с этим антигеном дают очень нечеткую агглютинацию со стандартными антирезусными сыворотками и с МКА. Реципиентов с антигеном D^U считают резус-отрицательными, доноров - резус-положительными;
- снижение уровня антигенов системы Резус при некоторых заболеваниях (болезни системы крови, печени, почек, иммунной системы). В этих случаях наблюдаются расхождения с результатами предыдущего определения резус-принадлежности у одного и того же лица: ранее определяемая положительная принадлежность крови выявляется как отрицательная и наоборот.

В сомнительных случаях и в случаях расхождения результатов определения резус-принадлежности кровь необходимо направить для проведения исследования в условиях специализированной лаборатории учреждения службы крови.

IV. ИНСТРУКЦИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ИММУННЫХ АНТИТЕЛ ПО СИСТЕМЕ АВО

Антитела системы АВО – α и β являются у людей нормальными (естественными) антителами.

Они принадлежат к полным антителам – агглютининам, хорошо реагируют в солевой среде, лучше выявляются при комнатной температуре +(22±2)°С и хуже при температуре + 37° С. Добавление в реакцию коллоидных веществ не усиливает активности этих антител, непрямой пробой Кумбса их не выявляют.

Нормальные антитела α и β чувствительны к действию высокой температуры: прогревание при температуре 70°C в течение 10 минут достаточно, чтобы антитела полностью потеряли свою активность.

Кроме нормальных (естественных) антител α и β у человека могут появиться иммунные антитела анти-А и анти-В.

Иммунные антитела не присутствуют регулярно в крови людей, но могут образоваться вследствие изоиммунизации при поступлении в организм несовместимого в групповом отношении антигена, при иногруппной беременности, при ошибочном переливании крови, несовместимой по системе АВО, а также при проведении иммунизации. Также выработку антител вызывает широкое распространение в природе веществ животного и растительного происхождения, имеющих тотальную подобность структурным компонентам антигенов системы АВО.

При иногруппной беременности, послужившей причиной гемолитической болезни новорожденного, иммунные антитела анти-А или анти-В почти всегда присутствуют в крови матери к моменту рождения ребенка. При этом им обычно сопутствует высокий титр нормальных антител α и β.

При ошибочном переливании несовместимой крови иммунные антитела анти-А или анти-В появляются обычно на 5-7 день, достигая максимума к 15-25 дню с последующим падением их титра. В крови у таких больных одновременно повышается титр нормальных антител α и β на 3-8 ступеней также с последующим снижением после 25-30 дня.

Иммунные антитела анти-А и анти-В могут быть как в полной, так и неполной форме. Они активны при 37°C, могут иметь несколько более высокий титр при проведении реакции в коллоидной среде по сравнению с солевой и выявляться в

непрямой пробе Кумбса. Они стойки к температурному воздействию и сохраняют активность при прогревании сыворотки в течение 10 минут при температуре 70°C, т.е. в условиях, при которых нормальные антитела α и β полностью инактивируются.

Выявление иммунных антител по системе АВО может служить ценным диагностическим признаком, в частности, при решении вопроса о причинах гемотрансфузионных осложнений и гемолитической болезни новорожденных.

Наиболее демонстративным отличием нормальных антител α и β от иммунных антител анти-А и анти-В является их поведение при воздействии высокой температуры. На этих различиях и основано применение разных методов для выявления нормальных антител α и β и иммунных антител анти-А и анти-В. Активность иммунных антител проявляется в виде способности вызывать агглютинацию эритроцитов при проведении реакции в солевой среде или, как конечный результат, в непрямой пробе Кумбса.

Кроме этих антител, вследствие иммунизации, вызванной теми же причинами, могут одновременно образовываться гемолизины, которым свойственна также групповая специфичность.

4.1. Определение полных иммунных антител системы АВО реакцией солевой агглютинации

Специальные реагенты и оборудование:

- стандартные эритроциты групп А(II) и В(III);
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки;
- термостат (37°C);
- водяная баня для инактивации сыворотки (70°C);
- термометр;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

4.1.1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Для приготовления стандартных эритроцитов используют кровь без консерванта или кровь, стабилизированную любым консервантом. Маркируют чистые сухие пробирки. В одну пробирку отбирают кровь 3-5 доноров А(II) в другую 3-5 доноров В(III) так, чтобы в пробирках получилась смесь крови доноров в количестве 0,5-2 мл.

Далее в пробирки добавляют изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, осторожно перемешивают содержимое пробирок и центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют трижды, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используются в качестве стандартов. Из отмытых стандартных эритроцитов готовят 2% взвесь. Для этого маркируют пробирки по числу образцов стандартных эритроцитов. В пробирки капают по 2,5 мл (49 капель) изотонического раствора натрия хлорида, затем в каждую пробирку в соответствии с ее маркировкой переносят одну каплю стандартных эритроцитов. Содержимое пробирок тщательно перемешивают для получения равномерной взвеси стандартных эритроцитов.

Необходимо проводить контрольное исследование приготовленных стандартных эритроцитов при помощи стандартных сывороток или моноклональных антител.

Примечание. Отмытые стандартные эритроциты не должны содержать сгустки крови. Не допускается использование лизированных стандартных эритроцитов.

Исследуемую сыворотку в количестве 0,5-1 мл разводят в четыре раза изотоническим раствором натрия хлорида во избежание коагуляции при нагревании, затем разливают поровну в две пробирки, одну из которых прогревают на водяной бане в течение 10 минут при 70°C, точно соблюдая температуру и время. Таким образом, получится две порции сыворотки - нативной и прогретой, каждая из которых разведена 1:4.

Определение антител начинается реакцией агглютинации в солевой среде в маленьких пробирках. Если этим методом полных иммунных антител не обнаружено, исследование дополняют непрямой пробой Кумбса.

4.1.2. Техника определения полных иммунных антител системы АВО реакцией солевой агглютинации

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Предварительно определяют группу крови по системе АВО и системе Резус в исследуемом образце крови.

2. При исследовании сыворотки группы A(II) или B(III) в штатив устанавливают в ряд 12 маленьких пробирок. При исследовании сыворотки группы O(I) - два ряда по 12 пробирок. Штатив накрывают листом бумаги, в котором накалывают отверстия для установки пробирок.

3. На бумаге надписывают фамилию и группу крови лица, чья сыворотка исследуется, группу крови стандартных эритроцитов и у каждой пробирки - степень разведения помещенной в нее сыворотки (1:4, 1:8, 1:16 и т.д. до 1:8000).

4. Во все пробирки каждого ряда, начиная со второй, накапывают по 2 капли изотонического раствора натрия хлорида. Затем в первую и во вторую пробирки (каждого ряда) накапывают по две капли приготовленной непрогретой сыворотки, разведенной в четыре раза.

5. Во второй пробирке каждого ряда сыворотку смешивают с изотоническим раствором натрия хлорида и две капли этой смеси переносят в третью пробирку, из третьей, также после перемешивания - в четвертую и т.д. до последней, из которой две капли удаляют. В результате в пробирках получается разведение сыворотки от 1:4 до 1:8000.

6. В другом штативе приготавливают разведения предварительно прогретой сыворотки (при этом в штатив обычно достаточно поместить по шесть пробирок - разведение сыворотки от 1:4 до 1:128).

7. После приготовления разведений сыворотки во все пробирки добавляют по одной капле 2% взвеси стандартных эритроцитов противоположной группы: при исследовании сыворотки группы B(III) - эритроциты группы A(II), при исследовании сыворотки группы A(II) - эритроциты группы B(III) и при исследовании сыворотки группы O(I) в один ряд пробирок добавляют эритроциты группы A(II), в другой ряд - эритроциты группы B(III).

8. Содержимое пробирок тщательно перемешивают, после чего штативы оставляют в покое на 1 час: с нативной сывороткой при комнатной температуре, а с прогретой – в термостат при 37°C.

4.1.3. Трактовка результатов определения полных иммунных антител системы АВО реакцией солевой агглютинации

Результат оценивают по форме осадка эритроцитов на дне пробирки, просматривая его через лупу с 6-8-кратным увеличением над источником света.

При наличии агглютинации осадок располагается в виде комочеков неравномерным слоем с изогнутыми, иногда завернутыми внутрь краями. При отсутствии агглютинации осадок эритроцитов располагается равномерным слоем в центре дна пробирки в виде правильно очерченного круга. Результаты отмечают на бумаге у каждой пробирки знаком плюс (+) или минус (-).

Наличие агглютинации свидетельствует о присутствии полных антител, а последнее разведение, в котором она наблюдается - об их титре.

Титр антител нативной (непрогретой) сыворотки относится к антителам α (или β), титр антител в прогретой сыворотке - к иммунным антителам анти-А (или анти-В). В том случае, если агглютинация наблюдается во всех пробирках, следует повторить исследование, продолжив разведение сыворотки.

Отрицательный результат во всех пробирках с прогретой сывороткой говорит об отсутствии иммунных антител полной формы.

4.2. Определение неполных иммунных антител системы АВО непрямой пробой Кумбса

Определение неполных иммунных антител системы АВО непрямой пробой Кумбса выполняют в том случае, если не были обнаружены полные иммунные антитела системы АВО реакцией солевой агглютинации.

Специальные реагенты и оборудование:

- стандартные эритроциты групп А(II) и В(III);
- антиглобулиновый реагент (сыворотка для пробы Кумбса);
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- белые тарелки, пластины или планшеты со смачиваемой поверхностью, штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки;
- термостат (37°C);
- водяная баня для инактивации сыворотки (70°C);
- термометр;
- секундомер;
- лабораторная центрифуга;
- бытовой холодильник;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

4.2.1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Для приготовления стандартных эритроцитов используют кровь без консерванта или кровь, стабилизированную любым консервантом. Маркируют чистые сухие пробирки. В одну пробирку отбирают кровь 3-5 доноров А(II), в другую 3-5 доноров В(III) так, чтобы в пробирках получилась смесь крови доноров в количестве 0,5-2 мл.

Далее в пробирки добавляют изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, осторожно перемешивают содержимое пробирок и центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание

повторяют трижды, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используются в качестве стандартов.

Необходимо проводить контрольное исследование приготовленных стандартных эритроцитов при помощи стандартных сывороток или моноклональных антител.

Примечание. Отмытые стандартные эритроциты не должны содержать сгустки крови. Не допускается использование лизированных стандартных эритроцитов.

4.2.2.Техника определения неполных иммунных антител системы АВО непрямой пробой Кумбса

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. При исследовании сыворотки группы A(II) или B(III) в штатив устанавливают 6 пробирок, при исследовании сыворотки группы O(I) - два ряда по 6 пробирок. Пробирки нумеруют. Штатив предварительно накрывают листом бумаги, в котором накалывают отверстия для установки пробирок. На бумаге делают обозначения, указав у каждой пробирки ее номер и все другие сведения, как сказано выше для реакции солевой агглютинации.

2. Во все пробирки, начиная с №2, накапывают по три капли (0,15 мл) изотонического раствора натрия хлорида, а затем в пробирки № 1 и № 2 - по три капли (0,15 мл) исследуемой, предварительно прогретой сыворотки и далее приготавливают ее разведения, как это указано выше для метода солевой агглютинации, но в объеме трех капель.

3. Во все пробирки пастеровской пипеткой добавляют по одной маленькой капле (0,01 мл) эритроцитов противоположной группы, смешивают сыворотку с эритроцитами и штатив помещают для инкубации в термостат на 45 минут при 37° С. За это время иммунные антитела, если они есть в сыворотке, фиксируются на эритроцитах.

4. После инкубации отмывают эритроциты, для чего в пробирки доливают изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, перемешивают их содержимое и центрифугируют 1500 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют 3-4 раза.

5. После отмывания в каждую пробирку добавляют 3-5 (0,15-0,25 мл) капель изотонического раствора натрия хлорида для получения приблизительно 5% взвеси эритроцитов и из каждой пробирки по одной капле такой взвеси переносят на белую пластинку со смачиваемой поверхностью, пронумеровав предварительно места на пластинке соответственно номерам пробирок. К каждой капле прибавляют по одной капле сыворотки для пробы Кумбса и перемешивают их чистой стеклянной палочкой. Далее в течение 10 минут наблюдают результат при периодическом покачивании пластинки.

Результат оценивают по наличию или отсутствию агглютинации, видимой невооруженным глазом на белом фоне пластинки. Наступление агглютинации обозначают на бумаге у каждой пробирки знаком плюс (+) с указанием времени ее появления в секундах и минутах. Отсутствие агглютинации обозначают знаком минус (-).

Наличие агглютинации свидетельствует о присутствии иммунных антител анти-А или анти-В неполной формы, а последнее разведение, в котором оно наблюдается - об их титре.

Примечание. Контроль в отношении возможного ложно-положительного результата за счет активных полных антител не требуется, т.к. в данном случае

непрямая проба Кумбса ставится как дополнение только при отрицательном результате в солевой среде.

В том случае, если агглютинация наблюдается во всех пробирках, следует повторить исследование, продолжив разведение сыворотки.

Отрицательный результат во всех пробирках свидетельствует об отсутствии иммунных антител неполной формы в исследуемой сыворотке.

4.2.3. Трактовка результатов определения неполных иммунных антител системы АВО непрямой пробой Кумбса

В ходе вышеописанного исследования определяются три вида антител:

- нормальные полные антитела – агглютинины α и β (термолабильные);
- иммутные полные антитела анти-А и анти-В (термостабильные);
- иммутные неполные антитела анти-А и анти-В (термостабильные).

Общее заключение делается на основании сопоставления результатов всех исследований:

а) наличие иммутных (термостабильных) антител полной или неполной формы свидетельствует об имевшем место поступлении в организм человека антигена несовместимого по системе АВО. Титр этих антител обычно бывает ниже, чем нормальных полных (термолабильных) антител α и β и редко превышает такие показатели, как 1:8 - для иммутных полных антител и 1:32 - для иммутных неполных антител;

б) высокий титр нормальных полных антител - агглютининов α и β (α выше, чем 1:256 и β выше, чем 1:128 при данном методе исследования) даже при отсутствии иммутных термостабильных антител в момент исследования, отражает состояние повышенной сенсибилизации организма и позволяет сделать предположение о бывшем в предшествующее время поступлении антигена, несовместимого по системе АВО;

в) отсутствие иммутных термостабильных антител анти-А и анти-В при титре нормальных антител α не выше, чем 1:256 и β не выше, чем 1:128 (при данном методе исследования) говорит об отсутствии у человека изоиммунизации групповыми факторами системы АВО к моменту данного исследования.

4.3. Определение иммутных гемолизинов системы АВО

Гемолизины – антиэритроцитарные антитела класса IgG иммунной природы, которые способны активировать систему комплемента, вызывая гемолиз эритроцитов. Наиболее часто они выявляются у беременных женщин с группой крови 0(I), если у мужа A(II), B(III) или AB(IV) группы. Такие антитела характеризуются соответственно: анти-А и анти-В иммутные гемолизины. Впервые у беременных женщин с группой крови A(II) возможно появление анти-В гемолизинов, если у мужа группа крови B(III) или AB(IV), но вероятность такой иммунизации очень низкая. Если у беременной женщины группа крови B(III), а у мужа – A(II) или AB(IV), то возможно появление анти-А иммутных гемолизинов, но с еще меньшей вероятностью.

Специальные реагенты и оборудование:

- стандартные эритроциты групп O(I), A(II) и B(III);
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки;
- термостат (37°C);

- термометр;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

4.3.1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Для приготовления стандартных эритроцитов используют кровь без консерванта или кровь, стабилизированную любым консервантом. Маркируют чистые сухие пробирки. В одну пробирку отбирают кровь 3-5 доноров О(І), в другую 3-5 доноров А(ІІ), в третью 3-5 доноров В(ІІІ) так, чтобы в пробирках получилась смесь крови доноров в количестве 0,5-2 мл.

Далее в пробирки добавляют изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, осторожно перемешивают содержимое пробирок и центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надсадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют трижды, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используются в качестве стандартов. Из отмытых стандартных эритроцитов готовят 5% взвесь. Для этого маркируют пробирки по числу образцов стандартных эритроцитов. В пробирки вносят по 5 мл изотонического раствора натрия хлорида, затем в каждую пробирку в соответствии с ее маркировкой переносят 0,25 мл стандартных эритроцитов (или 19 капель изотонического раствора натрия хлорида и 1 каплю отмытых стандартных эритроцитов). Содержимое пробирок тщательно перемешивают для получения равномерной взвеси стандартных эритроцитов. Аналогично методике приготовления 5% взвеси стандартных эритроцитов приготовить 5% взвесь исследуемых эритроцитов.

