

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
РГП на ПХВ «НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ»

Турғанбекова А.А., Рамильева И.Р., Имашпаев Д.М.,
Баймукашева Д.К.

**СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА
ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ**

Методические рекомендации

Астана
2017

УДК 616.4
ББК 54.10
С 33

Турганбекова А.А., Рамильева И.Р., Имашпаев Д.М., Баймукашева Д.К. Серологические методы исследования крови для определения антигенов главного комплекса гистосовместимости. Методические рекомендации/ ННЦТ., - Астана 2017, 31с.

ISBN 978-601-305-137-6

Авторы:

- Турганбекова А.А. - заведующая отделением иммунологического типирования тканей РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Рамильева И.Р. - врач отделения иммунологического типирования тканей РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Имашпаев Д.М. - руководитель отдела регистра доноров костного мозга РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Баймукашева Д.К. - врач отделения иммунологического типирования тканей РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»

Рецензенты:

1. Кемайкин В.М. - к.м.н, руководитель Департамента онкогематологии и трансплантологии костного мозга «Национальный научный центр онкологии и трансплантологии»
2. Байдусенова А.У. - к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. Ш.И. Сарбасовой, Медицинский университет Астана

Настоящие методические рекомендации описывают требования к проведению иммуногенетических исследований крови реципиентов и их доноров для определения антигенов главного комплекса гистосовместимости и определения антилейкоцитарных антител.

Утверждено и разрешено к изданию типографическим способом РГП «Республиканский центр развития здравоохранения» (протокол заседания Экспертной группы РЦРЗ №54 от 22 декабря 2017 года).

©Турганбекова А.А., Рамильева И.Р., Имашпаев Д.М., и др. 2017

Содержание

Перечень сокращений	4
Введение	5
1. Выделение лимфоцитов из образцов крови на градиенте плотности	6
1.1 Постановка ЛЦТТ	8
1.2 Возможные ошибки и способы их устранения	10
1.3 Правила забора крови для ЛЦТТ	11
2. Цели постановки ЛЦТТ	12
2.1 Исследование антигенов I класса системы HLA локусов A, B, Cw	13
2.2 Определение HLA-антител у реципиента	13
2.2.1 Определение наличия антител методом серологического типирования	14
2.2.2 Определение лимфоцитотоксических антител (IgM)	15
2.3 Постановка перекрестной пробы на совместимость «кросс-матч»	16
3. Требования Европейской Федерации иммуногенетиков к постановке ЛЦТТ	18
Заключение	20
Список использованных источников	21
Список рекомендуемой литературы	23
Приложение 1 – Протокол определения антител	25
Приложение 2 – Протокол постановки пробы на совместимость «кросс-матч»	26
Приложение 3 - Направление образцов крови больных, нуждающихся в трансплантации органа	27
Приложение 4 - Направление на типирование по HLA-системе	28
Приложение 5 - Направление на определение лейкоцитарных антител	29
Приложение 6 - Направление на индивидуальную пробу на совместимость «Кросс-матч»	30
Приложение 7 - Направление на индивидуальную пробу на совместимость «Кросс-матч»	31

Перечень сокращений

- НПЦТ** - Научно-производственный центр трансфузиологии
- ЛНГТР** - лихорадочная негемолитическая трансфузионная реакция
- СПОПЛ** – связанное с преливанием острое поражение легких
- БТПХ** - болезнь «трансплантат против хозяина»
- ЛЦТТ** - лимфоцитотоксический тест
- ФСБ** - фосфатно-солевой буфер
- HLA** - Human Leucocyte Antigens- человеческие лейкоцитарные антигены
- PRA** - Panel reactive antibody- панель реактивные антитела
- MHC** - Major histocompatibility complex- главный комплекс гистосовместимости
- EFI** - European Federation for Immunogenetics

Введение

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, одним из критериев определения эффективности здравоохранения страны является уровень развития в ней трансплантологии.

