1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА СЫВОРОТОК

Набор сывороток антилейкоцитарных HLA гистотипирующих (далее – набор сывороток) предназначен для диагностики in vitro HLA антигенов I класса в комплементзависимом микролимфоцитотоксическом тесте. Типирующие сыворотки представлены в замороженном виде в микропробирках. Перед использованием их необходимо раскапать в 60-луночные микрокамеры Terasaki.

HLA антигены – это гликопротеиды, расположенные на мембране клеток. Они подразделяются на два класса. Антигены I класса (HLA – A, B, C) представлены почти на всех ядросодержащих клетках. Лимфоциты периферической крови являются носителями HLA – A, B, C антигенов.

2 ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА СЫВОРОТОК

2.1 Состав набора сывороток

В комплект поставки набора сывороток антилейкоцитарных HLA гистотипирующих входят сыворотки HLA-A, HLA-B и HLA-C, имеющие специфичность согласно номенклатуре HLA антигенов I класса:

– 116 микропробирок по 0,1 мл с сыворотками HLA из которых:
  – сыворотка HLA-A – от 35 до 40 микропробирок;
  – сыворотка HLA-B – от 61 до 67 микропробирок;
  – сыворотка HLA-C – от 14 до 17 микропробирок;
– 2 микропробирки по 0,1 мл с положительным контролем;
– 2 микропробирки по 0,1 мл с отрицательным контролем;
– 200 микрокамер Terasaki;
– инструкция по применению.

Набор сывороток формируется в зависимости от наличия сывороток с определенной специфичностью согласно номенклатуре HLA антигенов I класса.

2.2 Описание набора сывороток

В каждой микропробирке находится по 0,1 мл человеческой поликлональной анти-HLA-сыворотки известной специфичности для определения антигенов I класса. Кроме того, прилагаются две микропробирки по 0,1 мл – одна с отрицательным и одна с положительным контролями. Порядок расположения гистотипирующих сывороток при раскапывании отмечен в прилагающемся бланке. Сыворотки для лучшего визуального контроля и контроля pH подкрашиваются феноловым красным и консервируются азидом натрия (0,05 %).

Негативный контроль: представляет собой инактивированную сыворотку, полученную из пула (5-7) доноров-мужчин с AB (IV) группой крови. Негативный контроль является проверкой жизнеспособности лимфоцитов. Негативный контроль должен быть отрицательный. Все реакции на панели оцениваются в сравнении с негативным контролем. Если он слабо положительный, то это должно приниматься во внимание.

Позитивный контроль: представляет собой лимфоглобулин, цитотоксически реагирующий со всеми человеческими лимфоцитами. Позитивный контроль является контролем на активность комплемента и должен вызывать 100 % лизис лимфоцитов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.3 Принцип микролимфоцитотоксического теста

Принцип метода основан на инкубации лимфоцитотоксических антител с клетками-мишенями, корреспондирующими соответствующий антиген в присутствии комплемента, при этом антитела фиксируются соответствующим антигеном, экспрессированном на поверхности лимфоцитов, что приводит к активации комплемента и в результате к цитотоксическому повреждению мембраны (лизису) лимфоцитов, что регистрируется после обработки красителем. Например, акридиновым оранжевым (АО) и этидиумом бромида (ЭБ). Соотношение лизированных и живых лимфоцитов учитывается на инвертированном люминисцентном микроскопе.

3 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

3.1 Персонал, использующий набор сывороток, должен быть обеспечен в установленном порядке средствами индивидуальной защиты и спецодеждой, должен соблюдать правила личной гигиены и асептики в соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь.

3.2 Меры предосторожности при работе с сыворотками HLA требуют соблюдения правил работы с условно-патогенным биологическим материалом, в соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь.

3.3 Утилизация брака и отходов от набора сывороток после его использования должна проводиться в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. № 14.

4 РАСКАПЫВАНИЕ HLA СЫВОРОТОК В МИКРОКАМЕРЫ ДЛЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

4.1 Оборудование, материалы и реактивы:

– полуавтоматический масляный диспенсер;
– микрошприц Hamilton Nr 1705 RN (на 50 мкл);
– диспенсер Terasaki Hamilton Nr 1705 RN;
– морозильник (температура не выше минус 20 °С);
– маркер;
– вазелиновое масло;
– 1 % раствор фенолового красного.