Необходимо проводить контрольное исследование приготовленных стандартных эритроцитов при помощи стандартных сывороток или моноклональных антител.

Примечание. Отмытые стандартные эритроциты не должны содержать сгустки крови. Не допускается использование лизированных стандартных эритроцитов.

4.3.2. Техника определения иммунных гемолизинов системы АВО

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Предварительно определяют группу крови по системе АВО и системе Резус в исследуемом образце крови.
2. В штатив устанавливают по пять маленьких пробирок: три ряда при исследовании сыворотки группы А(ІІ) или В(ІІІ), четыре ряда - при исследовании сыворотки группы О(І).
3. Пробирки нумеруют одинаково во всех рядах соответственно нумерации пробирок с исходными разведениями сыворотки.
4. Штатив предварительно накрывают листом бумаги, в котором накалывают отверстия для установки пробирок. На бумаге надписывают фамилию и группу крови лица, чья сыворотка исследуется, группу крови стандартных эритроцитов и степень разведения помещенной в пробирках сыворотки (1:2-1:32).
5. Во все пробирки, начиная с первой пробирки каждого ряда добавляют по 5 капель изотонического раствора натрия хлорида.
6. В первую пробирку каждого ряда добавляют по 5 капель исследуемой сыворотки. Предварительно перемешав содержимое, переносят 5 капель из первой пробирки во вторую, из второй – в третью и так до последней пробирки, из

которой 5 капель удаляют. В результате в каждом ряду должны получиться разведения сыворотки: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32.

7. В первый (контрольный) ряд пробирок добавляют взвесь эритроцитов лица, сыворотка которого исследуется. Во второй (также контрольный) ряд – взвесь эритроцитов группы О(I). В третий ряд добавляют эритроциты противоположной группы, т.е. группы В(III), если исследуется сыворотка группы А(II); или группы А(II), если исследуется сыворотка группы В(III). При исследовании сыворотки группы О(I) в третий ряд вводят эритроциты группы А(II), а в четвертый ряд - эритроциты группы В(III).

8. Содержимое пробирок тщательно перемешивают путем встряхивания и штатив помещают в термостат на 45 минут при температуре 37° С, затем пробирки вынимают и рассматривают результат невооруженным глазом в проходящем свете.

4.3.3. Трактовка результатов определения иммунных гемолизинов системы АВО

В ходе исследования определяется наличие или отсутствие групповых гемолизинов анти-А и анти-В.

Результаты оценивают визуально по соотношению количества сохранившихся эритроцитов в осадке и степени гемолиза, т.е. интенсивности окрашивания надосадочной жидкости:

- если эритроциты полностью сохранились в осадке, а надосадочная жидкость прозрачна и бесцветна, это значит, групповые гемолизины отсутствуют, что обозначают знаком минус (-),

- если осадок эритроцитов частично сохранился, а надосадочная жидкость прозрачна и окрашена в красный цвет разной интенсивности (иногда только небольшим слоем над осадком эритроцитов) - это значит, что в исследуемой сыворотке содержатся групповые гемолизины различной степени активности (обозначают знаками от одного плюса (+) до трех плюсов (+++)),

- если осадок эритроцитов отсутствует, а вся жидкость окрашена в ярко - красный цвет и прозрачна, это значит, что в исследуемой сыворотке содержатся групповые гемолизины, что оценивается на четыре плюса (+++).

Результаты учитываются как истинные, т.е. относящиеся к гемолизинам анти-А и анти-В, только при отсутствии гемолиза в двух контрольных рядах.

При наличии гемолиза не только с эритроцитами противоположной группы, но и в контрольных рядах - исследование повторяют. При подтверждении результатов реакции следует решать вопрос о природе обнаруженных гемолизинов, с учетом характера заболевания и других показателей.

V. ИНСТРУКЦИЯ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ СЫВОРОТКИ НА НАЛИЧИЕ РЕЗУС-АНТИТЕЛ

Резус антитела относятся к аллоиммунным антителам, которые в норме отсутствуют в сыворотке человека, а появляются в крови резус-отрицательных людей только в результате иммунизации.

Условиями, способствующими образованию резус-антител, является введение резус-отрицательному человеку резус-положительной крови или беременность резус-отрицательной женщины резус-положительным плодом.

Определение резус-антител наряду с определением резус-принадлежности пациента и донора необходимо для предупреждения переливания резус-

несовместимой крови, а также для диагностики резус-кофликта беременных и возможного заболевания плода или новорожденного гемолитической болезнью.

Определение резус-антител требуется также при отборе материала для приготовления сыворотки анти-резус.

Резус-антитела бывают разные по специфичности: анти-D (Rh_0), анти-C (rh'), анти-E (rh''), анти-с(hr') , анти-е(hr'') и по форме – полные и неполные.

Специфичность антител определяется тем, с каким из резус-антигенов они реагируют, а форма антител - каким образом они реагируют с эритроцитами, содержащими специфические для них резус-антигены.

Полные антитела, соединяясь с резус-антигенами эритроцитов, вызывают склеивание (агглютинацию) этих эритроцитов при реакции в солевой среде. Неполные антитела в этих условиях лишь соединяются с эритроцитами, но не вызывают агглютинации, так что внешне эта реакция ничем не проявляется.

Для того чтобы установить, произошла ли реакция между неполными резус-антителами и эритроцитами, необходимы специальные условия: добавление различных коллоидов (реакция конглутинации с применением желатина) или применение сыворотки для пробы Кумбса, которая реагирует с иммуноглобулинами человека (непрямая пробы Кумбса). При всех перечисленных условиях реакция между резус-антителами и эритроцитами, содержащими резус-антigen, в конечном итоге также проявляется в виде агглютинации эритроцитов.

Разные методы определения резус-антител требуют различных оптимальных для них температурных условий.

С целью обеспечения трансфузационной терапии, профилактики посттрансфузионных осложнений гемолитического типа необходимо проводить переливание крови, принимая во внимание аллосенсибилизацию доноров и реципиентов антигенами эритроцитов.

Кровь доноров, беременных женщин, а также пациентов, которым необходима трансфузионная помощь, рекомендуется исследовать на наличие резус-антител независимо от их резус-принадлежности. Если у донора будут выявлены антитела, то эритроцитсодержащие компоненты крови или плазму этого донора использовать для переливания нельзя.

Титр и специфичность выявленных у донора антител исследуют при каждой кроводаче. Доноры, в сыворотке которых не выявлены антитела к антигенам эритроцитов, один раз в год проходят повторное исследование.

Первичное исследование антител в крови доноров проводят лаборатории учреждений службы крови с помощью реакции конглутинации с 10% раствором желатина и смесью эритроцитов 3-5 доноров 0(I) ($Rh+$) и 3-5 доноров 0(I) ($Rh-$) с оценкой результата реакции под микроскопом.

В том случае, когда антитела к антигенам эритроцитов выявлены (или не выявлены, но в анамнезе были многократные гемотрансфузии или осложнения беременности), исследования антител необходимо повторить в непрямом антиглобулиновом тесте в лаборатории, в которой имеется панель типированных эритроцитов.

5.1.Общие замечания к методам определения антител анти-резус

5.1.1. Учет специфичности антител и стандартных эритроцитов

Наиболее часто при иммунизации резус-отрицательных людей повторными трансфузиями крови или беременностями образуются антитела анти- $Rh_0(D)$, но при этих же условиях могут образоваться и другие резус-антитела. Поэтому при определении антител в сыворотке крови человека эту сыворотку испытывают с

резус- положительными эритроцитами, обязательно содержащими три антигена резус: Rh₀(D), гh'(C), гh"(E). Если антигены гh'(C) и гh"(E) в эритроцитах специально не определяли, то число резус- положительных образцов должно быть не менее 20 для того, чтобы среди них обязательно встретились эти три антигена резус.

В качестве контроля на специфичность реакции, а также для выявления антител анти-hg'(c) и hg"(e) в исследование включаются стандартные резус-отрицательные rh₀(cde) эритроциты и собственные эритроциты лица, сыворотка которого исследуется.

Такое исследование является предварительным. Для уточнения специфичности требуются дополнительные специальные исследования.

5.1.2. Учет формы антител

Чаще всего при иммунизации резус-антителом образуются неполные антитела, иногда одновременно с ними образуются и полные. Кроме того, встречаются случаи, когда у человека образуются только полные резус-антитела. Поэтому определение резус-антител следует проводить одновременно не менее чем двумя методами, одним из которых обязательно должен быть метод, выявляющий полные антитела, а другим – метод, выявляющий неполные антитела.

5.1.3. Выбор метода выявления резус-антител

Существуют различные методы исследования сыворотки на наличие антител в зависимости от их формы.

Методы выявления неполных антител анти-резус: непрямая проба Кумбса, реакция конглютинации с применением 10% желатина.

Метод исследования сыворотки в солевой среде в маленьких пробирках выявляет полные резус-антитела и должен обязательно использоваться одновременно с любым из упомянутых выше.

5.2. Исследование сыворотки на наличие неполных резус-антител непрямой пробой Кумбса

Специальные реагенты и оборудование:

- стандартные эритроциты групп 0(I) (Rh+); 0(I) (Rh-);
- антиглобулиновый реагент (сыворотка для пробы Кумбса);
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- белые тарелки, пластины или планшеты со смачиваемой поверхностью, штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки;
- термостат (37°C);
- термометр;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- центрифуга лабораторная;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

5.2.1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Для приготовления стандартных эритроцитов используют кровь без консерванта или кровь, стабилизированную любым консервантом. Маркируют чистые сухие пробирки. В одну пробирку отбирают кровь 3-5 доноров 0(I) (Rh+),

в другую 3-5 доноров 0(I) (Rh-) так, чтобы в пробирках получилась смесь крови доноров в количестве 0,5-2 мл.

Далее в пробирки добавляют изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, осторожно перемешивают содержимое пробирок и центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют трижды, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используются в качестве стандартов.

Необходимо проводить контрольное исследование приготовленных стандартных эритроцитов при помощи стандартных сывороток или моноклональных антител.

Примечание. Отмытые стандартные эритроциты не должны содержать сгустки крови. Не допускается использование лизированных стандартных эритроцитов.

5.2.2. Техника исследования сыворотки на наличие неполных резус-антител непрямой пробой Кумбса

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Предварительно определяют группу крови по системе АВО и системе Резус в исследуемом образце крови.
2. Маркируют пробирки высотой 4-10 см соответственно числу образцов стандартных эритроцитов и устанавливают в штатив, включая пробирку для контрольного исследования сыворотки с собственными эритроцитами.
3. Во все пробирки вводят по 3 капли (0,15 мл) исследуемой сыворотки.
4. Со дна каждой пробирки, содержащей отмытые стандартные эритроциты, чистой пастеровской пипеткой, набирают маленькую каплю (0,01 мл) эритроцитов и переносят ее в пробирки с исследуемой сывороткой согласно маркировке.
5. В контрольную пробирку к исследуемой сыворотке вносят маленькую каплю (0,01 мл) собственных эритроцитов.
6. Содержимое пробирок тщательно перемешивают путем встряхивания и помещают для инкубации в термостат на 45 мин при температуре 37°C. За это время резус-антитела, если они имеются в испытуемой сыворотке, фиксируются на эритроцитах.
7. После инкубации в пробирки доливают изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, содержимое пробирок перемешивают и центрифугируют 1500 об/мин на протяжении 5 минут при комнатной температуре, после чего надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание эритроцитов повторяют 3-4 раза.
8. В каждую пробирку к отмытым таким образом эритроцитам добавляют 4-7 капель изотонического раствора натрия хлорида для получения 5% взвеси.
9. Одну каплю (0,05 мл) взвеси эритроцитов из каждой пробирки переносят на белую фарфоровую или любую другую пластинку со смачиваемой поверхностью и к каждой капле прибавляют по одной капле (0,05 мл) сыворотки для пробы Кумбса.
10. Сыворотку тщательно перемешивают с эритроцитами чистой стеклянной палочкой, после чего пластинку слегка покачивают. При этом наблюдают за результатом (наличие или отсутствие агглютинации эритроцитов).

Агглютинация обычно начинается в течение первых 10-30 с, но при слабом титре резус-антител может наступить значительно позже, так что наблюдение следует продолжать до 20 минут.

Агглютинация в этом случае происходит в результате соединения сыворотки для пробы Кумбса с антителами, которые фиксированы на эритроцитах, а эритроциты также вовлекаются в реакцию – что проявляется наличием агглютинации.

5.2.3. Оценка результатов исследования сыворотки на наличие неполных резус-антител с помощью непрямой пробы Кумбса

Наличие агглютинации в каплях с образцами стандартных резус-положительных эритроцитов и отсутствие ее с резус-отрицательными и собственными эритроцитами указывает на присутствие в сыворотке неполных резус-антител.

Отсутствие агглютинации со всеми образцами эритроцитов указывает на то, что неполные резус-антитела анти-D(Rh_0), анти-C(rh'), анти-E(rh''), анти-с(hr') , анти-е(hr'') – не выявлены.

5.2.4. Определение титра неполных резус-антител, выявленных с помощью непрямой пробы Кумбса

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. В штатив устанавливают 10 пробирок с обозначениями: «1:2», «1:4», «1:8», «1:16» и т. д. до «1:1024».
2. Во все пробирки вводят по 3 капли (0,15 мл) изотонического раствора натрия хлорида.
3. В первую пробирку (с обозначением «1:2») вводят 3 капли (0,15 мл) исследуемой сыворотки. Из первой пробирки после перемешивания ее содержимого переносят 3 капли в следующую и т. д. до последней пробирки, из которой 3 капли удаляют. В результате в пробирках получаются разведения испытуемой сыворотки от 1:2 до 1:1024.
4. Во все пробирки добавляют по одной маленькой капле (0,01мл) стандартных эритроцитов 0(I) (Rh^+).
5. Содержимое пробирок перемешивают, и штатив ставят на 45 минут в термостат при температуре 37°C.
6. После инкубации в пробирки доливают изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, содержимое пробирок перемешивают и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 минут, после чего надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют 3-4 раза.
7. В каждую пробирку к отмытым эритроцитам добавляют 4-7 капель изотонического раствора натрия хлорида для получения 5% взвеси.
8. Затем из каждой пробирки переносят одну каплю (0,05 мл) взвеси эритроцитов на белую пластинку со смачиваемой поверхностью и к каждой капле взвеси прибавляют по одной капле (0,05мл) сыворотки для пробы Кумбса.
9. Сыворотку тщательно перемешивают с эритроцитами чистой стеклянной палочкой, после чего пластинку слегка покачивают. При этом наблюдают результат (наличие или отсутствие агглютинации эритроцитов). За результатом реакции наблюдают на протяжении 15-20 минут при периодическом покачивании пластиинки.
10. Последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация принимают за титр выявленных неполных резус-антител. Если агглютинация наблюдается во всех разведениях сыворотки, то, следовательно, титр резус-антител выше 1:1024. В этом случае необходимо продолжить разведение сыворотки и далее исследовать ее, как изложено выше.

5.3. Исследование сыворотки на наличие неполных резус-антител при помощи реакции конглютинации с применением желатина (в пробирках)

Специальные реагенты и оборудование:

- стандартные эритроциты групп 0(I) (Rh+) и 0(I) (Rh-);
- 10% раствор желатина;
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- штативы, пробирки, предметные и покровные стекла;
- стеклянные или пластмассовые пипетки, палочки;
- водяная баня, суховоздушный термостат (46-48°C);
- термометр;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- микроскоп;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

5.3.1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Для приготовления стандартных эритроцитов используют кровь без консерванта или кровь, стабилизированную любым консервантом. Маркируют чистые сухие пробирки. В одну пробирку отбирают кровь 3-5 доноров 0(I) (Rh+), в другую 3-5 доноров 0(I) (Rh-) так, чтобы в пробирках получилась смесь крови доноров в количестве 0,5-2 мл.

Далее в пробирки добавляют изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, осторожно перемешивают содержимое пробирок и центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надсадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют трижды, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используются в качестве стандартов.

Необходимо проводить контрольное исследование приготовленных стандартных эритроцитов при помощи стандартных сывороток или моноклональных антител.

Примечание. Отмытые стандартные эритроциты не должны содержать сгустки крови. Не допускается использование лизированных стандартных эритроцитов.

5.3.2. Техника исследования сыворотки на наличие неполных резус-антител с помощью реакции конглютинации с применением желатина (в пробирках)

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Предварительно определяют группу крови по системе АВО и системе Резус в исследуемом образце крови.
2. Маркируют пробирки высотой 10 см соответственно числу образцов стандартных эритроцитов и устанавливают в штатив, включая пробирку для контрольного исследования сыворотки с собственными эритроцитами.
3. В пробирки в соответствии с их маркировкой чистой пастеровской пипеткой вводят по одной капле (0,05 мл) стандартных эритроцитов.
4. В контрольную пробирку вносят маленькую каплю (0,05 мл) собственных

эритроцитов.

5. Во все пробирки прибавляют по 2 капли (0,1 мл) 10% раствора желатина, подогретого до разжижения на водяной бане при температуре 46–48°C.
6. После этого во все пробирки вводят по 2 капли (0,1 мл) исследуемой сыворотки, пробирки встряхивают для перемешивания их содержимого и помещают в водяную баню при температуре 46–48°C на 10 минут или в суховоздушный термостат на 30 минут.
7. В пробирки после извлечения из водяной бани наливают 5–8 мл изотонического раствора натрия хлорида. Содержимое пробирок перемешивают путем 1–2-кратного перевертывания и наблюдают результат (наличие или отсутствие агглютинации эритроцитов).

5.3.3. Трактовка результатов исследования сыворотки на наличие неполных резус-антител с помощью реакции конглютинации с применением желатина (в пробирках)

Результат реакции просматривают на свет невооруженным глазом, с последующим учетом реакции под микроскопом.

Наличие агглютинации в пробирках с образцами резус- положительных эритроцитов и отсутствие ее с резус-отрицательными и собственными эритроцитами указывает на содержание в испытуемой сыворотке неполных резус-антител.

Отсутствие агглютинации со всеми образцами эритроцитов указывает на то, что неполные резус-антитела анти-D(Rho), анти-C(rh'), анти-E(rh''), а также анти-c(hr') , анти-e(hr'') не обнаружены.

5.3.4. Определение титра неполных резус-антител, выявленных с помощью реакции конглютинации с применением желатина (в пробирках)

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. В штатив устанавливают 10 пробирок с обозначениями: «1:2», «1:4», «1:8» «1:16» и т. д. до «1:1024».
2. Во все пробирки вводят по 2 капли (0,1 мл) изотонического раствора натрия хлорида.
3. В первую пробирку этой же пипеткой вводят 2 капли (0,1 мл) исследуемой сыворотки. Из первой пробирки после перемешивания две капли переносят во вторую, из второй – в третью, из третьей – в четвертую и так до последней пробирки, из которой две капли (0,1 мл) удаляют. В результате в пробирках получаются разведения сыворотки от 1:2 до 1:1024.
4. Во все пробирки добавляют по одной капле (0,05 мл) стандартных эритроцитов 0(I) (Rh+).
5. Во все пробирки вводят по 2 капли (0,1 мл) 10% раствора желатина, предварительно подогретого до разжижения на водяной бане при температуре 46–48°C.
6. Пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при температуре 46–48°C на 10 минут или в суховоздушный термостат на 30 минут.
7. После извлечения пробирок из водяной бани в них доливают по 5–8 мл изотонического раствора натрия хлорида и наблюдают результат. Результат реакции просматривают на свет невооруженным глазом, с последующим учетом реакции под микроскопом. Последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация, принимается за титр выявленных неполных резус-антител.

Если агглютинация наблюдается во всех разведениях сыворотки, то,

следовательно, титр резус-антител выше 1:1024. В этом случае необходимо продолжить разведение сыворотки и далее продолжать исследование, как изложено выше.

5.4. Исследование сыворотки на наличие полных резус-антител методом агглютинации в солевой среде (в маленьких пробирках)

Специальные реагенты и оборудование:

- стандартные эритроциты 0(I) (Rh+) и 0(I) (Rh-);
- 0,9% раствор натрия хлорида;
- штативы, пробирки;
- стеклянные или пластмассовые пипетки;
- термостат (37°C);
- термометр;
- секундомер;
- бытовой холодильник;
- лупа с 6-8-кратным увеличением.

5.4.1. Предварительная обработка стандартных эритроцитов

Для приготовления стандартных эритроцитов используют кровь без консерванта или кровь, стабилизированную любым консервантом. Маркируют чистые сухие пробирки. В одну пробирку отбирают кровь 3-5 доноров 0(I) (Rh+), в другую 3-5 доноров 0(I) (Rh-) так, чтобы в пробирках получилась смесь крови доноров в количестве 0,5-2 мл.

Далее в пробирки добавляют изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1:10, осторожно перемешивают содержимое пробирок и центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надсадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой. Такое отмывание повторяют трижды, после чего на дне пробирок остаются эритроциты, которые используются в качестве стандартов. Из отмытых стандартных эритроцитов готовят 2% взвесь. Для этого маркируют пробирки по числу образцов стандартных эритроцитов. В пробирки капают по 2,5 мл (49 капель) изотонического раствора натрия хлорида, затем в каждую пробирку в соответствии с ее маркировкой переносят одну каплю стандартных эритроцитов. Содержимое пробирок тщательно перемешивают для получения равномерной взвеси стандартных эритроцитов. Аналогично методике приготовления 2% взвеси стандартных эритроцитов приготовить 2% взвесь исследуемых эритроцитов.

Необходимо проводить контрольное исследование приготовленных стандартных эритроцитов при помощи стандартных сывороток или моноклональных антител.

Примечание. Отмытые стандартные эритроциты не должны содержать сгустки крови. Не допускается использование лизированных стандартных эритроцитов.

5.4.2. Техника исследования сыворотки на наличие полных резус-антител методом агглютинации в солевой среде (в маленьких пробирках)

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. Предварительно определяют группу крови по системе АВО и системе Резус в исследуемом образце крови.
2. В штатив устанавливают маленькие промаркованные пробирки (высотой 2-

2,5 см с внутренним диаметром 0,5-0,6 см, с гладким дном округлой формы) по числу образцов эритроцитов, с которыми исследуется сыворотка, **включая контрольное исследование с 2% взвесью собственных эритроцитов.**

3. Во все пробирки вводят по одной капле (0,05 мл) испытуемой сыворотки и по одной капле (0,05 мл) изотонического раствора натрия хлорида. Пробирки встряхивают для перемешивания их содержимого.
4. В пробирки в соответствии с их маркировкой чистой пастеровской пипеткой вводят по одной капле (0,05 мл) 2% взвеси стандартных эритроцитов.
5. В контрольную пробирку вносят маленькую каплю (0,05 мл) 2% взвеси собственных эритроцитов.
6. Содержимое пробирок снова перемешивают и штатив с ними помещают для инкубации в термостат при температуре 37°C на 1 час.
7. После инкубации штатив с пробирками вынимают и наблюдают результат в виде наличия или отсутствия агглютинации эритроцитов.

5.4.3. Трактовка результатов исследования сыворотки на наличие полных резус-антител методом агглютинации в солевой среде (в маленьких пробирках)

Результат реакции определяется с помощью лупы с 6-8-кратным увеличением по форме осадка эритроцитов на дне пробирки.

При положительном результате осадок эритроцитов располагается на дне неравномерным слоем. Видна шероховатость, губчатость или зернистость его структуры. Края осадка никогда не бывают ровными, они изогнуты, иногда завернуты внутрь. В некоторых случаях эритроциты располагаются в виде волнистого венчика вокруг более светлой центральной части.

При отрицательном результате осадок эритроцитов располагается равномерным слоем без шероховатостей и неровностей, иногда с небольшим просветлением в центре. Границы его представляют собой правильно очерченный круг. Диаметр осадка при отрицательном результате всегда меньше, чем при положительном.

Наличие агглютинации в пробирках с резус-положительными образцами эритроцитов и отсутствие ее с резус-отрицательными и собственными эритроцитами указывают на присутствие в сыворотке полных резус-антител. Отсутствие агглютинации со всеми образцами эритроцитов указывает на то, что полные резус-антитела анти-D(Rho), анти-C(rh'), анти-E(rh''), анти-c(hr') , анти-e(hr'') – не выявлены.

5.4.4. Определение титра полных резус-антител, выявленных методом агглютинации в солевой среде (в маленьких пробирках)

Определение проводят в помещении с хорошим освещением, при температуре окружающего воздуха от +15 до 25°C.

1. В штатив устанавливают 10 маленьких пробирок с обозначениями: «1:2», «1:4», «1:8» «1:16» и т. д. до «1:1024».
2. Во все пробирки, капают по 2 капли (0,1 мл) изотонического раствора натрия хлорида.
3. В первую пробирку (с обозначением «1:2») вводят 2 капли (0,1 мл) испытуемой сыворотки. После перемешивания из первой пробирки переносят 2 капли во вторую, из второй - в третью и т. д. до последней пробирки, из которой 2 капли удаляют. В результате в пробирках получаются разведения сыворотки от 1:2 до 1:1024.
4. Во все пробирки добавляют по одной (0,05 мл) капле 2% взвеси стандартных эритроцитов 0(I) (Rh+).

5. Содержимое пробирок перемешивают и штатив помещают для инкубации в термостат при температуре 37°C на 1 час.

6. После инкубации штатив с пробирками вынимают и наблюдают результат.

Последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация, принимается за титр полных резус-антител.

5.5. Феномен зоны

При очень высокой степени иммунизации организма резус-антigenами образующиеся резус-антитела иногда дают феномен зоны. Этот феномен заключается в том, что сыворотка крови таких лиц, будучи взята неразведенной или в небольшом разведении (1:2), может не дать или дать слабую положительную реакцию при ее исследовании с резус-положительными эритроцитами. Однако если такую сыворотку развести, то при некотором разведении (чаще всего 1:8, 1:16, но иногда и более) резус-антитела в ней становятся активными и дают хорошо выраженную положительную реакцию. Реже всего феномен зоны бывает выражен при исследовании сыворотки непрямой пробой Кумбса. Поэтому проба Кумбса является очень ценной реакцией для выявления неполных резус-антител.

Если все методы, включая непрямую пробу Кумбса, не выявляют в сыворотке резус-антител, а в анамнезе у лица, кровь которого испытывается, есть указания на сенсибилизацию к резус-антителу, то для исключения феномена зоны следует исследовать эту сыворотку, взятую в разведениях. Для этого сыворотка разводится и исследуется, как указано для каждого метода в разделах "Определение титра антител".

Если при наблюдении результата в каких-либо разведениях сыворотки отмечается положительная реакция, следовательно, в испытуемой сыворотке есть антитела. В этих случаях для дальнейшего исследования сыворотки ее следует развести, при этом выбрать то разведение, в котором наблюдалась наиболее выраженная положительная реакция.

Разводить сыворотку необходимо изотоническим раствором натрия хлорида. Дальнейшее определение титра антител проводится, как описано выше, для каждого метода. При установлении высоты титра учитывается разведение нативной сыворотки начиная с разведения 1:2.

5.6. Специфичность резус-антител

Сыворотки, давшие положительный результат со всеми образцами резус-положительных эритроцитов, могут содержать как «чистые» антитела анти-D(Rh_0), так и антитела к нескольким антигенам: анти-C+D(Rh_0'), анти- D+E(Rh_0''), анти- C+D+E(Rh_0''').

В некоторых случаях исследуемые сыворотки, содержащие резус-антитела, могут вызвать агглютинацию избирательно - не всех резус-положительных эритроцитов. Это может быть связано с тем, что в испытуемой сыворотке имеются антитела не анти-D (Rh_0), которые встречаются чаще, а анти-C(rh') или анти-E(rh'').

Положительный результат может также наблюдаться и с резус-отрицательными эритроцитами за счет других антигенов системы резус - анти-c(hr') , анти-e(hr'') или антигенов других систем.

Для выяснения специфичности резус-антител необходимо специальное исследование сыворотки с набором стандартных эритроцитов, включая эритроциты с фенотипом: cDe(Rh_0), Cde (rh'), cdE (rh''), а также резус-

отрицательные образцы, включая содержащие и не содержащие в эритроцитах антигены Келл (K) и Даффи (Fy). С ними же проводится и титрование сыворотки.

5.7. Оценка результатов определения резус-антител

Заключение о наличии в сыворотке резус-антител можно сделать при положительном результате, полученном любым методом исследования.

Заключение об отсутствии в сыворотке резус-антител можно сделать только при отрицательном результате, полученном при исследовании не менее чем двумя методами, одним из которых является любой метод, выявляющий неполные резус-антитела, а другим – реакция агглютинации в солевой среде, выявляющая полные резус-антитела. При этом следует учитывать возможный феномен зоны.

Министр здравоохранения

В.В. Кучковой



ЗАРЕГИСТРИРОВАНО

390

регистрационный №

2015

года (для заполнения)

УТВЕРЖДЕНО

Приказ Министерства здравоохранения
Донецкой Народной Республики
04.08.2015 № 012.1/244

ИНСТРУКЦИЯ

по переливанию крови и ее компонентов

1. Общие положения

1.1. Введение

Гемотрансфузия - лечебный метод, связанный с введением в кровяное русло больного (донора) компонентов крови, взятых от другого человека (донора), или от самого пациента (аутогемотрансфузия), а также крови, излившейся в полости тела при травмах или операциях (реинфузия). Сегодня цельная кровь, в основном, сохраняет свое значение в качестве сырья для изготовления компонентов крови и концентратов замороженных эритроцитов. Переливание цельной консервированной крови в историческом аспекте сыграло свою роль в медицине до того времени, пока не была введена компонентная терапия и плазмозаменители. Показаний к переливанию цельной крови в настоящее время не существует.

Переливание цельной консервированной крови в историческом аспекте сыграло свою роль в медицине до того времени, пока не была введена компонентная терапия и плазмозаменители.

Должно стать принципом, что для переливаний компонентов крови и препаратов есть одно показание - заместительная (субSTITУционная) терапия.

Безусловно, незаменимым компонентом крови чрезвычайно широко применяется эритроциты.

Переливание компонентов крови (гемотрансфузии) применяют для замещения острой кровопотери, а также для пополнения тех составляющих крови, которых не хватает организму и недостаток которых нельзя компенсировать другими способами.

Периферическая кровь является сложной морфофизиологической системой. В ее составе входит клеточная масса, которая включает эритроциты, выполняющие газотранспортную функцию, лейкоциты - клетки иммунной защиты, тромбоциты - регуляторы свертывания крови и жидкую основу - плазму, которая выполняет важные гуморальные функции. Современная биотехнология обладает широкими возможностями разделять кровь на лечебные компоненты - эритроциты, тромбоциты и плазму, и фракционировать плазму на высокоценные белковые препараты - альбумин, иммуноглобулины, факторы свертывания крови, энзимы и другие белки, которые нашли широкое лечебное применение и без которых современная медицина не может обойтись.

С позиции современных знаний переливание крови нужно трактовать как трансфузацию периферической крови, при которой проявляются все закономерности трансфузационного иммунитета. Переливание цельной крови, особенно в больших количествах и от многих доноров, связано с повышенным риском развития таких опасных состояний как замедленный гемолиз, острые негемолитические реакции, аллергичности, синдром массивных гемотрансфузий, осложнения беременности, склонность к повторным трансфузиям и многое другое. Опасность такого риска

снижается почти до нуля, если применяются компоненты и препараты донорской крови.

Нельзя оставлять без внимания то обстоятельство, что с переливаниями донорской крови и ее нативных компонентов могут быть перенесены реципиенту возбудители трансмиссивных инфекций (вирусы гепатитов, возбудитель СПИДа и другие, которых становится все больше). В недалеком будущем станет обязательным вирус-инактивация всех нативных препаратов плазмы крови. В настоящее время акцент ставится на основательное привентивное обследование доноров. Необходимо иметь в виду, что принципы и методики подбора для трансфузий совместимых эритроцитов такие же, как и при тестировании цельной крови.

1.2. Организационные принципы переливания компонентов крови

Эритроцитсодержащие компоненты крови можно переливать только в том случае, если группа и резус-принадлежность совпадают у донора и реципиента.

Во всех случаях до начала переливания крови (эритроцитов) обязательно проведение лабораторной пробы на индивидуальную совместимость, биологической пробы.

Переливаемая свежезамороженная плазма донора должна быть той же группы по системе АВО, что и у реципиента. При переливании больших объемов свежезамороженной плазмы (более 1 л) соответствие донора и реципиента по антигену D(Rh_0) учитывается обязательно.

В экстренных случаях при отсутствии одногруппной свежезамороженной плазмы допускается переливание свежезамороженной плазмы группы AB(IV) реципиенту с любой группой крови.

При поступлении больного в стационар в плановом порядке первично группу крови по системе АВО определяет врач клинического отделения или другой специалист, прошедший специальную подготовку по иммunoсерологии.

Подтверждающее определение группы крови по системе АВО, резус-принадлежность и определение антиэритроцитарных антител у реципиента осуществляют специалисты клинико-диагностической лаборатории.