Успех проведенной трансплантации, как и органов, так и гемопоэтических стволовых клеток зависит от правильного подобранного донорского органа или стволовых клеток по HLA - системе [1-2].

Основные направления учения об HLA связаны с именами, которые принадлежат ведущим исследователям в данной области: Жан Доссе (J.Dauseet, Франция), Нобелевский лауреат 1980 год за открытие в области тканевой совместимости; Джон Ван-Руд (J.VanRood, Голландия) создатель учения о многолокусной модели HLA-комплекса (1961-1963), первооткрыватель HLA-антигенов 2-го класса (1975-1976) на В-лимфоцитах; Поль Терасаки (P.Terasaki, США) - создатель основного метода (1967-1970) лимфоцитотоксического теста; Юлия и Вальтер Бодмеры (J.Bodmer, W.Bodmer, Великобритания) – разработчики генетической статистики HLA-комплекса [1-3].

Сейчас в Казахстане стало возможным проведение сложнейших операций по пересадке жизненно важных органов. И ключевое значение в успешном осуществлении трансплантации имеет лабораторное исследование донора и пациента - HLA - типирование пересаживаемых органов и тканей. Эти исследования на протяжении пяти лет в Казахстане осуществляет первая и уникальная на сегодня лаборатория иммунологического типирования тканей – HLA - лаборатория службы крови, созданная в 2011 году на базе Научно-производственного центра трансфузиологии (далее - НПЦТ).

В своей деятельности HLA - лаборатория основывается на применении стандартов Европейской федерации иммуногенетики (EFI), ведущей международной организации по вопросам аккредитации в области трансплантологии, генной инженерии и иммунологического типирования.

В 2013 году HLA - лаборатория успешно прошла внешний контроль качества по HLA – типированию в Польской научной академии иммунологии и экспериментальной терапии, в 2014 году – в Медицинском университете Вены (Австрия).

Успешность проводимых исследований нашла свое подтверждение в немаловажном событии - открытии нового гена казахской популяции, который зарегистрирован в июне 2013 года и в октябре 2016 года в Международной базе данных Nomenclatur of HLA Alles.

В дальнейшем, с развитием деятельности HLA - лаборатории и трансплантологических центров, пациенты получают шанс на продолжение жизни.

1. Выделение лимфоцитов из образцов крови на градиенте плотности

Основным методом иммуногенетического исследования подбора совместимого донора органов является «Лимфоцитотоксический тест» (далее - ЛЦТТ). Все его варианты основаны на использовании микротехники, предложенной американским исследователем П.Терасаки, который ввел в практику специальное микрооборудование для реализации данной реакции. Для постановки ЛЦТТ применяется Т- и В-лимфоциты периферической крови. Основным базовым методом является выделение Т- и В-лимфоцитов на градиенте плотности [1,4,5,6].

Принцип метода

Принцип разделения клеток в градиенте плотности основан на различиях в величине их плавучей плотности. При центрифугировании в градиентном растворе клетки крови перемещаются в пробирке до тех пор, пока не достигнут области градиента, где их плавучая плотность равна плотности среды. Плавучая плотность лимфоцитов меньше, чем используемого градиента (1,077 г/см³), поэтому данные клетки располагаются над градиентом. Гранулоциты и эритроциты, имеющие плавучую плотность, в процессе седиментации проходят через градиентный раствор и опускаются на дно пробирки [5,9,3,13].

Материальное обеспечение:

1) Материалы

- Образцы крови донора или больного
- Перчатки одноразовые нитриловые неопудренные
- Штативы для химических пробирок
- Маркер
- Центрифужные пробирки объемом 10 мл
- Вакутейнеры с антикоагулянтом на 9 мл крови

2) Оборудование

- Холодильник (+4...+6° С)
- Микроскоп световой
- Центрифуга для центрифужных пробирок на 10-15мл, ускорение до 5000g.

3) Инструменты

- Камера Горяева
- Таймер
- Шприц erpendorf объемом на 5мл
- Пастеровские пипетки на 5 мл

4) Реактивы

- Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (не содержащий Са и Mg)
- Градиент плотности (фиколл-верографин или лимфолит), плотность 1,077.

Ход определения:

На один образец крови берётся 3 центрифужных пробирок на 10 мл. В первую центрифужную пробирку разводится цельная стабилизированная кровь (с цитратом или гепарином) с равным объемом ФСБ в соотношении 1:1. Во вторую сухую чистую центрифужную пробирку наливается 3 мл градиента плотности и на него очень осторожно по стенке пробирки наслаивается шприцом erpendorf или пастеровской пипеткой 3 мл разведенной крови. Наслоенную кровь центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования пастеровской пипеткой снимается слой лимфоцитов, находящийся на границе с плазмой и градиентом плотности и переносится в третью центрифужную пробирку. Выделенные лимфоциты отмывают трижды от других форменных элементов крови с ФСБ. Для этого необходимо налить ФСБ до метки 10 мл центрифужной пробирки. Хорошо перемешивают клетки с ФСБ пипеткой Пастера и центрифугируют в первый раз при 1500 об/мин (500 G) в течение 10 минут. После центрифугирования снимается надосадочный слой и повторно наливается следующая порция свежего ФСБ на лимфоцитарный осадок и во второй раз центрифугируется при 1300 об/мин в течение 10 минут. В третий раз проводится отмывка выделенных лимфоцитов центрифугированием при 1100 об/мин в течение 10 минут. Полученные после центрифугирования лимфоциты разбавляются добавлением в него 0,5 мл ФСБ. Полученную взвесь клеток заполняют в камеру Горяева и оставляют на 2-3 минуты для оседания клеток. После проводят подсчет общего количества клеток в объеме 1мм³. Подсчет производят на % жизнеспособных клеток в суспензии по нижеуказанной формуле:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = \frac{\text{число погибших клеток} \times 100\%}{\text{общее число клеток}}$$

Жизнеспособность взвеси лимфоцитов должна быть не ниже 90% и свободна от эритроцитов и гранулоцитов [6,14].

Примечание

Образцы клеток используются в течение 24 часов после отбора крови. Хранить образцы крови не в холодильнике, а при комнатной температуре. Изолированные лимфоциты в лимфостабилизирующем

растворе могут храниться максимально 24 часов, напр. RPMI 1640/ или в TERASAKI Park MEDIUM 3-4 дня в холодильнике /при 2-8 °C/.

1.1 Постановка лимфоцитотоксического теста

Принцип метода:

Жизнеспособные лейкоциты при инкубации с цитотоксическими антителами в присутствии комплемента подвергаются лизису, если они содержат соответствующий антиген. Реакцию оценивают по исключению красителя. Живые клетки в отличие от погибших не окрашиваются. Результат реакции оценивают в баллах, по 8-ми балльной шкале, соответственно количеству погибших клеток [5,6].

Материальное обеспечение:

1) Материалы

- Лимфоциты исследуемого
- Гистотипирующие панели
- Шприцы Тerasaki одноканальные с шагом дозирования 1 мкл и шестиканальные с шагом дозирования на 5 мкл
- Перчатки одноразовые
- Штатив для химических пробирок

2) Оборудование

- Морозильник (-18...-22°C)
- Холодильник (+4...+6°C)
- Центрифуга
- Микроскоп инвертированный люминесцентный

3) Инструменты

- Таймер

4) Реактивы

- Гистотипирующая панель с анти-HLA сыворотками
- Комплемент кроличий лимфолизированный
- Флюоресцентный краситель или эозин К 5% на дистиллированной воде
- Формальдегид раствор 40%, pH 7,2 (профильтрованная)