4.2 Проведение процедуры

4.2.1 60-луночные микрокамеры Terasaki промаркировать под № 1 и № 2 (по 100 штук) и заполнить лунки вазелиновым маслом с помощью полуавтоматического масляного диспенсера.

4.2.2 HLA сыворотки для лучшего визуального контроля и контроля pH подкрасить феноловым красным с помощью микрошприца Hamilton Nr 1705 RN из расчета 2 мкл фенолового красного на 100 мкл сыворотки и тщательно перемешать.

4.2.3 Микропробирки с подкрашенными сыворотками поместить в маркированный штатив соответственно порядку расположения сывороток в прилагающемся бланке (10 рядов по 6 микропробирок в каждом ряду).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.2.4 60 сывороток раскапать в ранее подготовленные микрокамеры, промаркированные № 1 под вазелиновое масло по 1 мкл в каждую лунку, используя для этого 6-канальный диспенсер Terasaki Hamilton Nr 1705 RN (6 шприцев на 50 мкл) с 1-го по 10-й ряды.

4.2.5 Еще 60 сывороток аналогичным образом раскапать в микрокамеры промаркированные № 2.

4.2.6 Приготовленные микрокамеры с раскапанными HLA сыворотками хранить в морозильнике при температуре не выше минус 20 °С.

5 ПОДГОТОВКА ПРОБЫ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ

5.1 Оборудование, материалы и реактивы:

– раствор PBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+});

– лимфофлот (плотностный градиент для изоляции лимфоцитов, плотность 1,076 – 1,078 г/мл);

– акридиновый оранжевый/этидиум бромид: основной раствор – 25 мг АО растворить в 1 мл этанола и 50 мг ЭБ в 49 мл PBS, добавить АО. Инкубировать в водяной бане 30 мин при температуре 55 °С. При необходимости профильтровать. Хранить при температуре 4 °С или минус 20 °С;

– лимфостабилизирующий раствор;

– 5 % раствор ЭДТА: 5 г ЭДТА растворить в 90 мл PBS, довести до конечного объема 100 мл (PBS). Довести pH раствора с помощью NaOH до 7,2;

– 1 % рабочий раствор туши (стоп-раствор): к 98 мл 5% раствора ЭДТА на PBS добавить 1 мл 5 % азида натрия и 1 мл туши N. 28770 Aerocolor Schwarz Schmincke (производство Германия);

– 5 % раствор азида натрия: 5 г азида натрия растворить в 100 мл PBS. Токсично!;

– микрошприц Hamilton Nr 1705 RN (шприц на 50 мкл);

– дозатор Hamilton Nr PB 600-1;

– диспенсер Terasaki Hamilton Nr 1725 RN (6 шприцев на 250 мкл);

– инвертированный люминисцентный микроскоп.

5.2 Проведение процедуры

5.2.1 К 5 мл свежегепаринизированной крови (10-15 единиц гепарина на 1 мл крови) добавить 50 мг карбонильного железа, перемешать и инкубировать 15 мин при комнатной температуре.

5.2.2 Развести образец крови равным объемом PBS.

5.2.3 В пробирку поместить 4-5 мл лимфофлота и наслоить на него 10-12 мл разведенной крови таким образом, чтобы кровь и лимфофлот не перемешались.

5.2.4 Центрифугировать 15 мин при 1000 g. Лимфоциты находятся в виде беловатого кольца на границе между лимфофлотом и плазмой. Клеточное кольцо осторожно пипеткой перенести в центрифужную пробирку, добавить PBS и перемешать.

5.2.5 Центрифугировать 10 мин при 250 g, надосадок удалить, седимент ресуспендировать в PBS.

5.2.6 Повторно центрифугировать 8-10 мин при 150 g, надосадок удалить.

5.2.7 Для HLA-ABC типирования довести концентрацию лимфоцитов в лимфостабилизирующем растворе до 2000-3000 в 1 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6 МИКРОЛИМФОЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ТЕСТ

6.1 Приготовленные микрокамеры разморозить при комнатной температуре непосредственно перед использованием. При этой температуре они не должны стоять более 1 часа. Не замораживать повторно!