Бланк с полученным результатом исследования подклеивают в медицинскую карту стационарного больного. Результат исследования лечащий врач переписывает в правый верхний угол титульного листа истории болезни и заверяет своей подписью. Запрещается переносить данные о группе крови и резус-принадлежности на титульный лист истории болезни с других документов.

Переливание крови и ее компонентов проводят: лечащий врач, дежурный врач, врач отделения трансфузиологии, имеющие специальную подготовку, а во время операции - анестезиолог и хирург, которые не принимают непосредственного участия в операции или проведении наркоза.

Для выполнения плановых трансфузий реципиентам, в анамнезе которых есть неоднократные переливания крови или ее компонентов и сведения о перенесенных трансфузионных реакциях, повторная беременность, рождение детей с гемолитической болезнью новорожденного, а также больным, имеющим аллоиммунные антитела, необходим предварительный индивидуальный подбор совместимых эритроцитов в специализированной лаборатории учреждений службы крови.

Если эритроциты или взвесь подобраны реципиенту индивидуально в специализированной лаборатории, врач, выполняющий трансфузию перед переливанием определяет группу крови реципиента, донора и проводит только

одну пробу на индивидуальную совместимость - на плоскости при комнатной температуре.

При необходимости индивидуального подбора крови врач, который установил показания к гемотрансфузии, направляет в отделение переливания крови или в центр крови промаркованную пробирку с кровью больного (не менее 8,0-10,0 мл), заявку на гемотрансфузионную среду, направление для индивидуального подбора, в которых указывает: фамилию, имя, отчество больного, установленную группу крови и резус-принадлежность, диагноз, трансфузионный и акушерский анамнез, наименование необходимого компонента крови, его дозу, причину подбора крови, название отделения ЛПУ, ставит подпись.

Перед тем, как перелить гемотрансфузионную среду, врач, ответственный за переливание, должен убедиться в пригодности ее для трансфузии и в идентичности обозначенной группы крови, резус-принадлежности донора и реципиента. Для этого проводится визуальный контроль контейнера с компонентами крови: герметичность упаковки, правильность паспортизации. Макроскопическая оценка качества компонентов крови, сводится к выявлению видимых признаков бактериального загрязнения, наличия сгустков и гемолиза.

Определять пригодность гемотрансфузионной среды необходимо при достаточном освещении непосредственно на месте хранения, не допуская взбалтывания, так как это может привести к ошибочному выводу в результате окраски плазмы в розовый цвет при смешивании ее с эритроцитами. В перемешанной крови можно легко не заметить пленок и сгустков.

Критериями годности эритроцитов (крови) для переливания являются: срок заготовки и хранения, прозрачность плазмы, отсутствие в ней хлопьев, прожилок фибринна, выраженного гемолиза (красной окраски слоя плазмы), равномерность слоя глобулярной массы и отсутствие в нем сгустков, наличие четкой границы между глобулярной массой и плазмой.

В случае бактериального загрязнения эритроцитов (крови) плазма приобретает тусклый серо-бурый оттенок, она теряет прозрачность, появляются частицы в виде хлопьев или пленок. Такие эритроциты (кровь) переливать нельзя.

Критерием годности плазмы свежезамороженной является прозрачность при комнатной температуре.

Запрещается переливать кровь и ее компоненты, полученные от доноров, не обследованных на СПИД, антигены гепатита В, С и сифилис.

Транспортировка компонентов крови осуществляется только медицинским персоналом, несущим ответственность за соблюдение правил транспортировки. Компоненты крови во избежание гемолиза при транспортировке не должны подвергаться переохлаждению или перегреванию. При транспортировке компоненты крови должны находиться в изотермическом контейнере (сумке-холодильнике). При длительной транспортировке (несколько часов) или при высокой температуре окружающей среды (выше 20°C) необходимо использование сухого льда или аккумуляторов холода, обеспечивающих изотермический режим в транспортном контейнере. Необходимо оберегать компоненты крови от встряхивания, ударов, переворачивания и перегрева, клеточные компоненты - от замораживания.

В день трансфузии (переливания) донорской крови и ее компонентов, не ранее, чем за 24 часа до трансфузии (переливания) у реципиента из вены берут кровь в количестве 5,0 мл в пробирку без антикоагулянта для проведения обязательных контрольных исследований и проб на совместимость. Пробирка должны быть промаркована (указать фамилию и инициалы реципиента, номер

медицинской документации, наименование отделения и ЛПУ, где проводится трансфузия (переливание) донорской крови, групповую и резус-принадлежность, дату взятия образца).

При переливании компонентов крови врач, который выполняет трансфузию, обязан, независимо от проведенных ранее исследований и имеющихся записей, лично провести следующие контрольные исследования:

- 1) определить групповую принадлежность крови реципиента по системе АВ0 и сверить результат с данными истории болезни;
- 2) определить групповую принадлежность крови донора по системе АВО (резус-принадлежность донора устанавливается по обозначению на контейнере) и сравнить результат с данными на этикетке контейнера;
- 3) провести пробы на индивидуальную совместимость крови донора и реципиента по системе АВ0 и резус-принадлежности;
- 4) провести биологическую пробу.

Групповую и резус-принадлежность донора врач, проводящий трансфузию (переливание) свежезамороженной плазмы или тромбоцитов, устанавливает по маркировке на контейнере с компонентом крови, при этом пробы на индивидуальную совместимость не проводятся.

Необходимым предварительным условием переливания компонентов крови является информированное добровольное письменное согласие гражданина.

В случаях, когда состояние гражданина не позволяет ему выразить свою волю, а медицинское вмешательство неотложно, вопрос о его проведении в интересах гражданина решает консилиум, а при невозможности собрать консилиум - непосредственно лечащий (дежурный) врач с последующим уведомлением должностных лиц лечебно-профилактического учреждения.

План выполнения операции переливания компонентов крови обсуждается и согласовывается с пациентом в письменном виде, а при необходимости - с его родственниками. Письменное согласие пациента (родственников) оформляется и подшивается к карте стационарного больного.

Переливание крови и ее компонентов проводят с соблюдением правил асептики при помощи одноразовых систем для переливания крови. Никакие лекарственные или инфузионные растворы в компоненты крови не добавляются. Используется отдельный трансфузионный путь, если одновременно с компонентами крови нужно вводить, кроме физиологического раствора, другие внутривенные жидкости.

С целью предупреждения иммунологических реакций у определенного контингента больных (дети, беременные, лица с иммунодепрессией, при множественных трансфузиях у лиц с отягощенным трансфузионным анамнезом) переливание эритроцитов и взвеси, тромбоцитов следует проводить с использованием специальных лейкоцитарных фильтров.

После принятия решения о трансфузии, каждый сотрудник, участвующий в процессе, несет ответственность за получение подходящей крови или ее компонентов конкретным больным в надлежащее время.

Для получения необходимой крови и ее компонентов, для конкретных больных в надлежащее время, требуется:

- определить для пациента клиническую потребность в крови или ее компонентах, время трансфузии;
- информировать пациента и/или его родственников о предполагаемой трансфузии и отметить это в истории болезни (информированное согласие);
- записать показания в историю болезни;
- выбрать необходимый компонент крови;

- заполнить бланк заявки на кровь аккуратно и разборчиво. Указать обоснование трансфузии;
- при неотложной потребности в крови сделать заявку в учреждение службы крови немедленно;
- при необходимости индивидуального подбора направить промаркованный образец крови пациента в специализированную лабораторию станции (отделения) переливания крови;
- обеспечить получение компонентов крови персоналом ЛПУ;
- хранить компоненты крови в соответствующих условиях. Если это невозможно, то их нужно сразу использовать для трансфузий.

После каждой трансфузии (переливания) компонентов донорской крови больной должен находиться под наблюдением медперсонала. Эффективность трансфузии (переливания) компонентов донорской крови проверяется клиническими данными и результатами лабораторных исследований.

2. Определение групп крови по системе АВ0

Групповую принадлежность крови определяют реакцией прямой агглютинации с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток или моноклональных антител в соответствии с инструкциями по иммunoсерологии.

2.1. Определение группы крови (эритроцитов) по системе АВ0 стандартными изогемагглютинирующими сыворотками

Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки системы АВ0 двух различных серий каждой группы наносят на белую пластинку в соответствии с отметками таким образом, чтобы получилось два ряда по три крупные капли (0,1 мл) в следующем порядке слева направо: $O_{\alpha\beta}$ (I), A_{β} (II), B_{α} (III). Исследуемую кровь наносят по одной маленькой капле (0,01 мл) рядом с каждой каплей сыворотки и перемешивают отдельными стеклянными палочками.

Наблюдение за ходом реакции проводят при легком покачивании пластинки в течение 5 минут при комнатной температуре (15-25°C). С наступлением агглютинации эритроцитов в реагирующую смесь можно добавить по одной капле (0,05 мл) изотонического раствора натрия хлорида для снятия возможной неспецифической агрегации эритроцитов и продолжать наблюдение еще 5 минут.

Оценка результатов: реакция в каждой капле может быть положительной (наличие агглютинации эритроцитов) или отрицательной (отсутствие агглютинации).

Различные соотношения положительных и отрицательных результатов дают возможность сделать вывод о групповой принадлежности исследуемой крови (табл. 1).

Оценка результатов определения группы крови (эритроцитов) с помощью

стандартных изогемагглютинирующих сывороток

Изогемагглютинирующие сыворотки группы			Исследуемая кровь принадлежит к группе
$O_{\alpha\beta}$ (I)	A_β (II)	B_α (III)	
-	-	-	0 (I)
+	-	+	A (II)
+	+	-	B (III)
+	+	+	AB (IV)
Контроль с сывороткой группы AB_0 (IV) -			

Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации,
знаком минус (-) - отсутствие агглютинации

1. Если сыворотки всех трех групп дали отрицательную реакцию, т.е. все смеси остались равномерно окрашенными в красный цвет без признаков агглютинации, это значит, что кровь не содержит антигенов А и В, т.е. принадлежит к группе О(I).

2. Если сыворотки групп $O_{\alpha\beta}$ (I) и B_α (III) дали положительную реакцию, а сыворотка группы A_β (II) - отрицательную, это значит, что кровь содержит антиген А, т.е. принадлежит к группе А(II).

3. Если сыворотки групп $O_{\alpha\beta}$ (I) и A_β (II) дали положительную реакцию, а сыворотка группы B_α (III) - отрицательную, то исследуемая кровь содержит антиген В, т.е. принадлежит к группе В(III).

4. Если сыворотки всех трех групп дали положительную реакцию, это указывает на то, что исследуемая кровь содержит оба антигена - А и В и принадлежит к группе AB(IV). Однако в этом случае для исключения неспецифической агглютинации исследуемых эритроцитов проводят контрольное исследование со стандартной сывороткой группы AB_0 (IV), в которой отсутствуют групповые антитела. Лишь отсутствие агглютинации в этой контрольной пробе дает основание считать, что положительный результат с сыворотками групп $O_{\alpha\beta}$ (I), A_β (II), B_α (III), является достоверным, то есть можно отнести исследуемую кровь к группе AB(IV).

2.2. Определение группы крови (эритроцитов) по системе AB0 с помощью

моноклональных антител

Моноклональные реагенты предназначены для определения групп крови человека по системе АВО в прямой реакции агглютинации и применяются взамен или параллельно со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками.

Хотя моноклональные реагенты отличаются высокой активностью и высокой выраженностью агглютинации, чтобы избежать ошибок при определении группы крови используют по две серии реагентов анти-А и анти-В. Определение можно проводить одной серией каждого реагента, если используется и реагент анти-AB, который является дополнительным контролем правильности определения группы крови.

Моноклональные антитела анти-А, анти-В и анти-AB наносят на планшет или пластину индивидуальными пипетками по одной большой капле (0,1 мл) под соответствующими обозначениями. Рядом с каплями антител наносят исследуемую кровь по одной маленькой капле (0,01-0,02 мл).

Наблюдение за ходом реакции проводят при легком покачивании пластинки в течение 3-5 минут (согласно инструкции) при комнатной температуре (15-25°C). С наступлением агглютинации эритроцитов в реагирующую смесь можно добавить по 1 капле (0,05 мл) изотонического раствора натрия хлорида для снятия возможной неспецифической агрегации эритроцитов.

Оценка результатов реакции агглютинации с моноклональными антителами представлена в таблице 2.

Таблица 2

**Оценка результатов определения группы крови (эритроцитов)
с помощью моноклональных антител**

Результат реакции с МКА:			Исследуемая кровь принадлежит к группе
анти-А	анти-В	анти-АВ	
–	–	–	O(I)
+	–	+	A(II)
–	+	+	B(III)
+	+	+	AB(IV)
Контроль с изотоническим раствором NaCl –			

Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации, знаком минус (–) - отсутствие агглютинации.

1. Отсутствие агглютинации с реагентами анти-А, анти-В, анти-АВ указывает на то, что исследуемые эритроциты не имеют антигенов А и В, следовательно, кровь принадлежит к группе O(I).

2. Наличие агглютинации с реагентами анти-А и анти-АВ указывает на то, что в исследуемых эритроцитах имеется антиген А – кровь принадлежит к группе A(II).

3. Наличие агглютинации с реагентами анти-В и анти-АВ указывает на то, что в исследуемых эритроцитах имеется антиген В – кровь принадлежит к группе B(III).

4. Агглютинация с реагентами анти-А, анти-В, анти-АВ указывает на то, что в исследуемых эритроцитах устанавливается наличие антигенов А и В – кровь принадлежит к группе AB(IV).

С целью исключения аутоагглютинации, которая может наблюдаться у некоторых больных (миеломная болезнь, ожоговая болезнь и т.д.), а также в пуповинной крови новорожденных при установлении группы крови AB(IV), необходимо провести дополнительное контрольное исследование эритроцитов с 0,9% раствором натрия хлорида. Для этого необходимо смешать на плоскости одну каплю исследуемой крови 0,01мл, с каплей физиологического раствора 0,1 мл. Наблюдать за ходом реакции 3-5 минут. Кровь можно отнести к группе AB(IV) только при отсутствии агглютинации эритроцитов в физиологическом растворе.

3. Определение резус-принадлежности крови (эритроцитов)

Резус-принадлежность крови определяют в реакции агглютинации согласно действующим инструкциям с помощью стандартных изоиммунных сывороток или моноклональных антител.

Исследование проводят в условиях лаборатории следующими методами:

- 1) реакция агглютинации на плоскости с помощью полных анти-D IgM антител;
- 2) реакция конглютинации с применением 10% желатина;
- 3) непрямой антиглобулиновый тест (непрямая проба Кумбса) с помощью неполных анти-D антител.

4. Лабораторные пробы на совместимость крови реципиента и донора

Основным принципом предупреждения гемотрансфузионных осложнений является обеспечение совместимости крови донора и реципиента.

Проба на индивидуальную совместимость позволяет убедиться в том, что у реципиента нет антител, направленных против эритроцитов донора и таким образом предотвратить трансфузию эритроцитов, несовместимых с кровью больного.

Проба на совместимость, выполняемая на плоскости при комнатной температуре, имеет целью выявить у реципиента полные групповые антитела системы AB0, MNSs, Lewis и др. Проба на совместимость с применением 10% желатина, непрямая проба Кумбса предназначены для выявления у реципиента неполных групповых антител к антигенам системы Резус: D, C, E, c, e, а также систем Келл (K), Даффи (Fy), Кидд (Jk) и др.

Все пробы выполняют с сывороткой крови реципиента, которую получают путем центрифугирования или отстоя образца крови. Сыворотка пригодна для пробы при хранении в холодильнике в течение 48 часов.

Пробы на совместимость крови реципиента и донора учитывают, просматривая результат на свет невооруженным глазом или через лупу 6-8-кратного увеличения. Для достоверности полученных проб и в сомнительных случаях результат на индивидуальную совместимость контролируют под микроскопом.

Пробы на совместимость по системе АВО и системе Резус проводятся отдельно и не могут заменить друг друга, так как антитела разного характера требуют разных методов для своего выявления. Донор считается совместимым, если ни в одной из проб на индивидуальную совместимость не наблюдается ни гемолиза, ни агглютинации. Наличие их свидетельствует о присутствии в сыворотке реципиента антител к эритроцитам предполагаемого донора. Таким реципиентам необходимо переливать эритроциты, не содержащие антигенов, против которых направлены антитела.

Если больному переливается кровь из нескольких контейнеров, пробы на совместимость должны быть сделаны с кровью из каждого контейнера, даже если на них обозначено, что кровь получена от одного и того же донора.

Если результат проб на индивидуальную совместимость вызывает сомнения, кровь необходимо направить в специализированную лабораторию центра крови для индивидуального подбора.

При необходимости повторных переливаний эритроцитов содержащих компонентов крови для индивидуального подбора нужно использовать свежезаготовленный образец крови реципиента.

4.1. Пробы на индивидуальную совместимость группы крови (эритроцитов) по системе АВ0

Проба проводится на плоскости при комнатной температуре (15-25°C). На белую пластину или планшет наносят 2-3 капли сыворотки реципиента и добавляют в 5 раз меньшую каплю эритроцитов донора (соотношение 5:1). Для удобства рекомендуется сначала выпустить несколько капель эритроцитов из контейнера на край планшета или пластины, затем оттуда стеклянной палочкой перенести маленькую каплю эритроцитов в сыворотку. Далее эритроциты перемешивают с сывороткой, пластинку периодически покачивают в течение 5 минут, наблюдая за ходом реакции. По истечении указанного времени в реагирующую смесь можно добавить 1-2 капли физиологического раствора для снятия возможной неспецифической агрегации эритроцитов.

Оценка результатов: наличие агглютинации эритроцитов означает, что кровь донора несовместима с кровью реципиента и не должна быть ему перелита. Отсутствие агглютинации эритроцитов свидетельствует о совместимости крови донора и реципиента по системе АВ0. В сомнительном случае результат полученной пробы на индивидуальную совместимость контролируют под микроскопом.

Следует помнить, что при несовместимости по группам крови АВ0 агглютинация наступает обычно в течение первой минуты, но при низком титре антител у больного, а также при слабо выраженной активности антигена у донора, агглютинация может наступить значительно позже, иногда только к концу 5-й минуты.

4.2. Проба на совместимость крови (эритроцитов) по системе Резус

Ввиду того, что при сенсибилизации к резус-антителу D в подавляющем большинстве случаев образуются неполные антитела, а полные антитела образуются редко и почти всегда вместе с неполными, в лечебной практике обычно используются для пробы на совместимость те реакции, которые выявляют именно неполные антитела.

Кроме резус-антител эта пробы выявляет и многие неполные изоиммунные антитела другой специфичности. Поэтому непрямая пробы Кумбса и пробы с применением желатина особенно рекомендуются как пробы на совместимость при переливании крови больным, перенесшим трансфузционную реакцию, и другим сенсибилизованным лицам, чувствительным к введению чужих эритроцитов, хотя и совместимых по резус-принадлежности.

Проба на совместимость с использованием 10,0% раствора желатина.

Пробу проводят в пробирках при температуре 46-48°C в течение 10 минут. На дно пробирки вносят 1 каплю (0,02-0,03 мл) эритроцитов донора, затем добавляют 2 капли (0,1 мл) подогретого (до разжижения) 10,0% раствора желатина и 2 (0,1 мл) капли сыворотки реципиента.

Примечание. Раствор желатина перед употреблением необходимо тщательно осмотреть, если он не застывает в холодильнике, мутный или образует хлопья - желатин к использованию непригоден. Желатин нельзя замораживать.

Содержимое пробирки перемешивают путем встряхивания и ставят на водянную баню на 10 минут или в суховоздушный термостат на 30 минут при температуре 46-48°C. Затем пробирку вынимают из водяной бани, добавляют в нее 5,0-8,0 мл изотонического раствора натрия хлорида, перемешивают содержимое путем 1-2 кратного переворачивания пробирки. Результат учитывают, просматривая пробирку на свет невооруженным глазом или через лупу. В

сомнительном случае результат полученной пробы на индивидуальную совместимость контролируют под микроскопом.

Оценка результатов: наличие агглютинации в виде взвеси маленьких, реже крупных клубочков на фоне осветленной или полностью прозрачной жидкости означает, что эритроциты (кровь) донора несовместимы с кровью реципиента и их нельзя переливать.

Если содержимое пробирки остается равномерно окрашенным, слегка опалесцирующим и в нем не наблюдается агглютинация, эритроциты (кровь) донора совместимы с кровью реципиента.

Непрямая проба Кумбса.

В пробирку вносят одну каплю (0,02 мл) осадка трижды отмытых эритроцитов донора, для чего выдавливают из пипетки небольшую каплю эритроцитов и касаются ею дна пробирки, и добавляют 4 капли (0,2 мл) сыворотки реципиента. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием, после чего их помещают на 45 минут в термостат при температуре +37°C. По истечении указанного времени эритроциты вновь трижды отмывают и готовят 5% взвесь в физиологическом растворе. Далее 1 каплю (0,05 мл) взвеси эритроцитов переносят на фарфоровую пластинку, добавляют 1 каплю (0,05 мл) антиглобулиновой сыворотки и перемешивают стеклянной палочкой. Пластинку периодически покачивают в течение 5 мин.

Учет результатов проводят невооруженным глазом или через лупу. Агглютинация эритроцитов свидетельствует о том, что кровь реципиента и донора несовместимы, отсутствие агглютинации является показателем совместимости крови донора и реципиента.

Примечание: при проведении проб на совместимость по системе Резус следует учитывать, что если резус-отрицательному больному будет ошибочно выбрана резус-положительная кровь, это может быть выявлено только в том случае, если у реципиента имеются в крови специфические резус-антитела. Выявить различие в резус-принадлежности крови донора и реципиента, если последний не имеет антител, пробы на совместимость не может.

Предупреждение таких ошибок должно быть обеспечено предварительным определением резус-принадлежности крови донора и реципиента и тщательной проверкой записей результатов в истории болезни и на контейнере с кровью.

4.3. Причины ошибок при определении группы крови, Rh-принадлежности и проведении проб на индивидуальную совместимость и меры их предупреждения

4.3.1. Технические ошибки

4.3.2. Трудноопределимые группы крови

Ошибки при определении группы крови, Rh-принадлежности и проведении проб на индивидуальную совместимость возникают при нарушении техники выполнения исследований или в случаях трудноопределимых групп крови.

4.3.1. Технические ошибки

1) Ошибочный порядок расположения реагентов. При правильной оценке результата в каждом отдельно взятом реагенте можно сделать неправильное заключение о группе крови и резус-принадлежности, если нарушен порядок расположения реагентов или исследуемой крови в штативе или на пластинке. Поэтому каждый раз при определении группы крови следует проверять

расположение реагентов, а также визуально оценить их качество, исключить использование помутневших, частично высохших реагентов, реагентов с истекшим сроком годности. Образец исследуемой крови должен иметь четкую маркировку.

2) Температурные условия. Определение группы крови производят при температуре не ниже 15°C, поскольку исследуемая кровь может содержать поливалентные холодовые антитела, вызывающие неспецифическое склеивание эритроцитов при пониженной температуре. Видимость агглютинации может создавать образование «монетных столбиков». Неспецифическая агрегация эритроцитов, как правило, распадается после добавления 1-2 капель физиологического раствора и покачивания пластиинки. При повышенной температуре анти-А, анти-В, анти-AB антитела утрачивают активность, поэтому определение группы крови производят при температуре не выше 25°C.

3) Соотношение реагентов и исследуемых эритроцитов. Оптимальное для реакции агглютинации соотношение эритроцитов и тестовых реагентов - 1:10 при использовании гемагглютинирующих сывороток, 2-3:10 при использовании моноклональных реагентов (цоликлонов) и реагентов, приготовленных в комбинации с коллоидами.

При значительном избытке эритроцитов агглютинация может быть не замечена, особенно в тех случаях, когда агглютинационные свойства эритроцитов снижены - подгруппа A₂. При недостаточном количестве эритроцитов агглютинация медленно появляется, что также может привести к неправильной трактовке результатов в случае исследования эритроцитов со слабой агглютинабельностью.

4) Продолжительность наблюдения. Агглютинация эритроцитов появляется в течение первых 10 с, однако наблюдение за ходом реакции следует проводить не менее 5 мин, особенно внимательно наблюдая те капли, в которых агглютинация не появилась. Это позволяет выявить слабый антиген A₂, характеризующийся замедленной агглютинацией.

4.3.2. Трудноопределимые группы крови

1) Подгруппы крови. Антиген A, содержащийся в эритроцитах группы A(II) и AB(IV), может быть представлен двумя вариантами (подгруппами) - A₁ и A₂. Антиген B таких различий не имеет.

Трансфузиологическая тактика при обнаружении у реципиента подгруппы A₂(II) или A₂B(IV) заключается в следующем:

- a) реципиентам A₂(II) и A₂B(IV), имеющим анти-A₁ антитела (экстраагглютинины) переливают эритроцитсодержащие компоненты, не содержащие антиген A₁;
- б) реципиентам A₂(II) и A₂B(IV), не имеющим анти-A₁ антител, в целях профилактики сенсибилизации антигеном A₁, желательно переливать эритроциты, не содержащие антиген A₁;
- в) таким образом, реципиентам A₂(II) переливают эритроцитсодержащие компоненты A₂(II) или O(I), совместимые по резус-фактору, и свежезамороженную плазму группы A(II); реципиентам A₂B(IV) - эритроцитсодержащие компоненты A₂B(IV) или B(III), совместимые по резус-фактору, и свежезамороженную плазму группы AB(IV).

Для таких реципиентов рекомендован индивидуальный подбор крови в специализированной лаборатории центра крови.

2) Неспецифическая агглютинация эритроцитов (панагглютинация). О ней судят на основании способности эритроцитов агглютинироваться сыворотками всех групп, включая AB(IV). Неспецифическая агглютинация наблюдается при

автоиммунной гемолитической анемии и других аутоиммунных заболеваниях, сопровождающихся адсорбцией аутоантител на эритроцитах, при гемолитической болезни новорожденных, эритроциты которых нагружены аллоантителами матери.

Неспецифическую агглютинацию трудно отличить от специфической. Поэтому при наличии агглютинации эритроцитов с реагентами анти-А, анти-В, анти-АВ, анти-Д необходимо провести пробу со стандартной сывороткой AB₀(IV) и физиологическим раствором. В противном случае реципиент может быть ошибочно отнесен к группе AB(IV) резус положительный, что повлечет за собой неправильный выбор донора.

Если из-за неспецифической агглютинации эритроцитов группу крови больного установить не удается, заключение о групповой принадлежности крови не выдают, образец крови направляют в специализированную лабораторию. При наличии жизненных показаний больному переливают эритроциты группы 0(I), совместимые по резус-фактору.

3) Кровяные химеры. Кровяными химерами называют одновременное пребывание в кровяном русле двух популяций эритроцитов, отличающихся по группе крови и другим антигенам. Трансфузионные химеры возникают в результате многократного переливания эритроцитов или взвеси группы 0(I) реципиентам другой группы. Истинные химеры встречаются у гетерозиготных близнецов, а также после пересадки аллогенного костного мозга.

Установление группы крови при кровяных химерах затруднено, поскольку в некоторых случаях половина эритроцитов, циркулирующих в кровяном русле, имеет одну группу крови, а другая половина - другую.

Реципиенту, имеющему кровянную химеру, переливают эритроцитную массу или взвесь, не содержащие антигены, по отношению к которым у реципиента могут быть антитела.

4) Другие особенности. Определение группы крови AB0 и резус-принадлежности может быть затруднено у больных в связи с изменением свойств эритроцитов при различных патологических состояниях. Это может выразиться в повышенной агглютинабельности эритроцитов, наблюдавшейся у больных циррозом печени, при ожогах, сепсисе. Агглютинабельность может быть столь высока, что эритроциты склеиваются в собственной сыворотке и физиологическом растворе. При лейкозах наблюдается снижение агглютинабельности эритроцитов, в результате чего значительное их количество остается не вовлеченным в агглютинацию даже при использовании высокоактивных стандартных реагентов (ложная кровяная химера).

У некоторых новорожденных, в отличие от взрослых людей, антигены А и В на эритроцитах выражены слабо, а соответствующие антитела в сыворотке крови отсутствуют.

Во всех случаях нечеткого, сомнительного результата необходимо повторить исследование, используя дополнительно стандартные реагенты другой серии. Если результаты остаются неясными, образец крови направляют на исследование в специализированную лабораторию.

5. Биологическая проба на совместимость

После проведения контрольной проверки группы крови реципиента и донора по системе АВО, а также проб на индивидуальную совместимость врач, проводящий трансфузию (переливание) компонентов донорской крови, выполняет биологическую пробу.

Биологическая проба проводится независимо от вида и объема компонентов донорской крови и скорости их введения, а также в случае индивидуально

подобранных в клинико-диагностической лаборатории или фенотипированных эритроцитсодержащих компонентов. При необходимости переливания нескольких доз компонентов донорской крови биологическая проба выполняется перед началом переливания каждой новой дозы компонента донорской крови.

Перед переливанием контейнер с компонентами крови выдерживают после извлечения из холодильника при комнатной температуре в течение 30-40 минут, а в экстренных случаях подогревают до температуры 37°C на водяной бане под контролем термометра. Трансфузия (переливание) эритроцитсодержащих компонентов донорской крови должна быть начата не позднее двух часов после извлечения эритроцитсодержащих компонентов из холодильного оборудования и согревания до 37°C.

Однократно переливают 10-15 мл гемотрансфузионной среды со скоростью 2-3 мл (40-60 капель) в минуту в течение 3-3,5 минут, затем переливание прекращают и в течение 3 минут наблюдают за состоянием больного. При отсутствии клинических проявлений реакции или осложнений (учащение пульса, дыхания, появление удушья, затрудненное дыхание, гиперемия лица) вновь вводят 10-15 мл гемотрансфузионной среды и еще 3 минуты наблюдают за больным. Такую процедуру проводят трижды. Отсутствие реакций у больного после 3-разовой проверки является основанием для продолжения трансфузии.

В случае развития клинических признаков реакции или осложнений больной становится беспокойным: появляются ощущение холода или жара, стеснение в груди, боль в пояснице, животе, головная боль, тошнота, рвота. В этом случае могут наблюдаться: снижение артериального давления, учащение пульса, дыхания, появление бледности, а затем цианоз лица. При появлении каких-либо из упомянутых признаков переливания компонентов крови следует прекратить.

Экстренность трансфузии компонентов крови не освобождает от выполнения биологической пробы. Во время ее проведения возможно продолжение переливания солевых растворов.

В случае переливания компонентов донорской крови под наркозом о возникновении реакций или осложнений могут свидетельствовать немотивированное усиление кровоточивости в операционной ране, учащение пульса и снижение артериального давления, изменение цвета мочи при катетеризации мочевого пузыря, а также результаты пробы на выявление раннего гемолиза. В таком случае дальнейшее переливание необходимо немедленно прекратить. Хирург и анестезиолог совместно с врачом проводящим трансфузию должны решить вопрос о причинах гемодинамических нарушений. Если их вызывает трансфузия, то этот контейнер с гемокомпонентами необходимо отключить. Вопрос дальнейшей трансфузионной терапии решается ими в зависимости от клинических и лабораторных данных.

Запрещается переливать компоненты крови из одного контейнера нескольким реципиентам.

Необходимо еще раз отметить, что контрольная проверка групповой принадлежности реципиента и донора по системам АВ0 и резус, а также пробы на индивидуальную совместимость проводятся врачом непосредственно у постели реципиента или в операционной. Выполняет эти контрольные проверки только тот врач, который переливает компоненты крови (и он же несет ответственность за проводимые трансфузии).

После переливания донорский контейнер с остатками гемотрансфузионной среды и пробирка с кровью реципиента, использованная для проведения проб на индивидуальную совместимость, подлежат обязательному хранению в течение 48 часов в холодильнике при температуре 2-6°C для ретроспективных исследований.

Реципиент после трансфузии в течение 3 ч. придерживается постельного режима и находится под наблюдением лечащего или дежурного врача. У него измеряют температуру тела и артериальное давление, через 1, 2 и 3 ч. соответственно, фиксируя эти данные в медицинской карте стационарного больного. Контролируется наличие и почасовой объем мочеотделения и сохранение нормального цвета мочи. Появление красной окраски мочи при сохранении прозрачности свидетельствует об остром гемолизе. На следующий день после переливания компонентов крови обязательно проводят клинический анализ мочи и крови и фиксируют эти показатели в медицинской карте стационарного больного.

Врач, переливающий гемокомпоненты, обязан зарегистрировать трансфузию в журнале регистрации преливаний крови, а так же сделать об этом запись в медицинской карте стационарного больного и оформить протокол, в котором следует отметить:

- 1) медицинские показания к трансфузии компонентов донорской крови;
- 2) паспортные данные с этикетки донорского контейнера, содержащие сведения о коде донора, группе крови по системе АВО и резус-принадлежности, номере контейнера, дате заготовки, названии учреждения службы крови. После окончания трансфузии этикетка открепляется от контейнера с компонентом крови и вклеивается в медицинскую карту больного;
- 3) результат контрольной проверки групповой принадлежности крови реципиента по системе АВ0;
- 4) результат контрольной проверки групповой принадлежности компонентов крови донора по системе АВ0, взятой из контейнера;
- 5) результат пробы на совместимость компонентов крови донора и реципиента по системе АВ0;
- 6) результат пробы на совместимость по системе Резус;
- 7) результат биологической пробы;

После трансфузии врач заполняет протокол и регистрационный журнал переливания трансфузионных сред. Рекомендуется для каждого реципиента, особенно при необходимости многократных трансфузий компонентов крови, дополнительно к медицинской карте больного иметь трансфузионную карту (дневник), в которой фиксируются все трансфузии, проведенные больному, их объем и переносимость.

6. Переливание компонентов крови

В лечебной практике могут применяться эритроциты нескольких видов, в зависимости от метода забора и показаний к гемотерапии:

- 1) эритроциты (после отделения плазмы) с гематокритом 0,65-0,80 л/л;
- 2) эритроцитная взвесь - эритроциты ресуспензированные в консервирующем растворе (соотношение эритроцитов и раствора определяет ее гематокрит, а состав и свойства раствора - срок хранения);
- 3) концентрат эритроцитов с уменьшенным количеством лейкоцитов и тромбоцитов;
- 4) концентрат эритроцитов размороженный и отмытый,
а также:
 - концентрат тромбоцитов, лейкоцитов
 - свежезамороженная плазма
 - замороженный нативный криопреципитат.

6.1 . Переливание эритроцитов

Эритроциты - трансфузионная среда, содержащая не менее 70,0% эритроцитов. Трансфузии эритроцитов занимают ведущее место в гемотерапии и направлены на пополнение дефицита эритроцитов при анемических состояниях. Основным показанием к применению является значительное снижение количества эритроцитов, и возникающее вследствие этого снижение кислородного содержания крови, которое наступает в результате острой или хронической кровопотери, неадекватного эритропоэза, гемолиза, депрессии кроветворения, обусловленные различными гематологическими и онкологическими заболеваниями, цитостатической и лучевой терапией.

Трансфузии эритроцитов показаны при анемических состояниях различного генеза:

- острые постгеморрагические анемии (травмы с кровопотерями, желудочно-кишечные кровотечения, кровопотери при хирургических вмешательствах, во время родов и т.д.);
- тяжелые формы железодефицитных анемий, особенно у пожилых людей, при наличии значительных изменений гемодинамики, а также при подготовке к немедленным хирургическим вмешательствам с предусмотренной значительной кровопотерей или при подготовке к родам;
- анемии, сопровождающие депрессию эритропоэза (острые и хронические лейкозы, апластический синдром, миеломная болезнь и т.п.).

Учитывая, что компенсаторные возможности организма к уменьшению количества эритроцитов и гемоглобина в крови разные (например, пожилые люди труднее переносят анемичный синдром, молодые, особенно женщины - легче), а переливание эритроцитов относится к несложным операциям, в случае назначения трансфузии, следует ориентироваться не только на степень анемизации, то есть на лабораторные показатели красной крови (количество эритроцитов, гемоглобин, гематокрит), но и на проявления циркуляторных нарушений, как на важные критерии, указывающие на необходимость переливания. При острой кровопотере, даже массивной, сам по себе уровень гемоглобина (гематокрита) не является основанием для решения вопроса о назначении трансфузии, так как он в течение суток может оставаться на удовлетворительных цифрах при крайне опасном снижении объема циркулирующей крови. В случае хронических кровопотерь и недостаточного кроветворения в большинстве случаев лишь уменьшение гемоглобина ниже 70,0 г/л, гематокрита ниже 0,25 л/л является основанием для трансфузии эритроцитов.

Эритроциты могут применяться в комплексе с плазмозаменителями и препаратами плазмы. Их сочетание с плазмозаменителями и свежезамороженной плазмой более целесообразно, чем применение цельной крови, поскольку в эритроцитах пониженное содержание цитрата, амиака, внеклеточного калия, а также микроагрегатов из разрушенных клеток и денатурированных белков, клеточных и белковых антигенов и антител, что особенно важно для профилактики синдрома массивных трансфузий.

Эритроциты необходимо хранить при температуре 4°C. Срок годности к использованию зависит от свойств консервирующего раствора для крови или ресусцидирующего раствора для эритроцитов

При наличии выраженного анемического синдрома абсолютных противопоказаний для переливания эритроцитов нет. Относительными противопоказаниями являются: острый и подострый септический эндокардит, прогрессирующее развитие диффузного гломерулонефрита, хроническая почечная недостаточность, хроническая и острая печеночная недостаточность,

декомпенсация кровообращения, пороки сердца в стадии декомпенсации, миокардит и миокардиосклероз с нарушением общего кровообращения II - III степени, гипертоническая болезнь III стадии, выраженный атеросклероз сосудов головного мозга, кровоизлияния в мозг, тяжелые расстройства мозгового кровообращения, нефросклероз, тромбоэмбическая болезнь, отек легких, общий амилоидоз, острый и диссеминированный туберкулез, острый ревматизм и др.

Врач, проводящий трансфузию (переливание) эритроцитсодержащих компонентов крови проводит контрольную проверку группы крови донора и реципиента по системе АВО, а так же пробы на индивидуальную совместимость. При совпадении результатов первичного и подтверждающего определения группы крови по системе АВО, резус-принадлежности, фенотипа донора и реципиента, а также сведений об отсутствии у реципиента антиэритроцитарных антител, врач при контрольной проверке определяет группу крови реципиента и донора по системе АВО и выполняет пробу на индивидуальную совместимость – на плоскости при комнатной температуре. После проведения контрольной проверки группы крови реципиента и донора по системе АВО, а также проб на индивидуальную совместимость, врач, проводящий трансфузию (переливание) донорских эритроцитсодержащих компонентов крови, выполняет биологическую пробу.

Отмытые эритроциты (ОЭ) получают из цельной крови (после отделения плазмы) или замороженных эритроцитов путем их отмывания физиологическим раствором натрия хлорида или специальными отмывающими средами.

В процессе отмывания удаляются белки плазмы, лейкоциты, тромбоциты, микроагрегаты клеток и стромы разрушенных при хранении клеточных компонентов. Отмытые эритроциты являются ареактогенной трансфузационной средой и показаны больным, у которых в анамнезе посттрансфузионные реакции негемолитического типа, а также больным, сенсибилизованным к антигенам белков плазмы, тканевым антигенам и антигенам лейкоцитов и тромбоцитов. В связи с отсутствием в отмытых эритроцитах стабилизаторов крови и продуктов метаболизма клеточных компонентов, оказывающих токсическое действие, их трансфузии показаны в терапии тяжелых анемий у больных с поражениями печени и почек, а также при синдроме массивных трансфузий. Преимуществом применения отмытых эритроцитов является также меньший риск заражения вирусным гепатитом.

Срок хранения отмытых эритроцитов при температуре от 4 до 8 °С в течение 24 часов +/- 1 час с момента изготовления.

6.2 . Переливание концентрата тромбоцитов

Современная заместительная терапия тромбоцитопенического геморрагического синдрома амегакариоцитарной этиологии невозможна без переливания донорских тромбоцитов, полученных, как правило, в терапевтической дозе от одного донора. Минимальная терапевтическая доза, необходимая для прекращения спонтанных тромбоцитопенических геморрагий или для предупреждения их развития при оперативных вмешательствах у больных с глубокой амегакариоцитарной тромбоцитопенией (менее $30 \times 10^9/\text{л}$) составляет от ($2,8$ до $3,0$) $\times 10^{11}$ тромбоцитов.

Показаниями к переливанию концентрата тромбоцитов (КТ) являются проявления тромбоцитопенической кровоточивости, обусловленной:

- недостаточным образованием тромбоцитов;

- амегакариоцитарной тромбоцитопенией (лейкозы, апластическая анемия, депрессии костномозгового кроветворения в результате лучевой или цитостатической терапии, острая лучевая болезнь);
- повышенным использованием тромбоцитов (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания в фазе гипокоагуляции);
- функциональной неполноценностью тромбоцитов (различные тромбоцитопатии - синдром Бернара-Сулье, Вискотт-Олдрича, тромбоцитоастения Гланцмана, анемия Фанкони).

Конкретные показания к переливанию КТ устанавливаются лечащим врачом на основании динамики клинической картины, анализа причин тромбоцитопении и степени ее выраженности.

Переливание КТ не рекомендуются при наличии иммунных (тромбоцитолитических) тромбоцитопений. В том случае, когда наблюдается только тромбоцитопения без анемии и лейкопении, необходимо исследование костного мозга. Нормальное или повышенное количество мегакариоцитов в костном мозге свидетельствует в пользу тромбоцитолитической природы тромбоцитопении. В таком случае необходима терапия стероидными гормонами, но не переливание тромбоцитов.

Важнейшим показателем лечебной эффективности переливания КТ, наряду с клиническими данными, свидетельствующими о прекращении спонтанной кровоточивости или кровотечений, является увеличение количества тромбоцитов в 1 мкл крови через 1 ч и через 18-24 ч после трансфузии.

КТ должен иметь такую же маркировку, как и другие трансфузионные среды (эритроциты, консервированная кровь). Подбор пары «донор – реципиент» осуществляется по системе АВ0 и резус. Непосредственно перед переливанием тромбоцитов врач тщательно проверяет маркировку контейнера, его герметичность, сверяет идентичность групп крови донора и реципиента по системе АВ0 и резус. Биологическую пробу не проводят. При повторных переливаниях КТ у некоторых больных может возникнуть рефрактерность к донорским тромбоцитам, связанная с развитием состояния аллоиммунизации.

Аллоиммунизация возникает вследствие сенсибилизации реципиента аллоантigenами донора и характеризуется появлением антитромбоцитарных и анти-HLA антител. В этих случаях после переливания наблюдаются температурные реакции, отсутствие должного прироста тромбоцитов и гемостатического эффекта. Для того, чтобы снять сенсибилизацию и получить лечебный эффект от трансфузий КТ может быть применен лечебный плазмаферез и подбор пары «донор – реципиент» с учетом антигенов системы HLA .

Срок годности КТ до трансфузии при температуре хранения ($22,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$) - 6-8 часов. В случае постоянного перемешивания автоматическими мешалками (инкубаторами) – 5 суток. Если полимерный контейнер с КТ хранился в холодильнике (при температуре от 4 до 8°C) - 24 часа, может наблюдаться образование агрегатов тромбоцитов, которые исчезают при температуре $22,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа.

6.3. Переливание концентрата лейкоцитов

Внедрение в современную трансфузиологическую практику специальных сепараторов клеток крови дало возможность получать терапевтически эффективное количество лейкоцитов от одного донора для переливания больным с целью возмещения у них дефицита лейкоцитов при миелотоксической депрессии кроветворения.

Показанием к переливанию концентрата лейкоцитов (КЛ) является отсутствие эффекта интенсивной антибактериальной терапии в случае инфекционного осложнения (сепсис, пневмония, некротическая энтеропатия и т.д.) на фоне миелотоксического агранулоцитоза (уровень гранулоцитов менее $0,75 \times 10^9/\text{л}$). Терапевтически эффективной дозой считается переливание от $(10 \text{ до } 15) \times 10^9$ лейкоцитов, которые содержат не менее 50,0 % гранулоцитов, полученных от одного донора с помощью сепараторов клеток крови. Меньшее количество лейкоцитов можно получить с помощью рефрижераторной центрифуги с использованием пластикатных контейнеров.

Подбор пары «донор – реципиент» при переливании КЛ осуществляют по системе АВО и по гистолейкоцитарным антигенам (HLA). Определение совместимости по резус (Rh) целесообразно, но не имеет обязательного характера.

Применение переливания КЛ как с профилактической, так и лечебной целью эффективно при частоте трансфузий не менее трех раз в неделю.

Непосредственно перед переливанием врач, который осуществляет его, сверяет маркировку контейнера с КЛ с паспортными данными реципиента. В таком случае биологическую пробу не проводят.

КЛ хранят при комнатной температуре (22 ± 2) °C или в условиях холодильника при температуре от + 4°C до 8°C в течение 24 ч.

6.4 . Переливание свежезамороженной плазмы (СЗП)

Плазма - жидкая часть крови, в состав которой входит большое количество биологически активных веществ: белки, липиды, углеводы, ферменты, витамины, гормоны и т.д. Наиболее эффективно применение плазмы свежезамороженной (СЗП), потому что в таком случае практически полностью сохраняются ее биологические свойства.

Показанием к переливанию СЗП является необходимость коррекции объема циркулирующей крови при массивных кровотечениях и нормализация гемодинамических показателей. Если потеряно более 25,0% объема крови, переливания СЗП необходимо сочетать с переливанием концентрата эритроцитов (лучше отмытых или размороженных эритроцитов).

Трансфузии СЗП показаны при:

- ожоговой болезни во всех клинических фазах;
- гнойно-септических процессах;
- массивных внешних и внутренних кровотечениях, особенно в акушерской практике;
- коагулопатиях с дефицитом II, V, VII, XII факторов свертывания крови;
- гемофилии А и В, острых кровотечениях и кровоизлияниях различной локализации (доза не менее 300,0 мл 3-4 раза в сутки с интервалом 6-8 ч до полной остановки кровотечения);
- тромботических процессах на фоне гепаринотерапии, синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. В случае нарушений микроциркуляции СЗП переливают с реологически активными препаратами (реополиглюкин и др.).

СЗП переливают внутривенно, в зависимости от состояния больного капельно или струйно, при выраженным ДВС-синдроме - преимущественно струйно.

При переливании СЗП запрещается использовать один полимерный контейнер нескольким больным, нельзя оставлять плазму для последующих переливаний после разгерметизации контейнера.

Переливание СЗП противопоказано больным, сенсибилизованным к парентеральному введению белка. Для предотвращения негативных реакций необходимо проводить биологическую пробу, как и при переливании крови (эритроцитов).

6.5. Переливание нативного свежезамороженного криопреципитата.

Основными медицинскими показаниями для трансфузии (переливания) криопреципитата является гемофилия А, болезнь Виллебранда, гипофibrиногенемия. Криопреципитат, так же используют местно в виде фибринного покрытия (фибриновый тампон, фибринная губка).

Количество криопреципитата, необходимое для повышения уровня фибриногена рассчитывается по следующим правилам:

Масса тела (кг) x 70 мл = объем циркулирующей крови ОЦК (мл).

ОЦК (мл) x (1,0 - гематокрит) = объем циркулирующей плазмы ОЦП (мл).

ОЦП (мл) x (необходимый уровень фактора VIII - имеющийся уровень фактора VIII) = необходимое количество фактора VIII для переливания (в ед.).

Необходимое количество фактора VIII (в ед.):100 ед. = количество доз криопреципитата, необходимого для разовой трансфузии (переливания). Для гемостаза поддерживается уровень фактора VIII до 50% во время операций и до 30% в послеоперационном периоде. Одна единица фактора VIII соответствует 1 мл свежезамороженной плазмы.

Криопреципитат, полученный из одной дозы крови, должен содержать не менее 70 ед. фактора VIII. Криопреципитат донора должен быть той же группы по системе АВО, что и у реципиента.

7. Техника переливания крови и ее компонентов

Показания к назначению переливания любой трансфузионной среды, а также ее дозировка и выбор метода трансфузии определяются лечащим врачом на основании клинических и лабораторных данных. Не может быть стандартного подхода при одной и той же патологии. В каждом конкретном случае решение врача о программе и методе трансфузионной терапии должно быть основано на общих положениях о применении крови и ее компонентов, освещенных в инструкции на клинических и лабораторных особенностях конкретной ситуации.

7.1. Непрямое переливание крови и ее компонентов

Наиболее распространенным методом переливания компонентов крови - эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, свежезамороженной плазмы - является внутривенное введение с помощью системы одноразового пользования с фильтром, к которой непосредственно присоединяют полимерный контейнер с трансфузионной средой.

В лечебной практике при показаниях используются также другие методы введения эритроцитов (крови): внутриартериальный, внутриаортальный, внутривенний. Введение, особенно при использовании центральных вен и их катетеризации, позволяет достичь различных скоростей переливания (капельное, струйное), варьируя объем и скорость переливания в зависимости от динамики клинической картины.

Техника заполнения одноразовой системы для внутривенного введения изложена в инструкции завода-изготовителя.

В терапии ДВС-синдрома принципиальное значение имеет быстрое переливание больших (до 1,0 л) объемов свежезамороженной плазмы под

контролем показателей гемодинамики и центрального венозного давления (ЦВД) в течение не более 30 мин.

7.2 . Заменное переливание крови

Заменное переливание крови - частичное или полное удаление крови из кровеносного русла реципиента с одновременным замещением ее адекватным или превышающим объемом донорской крови. Основная цель этой операции - удаление вместе с кровью различных ядов (при отравлениях, эндогенных интоксикациях), продуктов распада, гемолиза и антител (при гемолитической болезни новорожденных, гемотрансфузационного шока, тяжелых токсикозах беременных, острой почечной недостаточности и т.д.).

Суть этой операции заключается в сочетании заместительного и дезинтоксикационного эффектов.

Этот вид переливания крови с успехом заменен выполнением интенсивного лечебного плазмафереза с изъятием за процедуру до 2 л плазмы и ее возмещением реологическими плазмозаменителями и свежезамороженной плазмой.

7.3. Правила трансфузии (переливания) донорской крови и (или) ее компонентов детям

Стратегия и тактика переливаний компонентов донорской крови в педиатрии принципиально не отличается от таковой у взрослых пациентов, кроме периода новорожденности. Новорожденные отличаются не только от взрослых, но и от детей раннего возраста рядом особенностей, которые необходимо учитывать при переливании.

При поступлении в организацию ребенка, нуждающегося в трансфузии (переливании) донорской крови и (или) ее компонентов, первичное исследование групповой принадлежности крови ребенка проводится медицинским работником клинического отделения согласно требованиям проведения иммуногематологических исследований у пациентов.

В обязательном порядке у ребенка, нуждающегося в трансфузии (переливании) компонентов донорской крови, в клинико-диагностической лаборатории проводятся: подтверждающее определение группы крови по системе АВО и определение резус-принадлежности, а также выявление антиэритроцитарных антител. Фенотипирование по другим антигенам эритроцитов в случае необходимости проводится в специализированной лаборатории.

Указанные исследования проводятся в соответствии со следующими требованиями:

а) определение группы крови по системе АВО проводится двумя сериями моноклональных антител анти-А и анти-В. Определение можно проводить одной серией каждого реагента, если используется и реагент анти-АВ. У детей до 4 месяцев определение группы крови по системе АВО проводят только по антигенам эритроцитов. У детей старше 4 месяцев группа крови определяется, в том числе перекрестным методом, с использованием реагентов анти-А, анти-В, анти-АВ и стандартных эритроцитов О(I), А₁(II) и В(III);

б) определение резус-принадлежности проводится с использованием реагентов, содержащих анти-D-антитела;

в) фенотипирование антигенов эритроцитов проводится с использованием реагентов, содержащих соответствующие антитела;

г) скрининг антиэритроцитарных антител проводится непрямым антиглобулиновым тестом, при котором выявляются клинически значимые

антитела, с использованием панели стандартных эритроцитов, состоящей не менее чем из 3 образцов крови, содержащих в совокупности клинически значимые антигены.

При выявлении у ребенка антиэритроцитарных антител осуществляется индивидуальный подбор доноров эритроцитсодержащих компонентов с проведением непрямого антиглобулинового теста или его модификации с аналогичной чувствительностью в специализированной лаборатории.

Для проведения трансфузии (переливания) эритроцитсодержащих компонентов аллоиммунизированным реципиентам детского возраста применяются следующие правила:

а) при выявлении у реципиента детского возраста экстраагглютининов анти- A_1 ему переливаются эритроцитсодержащие компоненты, не содержащие антигена A_1 свежезамороженную плазму - одногруппную. Реципиенту детского возраста с $A_2(II)$ переливаются отмытые эритроциты $O(I)$ и свежезамороженная плазма $A(II)$, реципиенту детского возраста с $A_2B(IV)$ переливаются отмытые эритроциты $O(I)$ или $B(III)$ и свежезамороженная плазма $AB(IV)$;

б) при наличии у реципиента детского возраста неспецифически реагирующих антиэритроцитарных антител (панагглютининов) ему переливаются эритроцитсодержащие компоненты $O(I)$ резус-отрицательные, не реагирующие в серологических реакциях с сывороткой реципиента;

У новорожденных в день трансфузии (переливания) компонентов донорской крови (не ранее чем за 24 часа до трансфузии (переливания) из вены производится забор крови не более 1,5 мл; у детей грудного возраста и старше из вены производится забор крови 1,5-3,0 мл в пробирку без антикоагулянта для проведения обязательных контрольных исследований и проб на совместимость. Пробирка должна быть маркирована с указанием фамилии и инициалов реципиента детского возраста (в случае новорожденных первых часов жизни указывается фамилия и инициалы матери), номера медицинской документации, отражающей состояние здоровья реципиента детского возраста, наименования отделения ЛПУ, групповой и резус-принадлежности, даты взятия образца крови.

При плановом переливании эритроцитсодержащих компонентов врач, проводящий трансфузию (переливание) донорской крови и (или) ее компонентов, обязан:

а) по данным медицинской документации, отражающей состояние здоровья реципиента детского возраста, и данным на этикетке контейнера, сравнить данные о группе крови по системе АВО и резус-принадлежность донора и реципиента;

б) перепроверить группу крови реципиента детского возраста по системе АВО;

в) определить группу крови донора по системе АВО (резус-принадлежность донора устанавливается по обозначению на контейнере);

г) провести пробу на индивидуальную совместимость крови реципиента детского возраста и донора по системе АВО и системе Резус. Если донорская кровь или эритроцитсодержащий компонент индивидуально подобран в специализированной лаборатории центра крови, проба на индивидуальную совместимость по системе Резус не проводится;

д) провести биологическую пробу.

Биологическая проба при проведении трансфузии (переливании) компонентов донорской крови реципиенту детского возраста проводится в обязательном порядке.

Порядок проведения биологической пробы:

а) биологическая проба состоит в трехкратном введении компонентов донорской крови с последующим наблюдением за состоянием реципиента детского возраста в течение 3-5 минут при пережатой системе для переливания крови;

б) объем вводимых компонентов донорской крови для детей до 1 года составляет 1-2 мл, от 1 года до 10 лет - 3-5 мл, после 10 лет - 5-10 мл;

в) при отсутствии реакций и осложнений трансфузия (переливание) компонентов донорской крови продолжается при постоянном наблюдении врача, проводящего трансфузию (переливание).

Экстренная трансфузия (переливание) компонентов донорской крови реципиенту детского возраста также проводится с применением биологической пробы.

Биологическая проба, как и проба на индивидуальную совместимость, проводится в обязательном порядке и в тех случаях, когда реципиенту детского возраста переливаются индивидуально подобранные в лаборатории фенотипированные эритроцитсодержащие компоненты.

Критерием оценки трансфузии (переливания) донорской крови и эритроцитсодержащих компонентов у детей является комплексная оценка клинического состояния ребенка и данных лабораторного исследования.

Для детей до 1 года в критическом состоянии трансфузия (переливание) эритроцитсодержащих компонентов проводится при уровне гемоглобина менее 85 г/л. Для детей старшего возраста трансфузия (переливание) эритроцитсодержащих компонентов - при уровне гемоглобина менее 70 г/л.

При трансфузии (переливании) эритроцитсодержащих компонентов новорожденным:

а) переливаются эритроцитсодержащие компоненты, обедненные лейкоцитами (эритроциты, взвесь эритроцитов, отмытые эритроциты, размороженные и отмытые эритроциты);

б) трансфузия (переливание) новорожденным проводятся под строжайшим контролем, как объема перелитых эритроцитсодержащих трансфузионных сред, так и объема взятой на анализы крови;

в) объем трансфузии (переливания) определяется из расчета 10-15 мл на 1 кг массы тела;

г) для трансфузии (переливания) используют эритроцитсодержащие компоненты со сроком хранения не более 10 дней с момента заготовки;

д) скорость трансфузии (переливания) эритроцитсодержащих компонентов составляет 5 мл на 1 кг массы тела в час под обязательным контролем показателей гемодинамики, дыхания и функции почек;

е) компоненты донорской крови предварительно согревают до температуры 37⁰C;

ж) при подборе компонентов донорской крови для трансфузии (переливания) учитывается, что мать является нежелательным донором свежезамороженной плазмы для новорожденного, поскольку плазма матери может содержать аллоиммунные антитела против эритроцитов новорожденного, а отец является нежелательным донором эритроцитсодержащих компонентов, поскольку против антигенов отца в крови новорожденного могут быть антитела, проникшие из кровотока матери через плаценту.

Подбор компонентов донорской крови при трансфузии (переливании) детям до четырех месяцев жизни при гемолитической болезни новорожденных по системе АВО или подозрении на гемолитическую болезнь новорожденных осуществляется в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3

Таблица подбора компонентов донорской крови трансфузии (переливания) детям до четырех месяцев жизни при гемолитической болезни новорожденных по системе АВО или подозрении на гемолитическую болезнь новорожденных

№ п/п	Мать	Ребенок	Переливаемая среда	
			эритроцитсодержащие компоненты крови	свежезамороженная плазма
1.	0 (I)	A (II)	0 (I)	A (II), AB (IV)
2.	0 (I)	B (III)	0 (I)	B (III), AB (IV)
3.	A (II)	B (III)	0 (I)	B (III), AB (IV)
4.	B (III)	A (II)	0 (I)	A (II), AB (IV)
5.	A (II)	AB (IV)	A (II), 0 (I)	AB (IV)
6.	B (III)	AB (IV)	B (III), 0 (I)	AB (IV)

Для внутриутробной трансфузии (переливания) используются эритроцитсодержащие компоненты O(I) группы резус-D-отрицательные со сроком хранения не более 5 дней с момента заготовки компонента.

Заменные переливания крови осуществляются для коррекции анемии и гипербилирубинемии при тяжелой форме гемолитической болезни новорожденных или при гипербилирубинемии любой этиологии: ДВС-синдроме, сепсисе и других угрожающих жизни ребенка заболеваниях.

Для заменного переливания крови используются эритроцитсодержащие компоненты со сроком хранения не более 5 дней с момента заготовки компонента.

Донорская кровь и (или) ее компоненты при заменном переливании крови переливаются из расчета 160-170 мл/кг массы тела для доношенного ребенка и 170-180 мл/кг для недоношенного.

Подбор компонентов донорской крови в зависимости от специфиности аллоантител осуществляется следующим образом:

а) при гемолитической болезни новорожденных, вызванной аллоиммунизацией к антигену D системы Резус, используются одногруппные резус-отрицательные эритроцитсодержащие компоненты и одногруппная резус-отрицательная свежезамороженная плазма;

б) при несовместимости по антигенам системы АВО переливаются отмытые эритроциты или взвесь эритроцитов и свежезамороженная плазма в соответствии с таблицей 3, соответствующие резус-принадлежности и фенотипу ребенка;

в) при одновременной несовместимости по антигенам систем АВО и Резус переливают отмытые эритроциты или взвесь эритроцитов O(I) группы резус-отрицательные и свежезамороженную плазму AB(IV) резус-отрицательную;

г) при гемолитической болезни новорожденных, вызванной аллоиммунизацией к другим редким антигенам эритроцитов, осуществляется индивидуальный подбор донорской крови в специализированной лаборатории.

Свежезамороженная плазма переливается реципиенту детского возраста в целях устранения дефицита плазменных факторов свертывания, при коагулопатиях, при острой массивной кровопотере (более 20% объема циркулирующей крови) и при выполнении терапевтического плазмафереза.

7.4 . Аутогемотрансфузия

Аутогемотрансфузия - переливание больному собственной крови. Осуществляется двумя способами: трансфузия собственной крови, заготовленной на консервирующем растворе заранее до операции и реинфузия крови, собранной из серозных полостей, операционных ран при массивных кровотечениях.

Преимущества метода аутогемотрансфузий перед переливанием донорской крови такова: исключается опасность осложнений, связанных с несовместимостью, с переносом инфекционных и вирусных заболеваний (гепатит, СПИД и т.д.), с риском аллоиммунизации, развитием синдрома массивных трансфузий. В этом случае обеспечивается лучшая функциональная активность и приживаемость эритроцитов в сосудистом русле больного.

Применение метода аутогемотрансфузий показано больным с редкой группой крови и невозможностью подбора донора, во время оперативных вмешательств у больных с ожидаемой большой кровопотерей при наличии у них нарушений функций печени и почек, которые существенно увеличивают риск возможных посттрансфузионных осложнений при переливании донорских эритроцитов (крови). В последнее время аутогемотрансфузии стали шире применяться и при сравнительно небольших по объему оперативных вмешательствах с целью снижения тромбогенной опасности вследствие возникновения гемодиллюции.

Не рекомендуется метод аутогемотрансфузии при выраженных воспалительных процессах, сепсисе, тяжелых поражениях печени и почек, а также при панцитопении. Абсолютно противопоказан метод аутогемотрансфузий в педиатрической практике.

7.5. Реинфузия крови

Реинфузия крови является разновидностью аутогемотрансфузии и заключается в переливании больному компонентов крови (эритроцитов после их отмывания), которые вылились в серозные раневые полости (живота, груди), и находящихся в них не более 12 ч. (при более длительном сроке возрастает риск инфицирования и гемолиза).

Применение метода показано при внemаточной беременности, разрывах селезенки, ранениях органов грудной клетки, травматичных операциях. Для его осуществления необходима система, состоящая из стерильной емкости и набора трубок для сбора крови с помощью электроотсоса последующего отмывания эритроцитов и их переливания.

7.6. Плазмаферез лечебный

Лечебный плазмаферез является одной из основных трансфузиологических операций. Он позволяет оказать эффективную лечебную помощь больным, находящимся в критическом состоянии. Одновременно после изъятия плазмы во время лечебного плазмафереза проводят пополнение удаленного объема путем переливания свежезамороженной плазмы, альбумина, реологических плазмозаменителей.

Лечебное действие плазмафереза основывается на механическом выведении с плазмой токсических метаболитов, антител, иммунных комплексов, вазоактивных веществ и т.п., одновременно на пополнении недостаточных жизненно важных компонентов внутренней среды организма, а также активации макрофагальной системы, деблокированию органов «очищения» (печени, селезенки, почек).

Лечебный плазмаферез может быть проведен следующими методами:

- с помощью сепаратора клеток крови непрерывно (поточным) методом;

- с помощью центрифуг (рефрижераторных) и полимерных контейнеров прерывистым методом;
- методом фильтрования.

Объем удаленной плазмы, ритм проведения процедуры, программа плазмозамещения зависят от поставленной цели, состояния пациента, характера заболевания или посттрансфузионного осложнения. Применение плазмафереза показано при синдроме повышенной вязкости, заболеваний иммунокомплексной этиологии, различных интоксикациях, ДВС - синдроме, васкулите, сепсисе, острой и хронической почечной и печеночной недостаточности и др. Метод позволяет существенно улучшить эффект лечения различных заболеваний в терапевтической, хирургической, неврологической и других клиниках. Более детальное описание методов проведения плазмафереза приведено в Инструкции по донорскому и лечебному плазмаферезу.

7.7. Осложнения, которые могут возникать при нарушениях техники переливания крови и ее компонентов

Воздушная эмболия возникает при условии неправильного заполнения системы, вследствие чего пузырьки воздуха попадают в вену больного*. При возникновении воздушной эмболии у больных появляется затрудненное дыхание, одышка, боль и чувство загрудинного сдавления, цианоз лица, тахикардия. Массивная воздушная эмболия с развитием клинической смерти требует проведения немедленных реанимационных мероприятий - непрямой массаж сердца, искусственное дыхание «рот в рот», вызов реанимационной бригады.

* При переливании крови и ее компонентов категорически запрещается использование любой нагнетательной аппаратуры.

Профилактика этого осложнения заключается в точном соблюдении всех технических правил трансфузии, монтажа систем и аппаратуры. Необходимо тщательно заполнять трансфузионной средой все трубки и части аппаратуры, следить за выводом воздушных пузырьков из трубок. Наблюдение за больным во время трансфузии должно быть постоянным до ее окончания.

Тромбоэмболия - эмболия сгустками крови, возникающая при попадании в вену больного различной величины сгустков, образовавшихся в концентрате крови (эритроцитов), а также, что бывает реже, занесенных током крови из тромбированных сосудов.

Микроагрегаты, образующиеся в консервированной крови и ее компонентах, попадая в сосудистое русло больного, задерживаются в легочных капиллярах и, как правило, подвергаются лизису. При попадании большого числа сгустков крови развивается клиническая картина тромбоэмболии ветвей легочной артерии: внезапная боль в грудной клетке, резкое возникновение или рост удушья, появление кашля, иногда, кровохарканье, бледность кожных покровов, цианоз, в ряде случаев развивается коллапс - холодный пот, падение артериального давления, частый пульс.

Профилактика тромбоэмболии легочной артерии заключается в правильной технике заготовки и переливания крови и ее компонентов, при которых исключается возможность попадания сгустков крови в вену больного, использовании при гемотрансфузии фильтров и микрофильтрации особенно при массивных и струйных переливаниях. При тромбозе иглы необходима повторная пункция другой вены, но ни в коем случае не пытаться различными способами восстановить проходимость затромбованной иглы.

8. Реакции и осложнения, возникающие при переливании крови и ее компонентов

Причиной возникновения реакций и осложнений чаще всего является нарушение установленных правил переливания крови и ее компонентов, нечеткого определения показаний или противопоказаний для назначения той или иной трансфузиологической процедуры, неправильной оценки состояния реципиента в процессе трансфузии или после ее проведения. Практически не бывает осложнений при переливании отмытых размороженных эритроцитов. Существенно уменьшается количество осложнений при соблюдении принципа «один донор - один больной».

В зависимости от тяжести клинического течения, температуры тела и сроков появления нарушений различают посттрансфузионные реакции трех степеней: легкие, средние и тяжелые.

Легкие реакции сопровождаются повышением температуры тела в пределах 1⁰С, болью в мышцах конечностей, головной болью, ознобом, недомоганием. Эти явления кратковременны и исчезают без каких-либо специальных лечебных мероприятий.

Реакции средней тяжести проявляются повышением температуры тела на 1,5-2,0⁰С, ознобом, увеличением частоты пульса и дыхания, иногда появляется крапивница.

В случае тяжелых реакций температура тела повышается более чем на 2,0⁰С, наблюдается лихорадка, цианоз губ, рвота, сильная головная боль, крапивница или отек Квинке, лейкоцитоз.

Больные с посттрансфузионными реакциями нуждаются в обязательном врачебном наблюдении и своевременном лечении. В зависимости от причины возникновения и клинического течения различают пирогенные, антигенные (иммунные), аллергические и анафилактические реакции.

8.1. Осложнения, которые могут возникнуть при переливании крови и ее компонентов

Причины:

- иммунологическая несовместимость;
- посттрансфузионные метаболические нарушения;
- массивные гемотрансфузии;
- недоброкачественность перелитой крови или ее компонентов;
- погрешности в методике трансфузии;
- передача инфекционных заболеваний от донора к реципиенту;
- ошибки в определении показаний и противопоказаний к гемотрансфузии.

8.1.1. Осложнения, вызванные переливанием крови (эритроцитов), несовместимых по групповым фактором системы АВ0, так называемые гемолитические реакции

Причина: невыполнение правил, предусмотренных Инструкцией по технике переливания крови и ее компонентов, по методике определения групп крови по системе АВ0 и проведения проб на совместимость.

Патогенез: массивное внутрисосудистое разрушение перелитых эритроцитов природными агглютининами реципиента с выходом в плазму стромы разрушенных эритроцитов и свободного гемоглобина. Эти продукты распада эритроцитов имеют тромбопластиновую активность, приводят к развитию синдрома ДВС с выраженным нарушениями в системе гемостаза и

микроциркуляции с последующим нарушением центральной гемодинамики и развитием гемотрансфузионного шока.

Начальные клинические проявления при гемотрансфузионном шоке типичны. Осложнения могут появиться непосредственно во время гемотрансфузии или вскоре после нее и характеризуются кратковременным возбуждением, болью в груди, животе, пояснице. Далее постепенно нарастают циркуляторные нарушения, характерные для шокового состояния (тахикардия, гипотония), развивается картина массивного внутрисосудистого гемолиза (гемоглобинемия, гемоглобинурия, билирубинемия, желтуха) и острого нарушения функции почек и печени. Если шок развивается во время оперативного вмешательства, то клиническими признаками его могут быть значительная кровоточивость из операционной раны, стойкая гипотония, а при наличии мочевого катетера - появление мочи темно-вишневого или черного цвета.

Тяжесть клинического течения шока в значительной степени зависит от объема перелитой несовместимой крови и ее компонентов, при этом существенную роль играет характер основного заболевания и состояния пациента перед гемотрансфузией.

Лечение: в комплексе лечебных мероприятий одновременно с выводом из шока показано проведение массивного (2,0-2,5 л) плазмафереза с целью удаления свободного гемоглобина, продуктов деградации фибриногена, с замещением удаленных объемов соответствующим количеством свежезамороженной плазмы или вместе с колloidными плазмозаменителями, солевыми растворами. Для уменьшения осаждения продуктов гемолиза в дистальных канальцах нефрона необходимо поддерживать диурез больного не менее 75,0-100,0 мл/ч с помощью 20,0% раствора маннитола (15,0-20,0 г) и фуросемида (100,0 мг однократно, до 1000,0 мг в сутки), коррекцию кислотно-щелочного равновесия крови 4,0% раствором натрия бикарбоната. Для поддержания объема циркулирующей крови и стабилизации артериального давления (АД) применяют реологические растворы (реополиглюкин, альбумин). При необходимости коррекции глубокой (не менее 60,0 г/л) анемии - переливание индивидуально подобранных отмытых эритроцитов, десенсибилизирующую терапию - антигистаминные препараты, кортикостероиды, сердечно-сосудистые препараты. Объем инфузционно-трансфузионной терапии должен быть адекватным диурезу. Контролем является нормальный уровень центрального венозного давления (ЦВД). Вводят кортикостероиды которые корректируют в зависимости от стабильности гемодинамики, но она должна быть не менее как 30,0 мг на 10,0 кг массы тела в сутки.

Следует отметить, что осмотически активные плазмозаменители должны применяться до наступления анурии. При анурии их назначение чревато развитием отека легких или головного мозга.

В течение первых суток развития посттрансфузионного острого внутрисосудистого гемолиза показано назначение гепарина (внутривенно до 20000,0 ЕД в сутки под контролем времени свертывания). Следует обратить внимание, что осмотические активные плазмозаменители необходимо применять до появления анурии. В случае анурии их назначение угрожает развитию отека легких или головного мозга.

В тех случаях, когда комплексная консервативная терапия не предотвращает развитие острой почечной недостаточности и уремии, прогрессирование креатинемии и гиперкалиемии, требуется применение гемодиализа в специализированных учреждениях. Вопрос о транспортировке решает врач этого учреждения.

8.1.2. Осложнения, вызванные переливанием эритроцитов (крови), несовместимых по резус-фактору и по иным системам антигенов эритроцитов

Причины: эти осложнения(изоиммунизация) возникают у больных, сенсибилизованных по резус-фактору.

Изоиммунизация резус-антигеном может произойти при следующих условиях:

1. при повторном введении резус-отрицательным реципиентам резус-положительной крови.

2. Беременность резус-отрицательной женщины резус-положительным плодом, от которого резус-фактор поступает в кровь матери, становится причиной образования в ее крови иммунных антител против резус-фактора. Причинами таких осложнений в подавляющем большинстве случаев является недоучет акушерского и трансфузионного анамнеза, а также невыполнение или нарушение других правил, предупреждающих несовместимость по резус-фактору.

Патогенез: массивный внутрисосудистый гемолиз переливых эритроцитов иммунными антителами (анти-D, анти-C, анти-E и другие), которые образовались в результате сенсибилизации реципиента повторными беременностями или трансфузиями несовместимых по антигенней системе эритроцитов (система Резус, Келл, Кидд, Левис и т.д.).

Клинические проявления этого осложнения отличаются от предыдущих более поздним началом, менее бурным течением, замедленным гемолизом, что зависит от вида иммунных антител и их титра.

Принципы терапии те же что и при лечении посттрансфузионного шока, вызванного переливанием крови (эритроцитов) несовместимой по групповым факторам системы АВ0.

Кроме групповых факторов системы АВ0 и резус-фактора Rh₀(D) причиной осложнений при переливании крови (эритроцитов), изредка, могут быть другие антигены системы резус: rh'(C), rh'(E) и hr"(c), hr"(e), а также антигены Даффи, Келл, Кидд и других систем. Следует отметить, что степень их антигенностии для практики переливания крови (эритроцитов) значительно ниже резус-фактора Rh₀(D), но такие осложнения встречаются. Они возникают как у резус-отрицательных, так и у резус-положительных лиц, иммунизированных в результате беременности или повторных переливаний крови (эритроцитов).

Основными мероприятиями по предупреждению трансфузионных осложнений, связанных с этими антигенами, являются учет акушерского и трансфузионного анамнеза больного. Следует подчеркнуть, что особенно чувствительной пробой на совместимость, позволяющей выявить антитела и, следовательно, несовместимость крови донора и реципиента, является непрямая проба Кумбса. Ее необходимо проводить при подборе донорских эритроцитов (крови) у пациентов, в анамнезе которых были посттрансфузионные реакции, а также сенсибилизованным лицам с повышенной чувствительностью к введению эритроцитов, даже если они совместимы по группе крови АВ0 и резус-фактору. Проба на изоантогенную совместимость крови (эритроцитов), которые переливают, как и проба на совместимость по резус-фактору Rh₀(D) производится раздельно с пробой на совместимость по группе крови АВ0 и ни в коем случае не заменяет ее.

Клинические проявления этих осложнений аналогичны изложенным выше при переливании резус-несовместимой крови (эритроцитов), хотя наблюдаются значительно реже. Принципы терапии те же самые.

8.1.3. Посттрансфузионные реакции и осложнения негемолитического типа

Причины: сенсибилизация реципиента к антигенам лейкоцитов, тромбоцитов при переливании отмытых эритроцитов и белков плазмы в результате ранее проведенных повторных гемотрансфузий и беременностей.

Клинические проявления развиваются обычно через 20-30 мин после окончания гемотрансфузии, иногда раньше или даже во время переливания и характеризуются ознобом, гипертермией, головной болью, болями в пояснице, крапивницей, кожным зудом, одышкой, удушьем, развитием отека Квинке.

Лечение: десенсибилизирующая терапия - 0,5-1,0 мл адреналина внутривенно, антигистаминные препараты, кортикоиды, хлорид или глюконат кальция, при необходимости - сердечно-сосудистые препараты, наркотические анальгетики, дезинтоксикационные и противошоковые растворы.

Профилактика подобных реакций и осложнений заключается в тщательном сборе трансфузионного анамнеза, использовании отмытых эритроцитов, индивидуальном подборе пары «донор–реципиент».

8.1.4. Посттрансфузионные реакции и осложнения, связанные с условиями консервирования и хранения крови, эритроцитной массы

Причина: реакция организма на стабилизирующие растворы, используемые при консервировании крови и ее компонентов, на продукты метаболизма клеток крови, образующиеся в результате ее хранения, на температуру трансфузионной среды, которую переливают.

Гипокальциемия развивается при трансфузии больших доз крови эритроцитов или плазмы, заготовленных с применением цитрата натрия, особенно при значительной скорости переливания. Трансфузия крови и плазмы, заготовленных с использованием цитрата натрия, со скоростью 150,0 мл/мин снижает уровень свободного кальция максимально до 0,6 ммоль/л, а в случае скорости 40,0 мл/мин содержание свободного кальция в плазме реципиента меняется незначительно. Уровень ионизированного кальция возвращается к норме сразу после прекращения переливания, что объясняется быстрой мобилизацией кальция из эндогенных депо и метаболизмом цитрата в печени.

При отсутствии каких-либо клинических проявлений временной гипокальциемии стандартное назначение препаратов кальция (для «нейтрализации» цитрата) неоправданно, поскольку оно может привести к появлению аритмии у больных с патологией сердца. Необходимо помнить о категории больных с начальной гипокальциемией или о возможности ее возникновения при проведении различных лечебных процедур (лечебный плазмаферез с возмещением эксфузируемого объема плазмы), а также во время оперативных вмешательств. Особое внимание надо уделить больным с такой патологией: гипопаратиреоидизм, D-авитаминоз, хроническая почечная недостаточность, цирроз печени и активный гепатит, врожденные гипокальциемии у детей, панкреатит, токсико-инфекционный шок, тромбофлебитические постреанимационные состояния, длительная терапия кортикоидными гормонами и цитостатиками.

Клиника, профилактика и лечение гипокальциемии: снижение уровня свободного кальция в крови приводит к артериальной гипотензии, повышение давления в легочной артерии и центрального венозного давления, увеличение интервала Q-T на ЭКГ, появлению судорожных подергиваний мышц голени, лица, нарушение ритма дыхания с переходом в апноэ при высокой степени

гипокальциемии. Субъективно нарастание гипокальциемии больные воспринимают вначале как неприятные ощущения за грудиной, мешающие ходьбе, во рту появляется неприятный прикус металла, отмечается подергивания мышц языка и губ, в случае дальнейшего роста гипокальциемии - появление тонических судорог, нарушение дыхания вплоть до его остановки, нарушение ритма сердца - брадикардия, вплоть до асистолии.

Профилактика заключается в выявлении больных с потенциальной гипокальциемией (склонность к судорогам), вливания плазмы со скоростью не более 40,0-60,0 мл/мин, Профилактическом введении 10,0% раствора кальция глюконата (10,0 мл на каждые 0,5 л плазмы).

В случае появления клинических симптомов гипокальциемии необходимо прекратить введение плазмы, внутривенно ввести 10,0-20,0 мл кальция глюконата или 10,0 мл хлористого кальция, контроль ЭКГ, срочно определить уровень электролитов крови.

Гиперкалиемия у реципиента может возникнуть при быстром переливании консервированной крови (около 120,0 мл/мин) или концентрата эритроцитов длительного хранения. Основным клиническим проявлением гиперкалиемии является развитие брадикардии.

8.1.5. Синдром массивных трансфузий

Эти осложнения возникают в случае введения за короткий период в кровяное русло реципиента от 1,5 до 3,0 л цельной крови от многих доноров (более 40,0-50,0 % объема циркулирующей крови). Негативное влияние трансфузий крови выражается в развитии синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания. При летальном исходе на вскрытии обнаруживаются мелкие кровоизлияния в органах, связанные с микротромбами, состоящие из агрегатов эритроцитов и тромбоцитов. Нарушение гемодинамики возникают в большом и малом круге кровообращения, а также на уровне капиллярного, органного кровотока.

Синдром массивных трансфузий (за исключением травматических кровопотерь) является результатом переливаний цельной крови при ДВС-синдроме уже в начальной стадии, когда, прежде всего, необходимо переливание больших количеств свежезамороженной плазмы (1-2 л и более) при струйном или частыми каплями ее вливании, но переливание концентрата эритроцитов должно быть ограничено жизненными показаниями.

Для профилактики этого осложнения необходимо избегать переливания крови в больших количествах. Для пополнения кровопотерь использовать заранее заготовленные от одного-двух доноров консервированные эритроциты, свежезамороженную плазму по принципу «один донор - один больной», трансфузионную тактику на строгих показаниях к переливанию донорской крови, широко используя компоненты и препараты крови (эритроциты, свежезамороженная плазма), низкомолекулярные растворы декстрана (реополиглюкин, желатиноль), достигая гемодилюции. Эффективным методом профилактики синдрома массивной трансфузии является применение аутокрови (компонентов) больного, которые заготавливают перед плановой операцией. Необходимо шире внедрять применение аутокрови, которую собирают во время операций из операционных полостей (метод реинфузии).

Лечение ДВС-синдрома, обусловленного массивной гемотрансфузией, базируется на комплексе мероприятий, направленных на нормализацию системы гемостаза и устранение других проявлений синдрома, в первую очередь шока, капиллярного стаза, нарушений кислотно-щелочного, электролитного и водного

баланса, поражения легких, почек, надпочечников, анемии. Рекомендуется применение гепарина (средняя доза 24000,0 ЕД в сутки при непрерывном введении).

Важнейшим методом терапии является плазмаферез (удаление не менее 1,0 л плазмы) с замещением свежезамороженной донорской плазмой в объеме не менее 600,0 мл. Блокаду микроциркуляции агрегатами клеток крови и спазм сосудов устраниют дезагрегантами и другими препаратами (реополиглюкин, курантил 4,0-6,0 мл 0,5% раствора, эуфиллин 10,0 мл 2,4% раствора, трентал 5,0 мл 2,0 % раствора). Используют также ингибиторы протеаз-трасилол, контрикал в больших дозах по 80000,0-100000,0 ЕД на одно внутривенное введение. Необходимость и объем трансфузионной терапии зависят от выраженности гемодинамических нарушений. Следует помнить, что цельную кровь при ДВС-синдроме применять запрещается, а отмытые эритроциты необходимо переливать при снижении уровня гемоглобина до 70,0 г/л.

Министр здравоохранения

В.В. Кучковой