Ход определения

1-этап Перед началом работы необходимо разморозить гистотипирующую панель при комнатной температуре (18°C-22°C) в течение 30 минут. Выделенную лимфоцитарную взвесь исследуемого вносят по 1 мкл в каждую лунку типизирующей панели при помощи одноканального микрошприца Тerasaki, строго контролируя наличие

попадания капли лейкоцитов под масло. Инкубируют планшет при температуре 18°C-22°C в течение 45 минут или согласно инструкции используемой фирмы реагентов. После необходимо приготовить кроличий леофилизированный комплемент добавляя к сухому комплементу 1000 мл дистиллированной воды. Свежеприготовленный кроличий комплемент добавляют в каждую лунку планшета при помощи шестиканального микрошприца Тerasaki по 5 мкл. Проводится инкубация исследуемых клеток с специфическими сыворотками при температуре 18°C-22°C в течение 60 минут. Для дифференциации живых и погибших лимфоцитов после инкубации в каждую лунку панели добавляют при помощи шестиканального микрошприца Тerasaki по 5 мкл 5% эозина К и оставляют на 3-5 мин для окрашивания. Перед интерпретацией планшет переворачивают и встряхивают резким движением от эозина и комплемента.

2-этап Производится учет реакции с помощью инвертированного микроскопа не менее чем через 30 минут после фиксации результатов (после оседания клеток в лунке), вид и соотношение живых и мертвых клеток показан на рисунке 1.

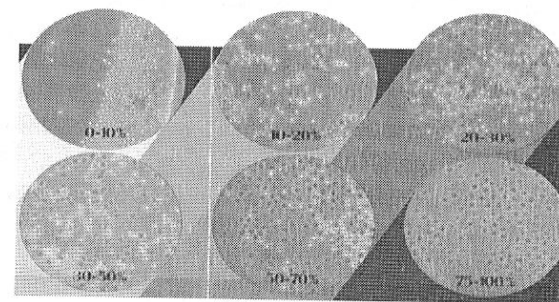


Рисунок 1 - Вид и соотношение живых и мертвых клеток в процентах при интерпретации инвертированным микроскопом

Результаты реакции учитывают по 8-ми балльной системе, соответственно количеству погибших клеток по таблице 1. Баллы фиксируются в соответствующем протоколе, используемой фирмы производителя гистотипирующей панели.

Таблица 1 - Оценка результатов реакции

% токсированных клеток	Баллы	Результат
0-10%	1	Отрицательный
11-20%	2	Слабо положительный
21-50%	4	Положительный
51-80%	6	Положительный
81-100%	8	Сильно положительный

На рисунке 2 представлена схема взаимодействия антител с антигенами HLA находящихся на поверхности мембраны лимфоцитов с комплементом.

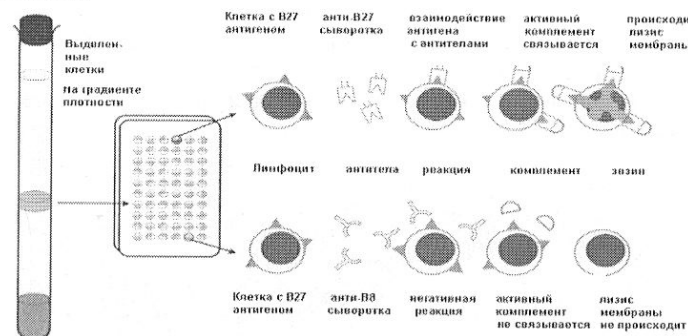


Рисунок 2 - Взаимодействие антител с антигенами HLA находящихся на поверхности мембраны лимфоцитов с комплементом

1.2 Возможные ошибки и способы их устранения

При выполнении исследования возможные ошибки подразделяются на: получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Возможные технические ошибки при постановке лимфоцитотоксического теста представлены в таблице 2.

Меры по предотвращению:

Строгое соблюдение рекомендованных стандартной методикой значений pH для всех используемых реагентов, длительности и температурного режима теста.