6.2 1 мкл приготовленной взвеси лимфоцитов внести в каждую лунку микрокамер № 1 и № 2 под масло (реакция антиген-антитело).

6.3 Инкубировать 45 мин при комнатной температуре (20 °С – 22 °С).

6.4 Смешать 1 мл кроличьего комплемента с 50 мкл основного раствора АО/ЭБ. Добавить по 5 мкл комплемента с АО/ЭБ в каждую лунку (лизис лимфоцитов). Комплемент повторно не замораживать! Остатки удалить!

6.5 Инкубировать 60 мин при комнатной температуре (20 °С – 22 °С) в темноте.

6.6 Остановить реакцию добавлением 5 мкл 1 % раствора туши в каждую лунку.

6.7 Результаты можно учитывать сразу. При хранении микрокамер при температуре 4 °С результаты должны быть учтены в течение 24 часов. Учет результатов производится в соответствии с прилагаемым бланком: от 1А к 1F, от 2F к 2А, от 3А к 3F и т.д.

7 ОЦЕНКА РЕАКЦИЙ

Учет производится на инвертированном люминисцентном микроскопе при длине волны 450-490 нм. При специфической реакции ЭБ проникает в клетку и вызывает красную флуоресценцию (положительная реакция). В случае отсутствия специфической реакции АО проходит сквозь интактную мембрану и «живые» лимфоциты приобретают зеленую флуоресценцию (отрицательная реакция). Отношение лизированных лимфоцитов к общему числу лимфоцитов обозначается в плюсах (+).

Лизированные клетки, %	Значение	Реакция
0 – 10	–	Отрицательная
11 – 20	1+ (+)	Сомнительно отрицательная
21 – 50	2+ (++)	Слабо положительная
51 – 80	3+ (+++)	Положительная
81 – 100	4+ (++++)	Сильно положительная

Результаты заносятся в бланк (типирования), который прилагается к каждой исследуемой пробе.

8 ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

8.1 Причины ложно-отрицательных или слабых реакций:

– высокая контаминация тромбоцитами ведет к снижению содержания антител и комплемента, т.к. они конкурируют за антитела;

– концентрация лимфоцитов слишком велика, что нарушает оптимальное соотношение антиген-антитело;

– приготовленные микрокамеры с HLA сыворотками были размерожены и снова заморожены;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– кроличий комплемент слишком долго хранился при комнатной температуре до использования;

– остатки разведенного комплемента были повторно заморожены и вновь использованы;

– время инкубации укорочено;

– температура инкубации слишком низкая.

8.2 Причины ложно-положительных реакций:

– ввиду схожести (подобия) молекулярных структур HLA антигены могут реагировать с антисывороткой другой специфичности (перекрестная реактивность);

– температура инкубации слишком высока;

– время инкубации удлинено;

– поврежденные лимфоциты (сниженная жизнеспособность лимфоцитов) – в этом случае негативный контроль положительный;

– реакция не была остановлена стоп-раствором.

9 СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора сывороток – 1 год от даты его изготовления.

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

10.1 Набор сывороток транспортируют всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в термоизолирующем контейнере из пенопласта с «сухим льдом», исключающим размораживание набора сывороток, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта.

10.2 Набор сывороток должен быть использован до даты, указанной на этикетке. Набор сывороток должен храниться при температуре не выше минус 20 °С в течение всего срока годности.

10.3 Упаковка, доставленная в «сухом льду», должна быть непосредственно переведена на хранение при минус 20° С. Открытая упаковка не должна храниться совместно с «сухим льдом».

10.4 Размороженные HLA сыворотки должны быть использованы для постановки теста в течение 1 часа и не могут быть повторно заморожены.

11 ЮРИДИЧЕСКИЙ АДРЕС ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий)

220053, Республика Беларусь, г. Минск, Долгиновский тракт, 160

УНП 190572781, ОКПО 37652513

Тел.: (8-017) 289-01-06

Факс: (8-017) 289-87-45

E-mail: rnpc@blood.by; http://blood.by/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru