

2.6.20. ГЕМАГЛЮТИНІНИ АНТИ-А ТА АНТИ-В

МЕТОД А: НЕПРЯМИЙ МЕТОД

Готують у двох повторностях серію розведень випробовуваного препарату в 9 г/л розчині *натрію хлориду Р*. До кожного розведення 1 серії додають однаковий об'єм 5% (об/об) суспензії еритроцитів фракції А1, яку попередньо тричі промивають розчином натрію хлориду. До кожного розведення іншої серії додають однаковий об'єм 5% (об/об) суспензії еритроцитів фракції В, які попередньо тричі промиті розчином натрію хлориду. Інкують суспензії за температури 37 °С протягом 30 хв, потім клітини тричі промивають розчином натрію хлориду. Залишають клітини в контакт з полівалентним реагентом антиглобуліну людини на 30 хв. Кожну суспензію (без центрифугування) перевіряють на наявність аглютинації під мікроскопом.

МЕТОД В: ПРЯМИЙ МЕТОД

МАТЕРІАЛИ

Фосфатно-сольовий буфер (PBS). 8.0 г *натрію хлориду Р*, 0.76 г *динатрій фосфату безводного Р*, 0.2 г *калію хлориду Р*, 0.2 г *калію дигідрофосфату Р* розчиняють у воді *Р* і доводять об'єм отриманого розчину тим самим розчинником до 1000 мл. Якщо розчин зберігають декілька днів, додають 0.2 г *азиду натрію Р* для запобігання мікробному забрудненню.

Розчин PBS-BSA. PBS, що містить 2 г/л *альбуміну бика Р* (фракція V за Коном, для ELISA). Зберігають розчин за температури 2-8 °С, але перед використанням доводять до температури 19-25 °С.

Розчин папаїну. Використовують папаїн марки «серологічний», отриманий із комерційного джерела, з валідованою активністю.

Еритроцити. Використовують пули D-негативних А1 (A1gr^N), D-негативних В (Bgr) і D-негативних О (Ogr) еритроцитів від щонайменше 3 донорів. Коли застосовується граничний тест на імуноглобулін для анти-А- й анти-В-антитіл, мають бути використані еритроцити від 3 донорів. А2-еритроцити не рекомендують використовувати, оскільки вони дають слабку реакцію.

Промивають клітини 4 рази PBS, доки надосадова рідина не стане прозорою. Для кожного відмивання суспензії клітин використовують мінімум 2 об'єми PBS. Центрифугують еритроцити за 1800 g протягом 5 хв для осадження клітин і відділення надосадової рідини. Обробляють осаджені еритроцити розчином

папаїну відповідно до інструкцій фірми-виробника та промивають клітини 4 рази PBS.

Еритроцити можна зберігати не більше 1 тижня в консервувальному розчині за температури 2-8 °С. Розчин такого складу є відповідним:

тринатрію цитрат	8 г/л
D-глюкоза	20 г/л
кислота лимонна	0.5 г/л
натрію хлорид	4.2 г/л
інозин	0.938 г/л
аденозинтрифосфат (АТР)	0.4 г/л
хлорамфенікол	0.34 г/л
неоміцину сульфат	0.1 г/л

Якщо використовують клітини, що зберігались, перед використанням їх промивають PBS принаймні двічі, доки надосадова рідина не стане прозорою.

Планшети для мікротитрування. Використовують планшети для мікротитрування з V-подібними лунками.

Стандартні препарати. БСП імуноглобуліну (*позитивний контроль випробування на анти-А-, анти-В-антитіла*) і БСП імуноглобуліну (*негативний контроль випробування на анти-А-, анти-В-антитіла*) придатні для використання як позитивний і негативний контроль відповідно, і вони мають використовуватись виконавцями як орієнтир під час розробки й виконання прямого методу для визначення гемаглютининів анти-А й анти-В.

БСП імуноглобуліну для випробування на граничний вміст анти-А- й анти-В-антитіл визначає рекомендовані максимальні межі вмісту, допустимі для серій імуноглобуліну людини, та має використовуватись тільки для порівняння із серіями імуноглобуліну людини, які мають більш високі титри, ніж позитивний контроль.

МЕТОД

Випробування, наведене в цьому розділі, виконане за кімнатної температури за умови використання розчинів позитивного та негативного контролів і випробовуваних розчинів у той самий час і за ідентичних умов. За потреби подальше випробування виконують із використанням *БСП імуноглобуліну для випробування на граничний вміст анти-А- й анти-В-антитіл*.

Стандартні розчини. Відновлюють позитивний і негативний контроль відповідно до інструкції. Концентрація імуноглобуліну G (*IgG*) у кожному з відновлених препаратів становить 50 г/л. Проводять 2-кратне розведення кожного з відновлених препаратів із використанням розчину PBS-BSA, так щоб отримати розчини, що містять 25 г/л *IgG*. Готують 7 подальших послідовних 2-кратних розведень кожного препарату, використовуючи розчин PBS-BSA, щоб розширити діапазон розведень до 1/256 (0.195 г/л *IgG*). Додають 20 мкл кожного розведення кожного препарату в трьох повторностях у лунки планшета для мікротитрування.

Випробовувані розчини. Розводять випробовувані препарати розчином PBS-BSA для отримання початкової концентрації 25 г/л *IgG*. Для препаратів, що містять 50 г/л, це 2-кратне розведення; підбирають відповідний коефіцієнт розведення для препаратів із концентрацією *IgG*, відмінною від 50 г/л, так щоб для випробування отримати початкову концентрацію 25 г/л. Цей 25 г/л розчин встановлюють номінальним 2-кратним коефіцієнтом розведення для порівняння зі стандартним розчином, навіть якщо це не відображає того, що істинне розведення досягло 25 г/л. Готують 7 подальших послідовних 2-кратних розведень препарату, використовуючи розчин PBS-BSA, щоб розширити номінальний діапазон розведень до 1/256 (0.195 г/л *IgG*) для порівняння зі стандартними препаратами у тому самому діапазоні концентрації *IgG*. Додають 20 мкл кожного розведення в трьох повторностях у лунки планшета для мікротитрування.

Для препаратів, у яких концентрація *IgG* нижче 25 г/л, розводять до вихідної концентрації, яка відповідає найближчій більш низькій концентрації стандартних розчинів. Цьому розчину присвоюється той самий номінальний коефіцієнт розведення, що і відповідному стандартному розчину, який має однакову з ним концентрацію *IgG*. Далі продовжують підготовку відповідного двократного серійного розведення, як наведено вище.

Готують у розчині PBS-BSA 3% (об/об) суспензію оброблених папаїном D-негативних A1-, B- й 0-еритроцитів. Додають 20 мкл D-негативних A1-, B- й 0-еритроцитів у 1-у, 2-у й 3-ю серії розведень відповідно кожного випробовуваного препарату, позитивний і негативний контроль. Перемішують, струшуючи планшети на шейкері протягом 10 с (чи доки клітини ресуспендуються).

Центрифугують планшети за 80 g і кімнатної температури протягом 1 хв для осадження клітин. Планшети мають бути розташовані під кутом приблизно 70°.

Облік результатів на планшетах проводять через 4-5 хв або коли негативний контроль (D-негативні 0-еритроцити та негативний контрольний розчин)

перетікає в лунці. Наявність згустку крові у вигляді крапки на дні лунки свідчить про позитивний результат. Перетікання клітин у лунці свідчить про негативний результат.

Реєструють кінцевий титр як зворотну величину найбільшого розведення, що приводить до позитивного результату.

Позитивний контроль із номінальним титром 32 анти-A й анти-B-титрів (межа 32-64 для анти-A; межа 16-32 для анти-B) і негативні контролю (D-негативні 0-еритроцити та негативний контрольний розчин) не мають аглютинувати в початковому розведенні 1:2. Виконавці мають валідувати свої власні умови випробування й вивчити умови випробування та реактиви, у разі якщо результати істотно відрізняються від очікуваних. Неможливість отримати негативну реакцію з негативними контролями, можливо, свідчить про те, що пройшло недостатньо часу для перетікання клітин або, що реактиви були використані безпосередньо з холодильника.

Якщо ▽ номінальний титр анти-A або анти-B випробовуваного препарату вище титру позитивного контролю ▲ випробовуваний препарат порівнюють із БСП імуноглобуліну для випробування на граничний вміст анти-A- й анти-B-антитіл.

Максимально допустимий титр — 64.