Особого внимания требует соблюдение правил работы с комплементом: растворять лиофилизированный комплемент необходимо дистиллированной водой (pH 7,2–7,4) непосредственно перед использованием, держать в момент использования в тающем льду. Следует осторожно пипетировать раствор комплемента, избегая вспенивания, которое снижает его активность. Повторное замораживание комплемента для последующего использования недопустимо.

Таблица 2 - Возможные ошибки при проведении ЛЦГТ

№	Причины ложно-отрицательных или слабых реакций
1.1	Применение взвеси выделенных клеток с высокой концентрацией тромбоцитов, которая ведет к снижению содержания антител и комплемента, т.к. они конкурируют за антитела
1.2	Применение взвеси выделенных клеток с высокой концентрацией лимфоцитов. Клеточная концентрация важна, т.к. тест предполагает стандартное соотношение антиген-антитело
1.3	Применение типизирующих панелей с желтым окрашиванием сывороток, которая является указанием на бактериальную контаминацию или изменение pH вследствие хранения сывороток в сухом льду
1.4	Применение типизирующих панелей, которые были разморожены и снова заморожены. Вследствие чего снижается активность сывороток изменением структур антител в ее составе
1.5	Применение разведенного комплемента, который хранился дольше 1 часа
1.6	Применение остатков разведенного комплемента, которые были повторно заморожены
1.7	Укорочение времени инкубации
1.8	Проведение теста ниже +18°C
2	Причины ложно-положительных реакций
2.1	Положительная реакция приводящие к ложно-положительной оценке. Ввиду схожести молекулярных структур HLA антигены могут реагировать с антисывороткой другой специфичности (перекрестная реактивность). На эту возможность у отдельных сывороток указывается в предлагающемся каталоге результатов.
2.2	Проведение теста выше +22°C
2.3	Удлинение времени инкубации
2.4	Применение поврежденных (нежизнеспособных) лимфоцитов. В этом случае в негативном контроле будет положительная реакция

1.3 Правила забора крови для серологических иммунологических исследований

Для сдачи образцов крови обследуемому необходимо иметь при себе документ удостоверяющий личность и направление от врача-трансплантолога. Все графы направления должны быть заполнены и набраны на компьютере. Также точно должно указываться вид и цель исследования.

Перед забором крови необходимо провести сверку паспортных данных указанных в направлении. Если паспортные данные совпадают, то подготавливаются нужные пробирки в зависимости от вида исследования, указанного в направлении (приложения 3,4,5,6,7). Забор образцов крови может проводиться в целях:

1. Определения HLA фенотипа. Для этого забор крови производят из локтевой вены путем венепункции в пробирку с наполнителем лития-гепарина с зеленой пробкой объемом на 10 мл.

2. Определения предрасполагающей сенсибилизации HLA-антителами и определения специфичности HLA-антител. В этом случае забор крови производят из локтевой вены путем венепункции в пробирку с активатором свертывания с красной пробкой объемом на 5 мл.

3. Постановки пробы на гистосовместимость «Кросс-матч». Кровь реципиента набирают в пробирку с активатором свертывания с красной пробкой объемом на 5 мл, так как для постановки пробы необходима сыворотка пациента. У донора кровь набирают в пробирку с наполнителем лития-гепарина с зеленой пробкой объемом на 10 мл, для выделения лейкоцитов донора и совмещения их с сывороткой пациента.

До забора крови в пробирки подписываются следующие данные обследуемого: Фамилия, Имя, Отчество полностью, дата рождения в формате день/мес/год, согласно документу, удостоверяющего личность. Забор крови производится из локтевых вен. Пробирки должны целиком заполняться кровью, чтобы соблюсти соотношение реагента с кровью. После забора пробирку с кровью необходимо тщательно перемешать с антикоагулянтом и активатором свертывания путем 8-10 кратного переварачивания пробирки. Если содержимое пробирки недостаточно хорошо перемешано, то в пробирках с антикоагулянтом кровь может свернуться, а в пробирках с активатором свертывания – не свернется, что приведет к необходимости повторного взятия пробы. Образцы крови должны сопровождаться направлением в лабораторию.

Образцы крови должны доставляться в лабораторию иммунологического типирования тканей в течение 24 часов (для возможности выделения жизнеспособных лимфоцитов) в 18-20°C температурном режиме [7,8,14].

2. Цели постановки лимфоцитотоксического теста

Лимфоцитотоксический тест применяется при следующих исследованиях:

1. *Определение антигенов I класса системы HLA локусов A, B, Cw.* Для определения антигенов HLA применяется коммерческие наборы с анти-HLA сыворотками различной специфичности.

2. *Определение антител серологическим методом типирования.* Для определения антилейкоцитарных антител (процента сенсибилизации

антителами- PRA) серологическим методом проводят реакцию между сывороткой пациента и с живыми клетками- лейкоцитами от 30-60 доноров с установленными HLA-фенотипами. После выводится процент сенсибилизации HLA-антителами.

3. *Постановка пробы на совместимость для поиска гистосовместимого донора органов.* Для этой пробы совмещается сыворотка реципиента с живыми клетками- лейкоцитами донора.

4. *Подбор совместимой дозы тромбоцитов.* Данный подбор проводится совмещением сыворотки пациента, нуждающегося в трансфузии тромбоцитов и клетками-лейкоцитами доноров крови. Для данного анализа необходимо подбирать доноров крови совместимых по групповой и резус принадлежности реципиента.

Все эти виды исследования проводятся на основе лимфоцитотоксического теста. Ниже представляем описание технических постановок данных методик [8-11,13-14].

2.1 Исследование антигенов I класса системы HLA локусов A, B, Cw

Цель исследования: Определить серологические детерминанты HLA антигенов I-класса локусов A, B, Cw.

Определение антигенов системы HLA локусов A, B, Cw проводят методом серологического типирования в стандартном лимфоцитотоксическом тесте (ЛЦТТ) в трех этапах:

I этап. Выделение лимфоцитов можно провести одним из выше указанных методов.

II этап. Проведение ЛЦТТ. Выделенные лейкоциты инкубируют 30-45 минут с анти-HLA сыворотками согласно инструкции, к коммерческим наборам той или иной фирмы. После инкубируют с комплементом 60 минут. Красят краской 5% раствором эозина К (или флуоресцентными красителями для флуоресцентной методики) 5 минут и проводится интерпретация инвертированным (флуоресцентным) микроскопом.

III этап. Интерпретация результатов проводится методом описанным во 2-ом этапе главы 2 (постановка лимфоцитотоксического теста). Результаты определения HLA-антигенов записывается в журнал типирования доноров и больных (приказ МЗРК от 23 ноября 2010 года №907, форма №410-13/у [15].

2.2 Определение HLA-антител у реципиента

Цель исследования: Определить процент сенсибилизации антилейкоцитарными антителами (уровень PRA) у пациентов, нуждающихся в трансплантации органов.

Определение HLA-антител в сыворотках, полученных из крови потенциальных реципиентов почечного трансплантата, проводят 1 раз в 3

месяца. Если пациент получал гемотрансфузию образцы сывороток исследуют на наличие HLA-антител через 14 дней после трансфузии.

2.2.1 Определение наличия антител методом серологического типирования

Исследование проводят с помощью стандартного ЛЦТТ с использованием панели донорских лимфоцитов, выделенных из крови 30-60 доноров, с установленным HLA-фенотипом.

Определение антител проводится методом серологического типирования в стандартном лимфоцитотоксическом тесте (ЛЦТТ) в трех этапах.

I этап. Подготовка панелей с сывороткой реципиента. Перед подготовкой панелей необходимо составить протокол определения антител (Приложение 1). Далее в каждую лунку пустого микропланшета закапывается минеральное масло пастеровской пипеткой, так, чтобы масло полностью покрывало лунку микропланшета. По составленному протоколу вносят шприцом Тerasaki по 1мкл отрицательную контрольную сыворотку с 1 по 10 ряд в лунки А, а с 1 по 10 ряд лунки В положительную контрольную сыворотку. В остальные лунки вносится сыворотка реципиента по 1 мкл. Так как сыворотку необходимо обследовать с лимфоцитами от 60 доноров, для обследования одного пациента готовится 6 таких панелей с сывороткой пациента. Приготовленным панелям присваиваются порядковые номера. Например, панель №1, панель №2 и т.д.

После каждой сыворотки (отрицательной, положительной и опытной) шприц Тerasaki необходимо промывать ФСБ.

II этап. Выделение лимфоцитов доноров проводится по одной из описанных выше методик.

III этап. Проведение ЛЦТТ для определения лейкоцитарных антител. Все выделенные лимфоциты отмечают порядковым номером. Вносятся по 1,0 мкл взвеси лимфоцитов от первого донора в 1 ряд, второго во 2 ряд, третьего в 3 ряд и т.д. все 60 образцов донорских лимфоцитов вносятся на панели №1-6, согласно рисунка 3.

Инкубируют планшеты при температуре 22°C в течение 45 мин. По окончании инкубации в каждую лунку вносят по 5,0 мкл свежеприготовленного кроличьего комплемента и продолжают инкубировать при тех же температурных условиях в течение 60 минут. По окончании инкубации вносят по 5 мкл краски 5% раствора эозина К (или флуоресцентные красители для флуоресцентной методики типирования).

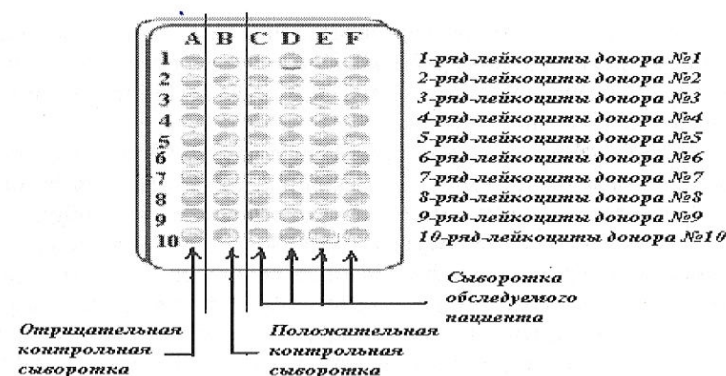


Рисунок 3 - Порядок внесения контрольных сывороток и донорских лейкоцитов для определения антител в сыворотке пациента

IV этап. Интерпретация результатов. Интерпретацию реакции проводят инвертированным микроскопом. Оценку проводят по 8-ми балльной шкале. Положительным результатом считаются реакции оценённые от 2 до 8. Результаты реакции отмечают в протоколе определения антител (приложение 1) и записываются в журнал регистрации определения антител серологическим методом [15]. После высчитывается процент сенсибилизации HLA-антителами сыворотки пациента.

Расчет проводится по следующей формуле:

$$\text{Процент сенсибилизации} = \frac{\text{количество доноров давшие положительные реакции}}{\text{количество доноров взятых для исследования}} \times 100\%$$

2.2.2 Определение аутореактивных лимфоцитотоксических антител (IgM)

Известно, что в крови пациентов могут содержаться лимфоцитотоксические антитела класса IgM (антилимфоцитарные аутоантитела), не оказывающие влияния на приживление трансплантата в отличие от собственно HLA-антител класса IgG. IgM антитела обладают широкой реактивностью с собственными клетками пациента, а также с лимфоцитами большинства других индивидов и обычно не имеют клинического значения, так как не вызывают иммунологических реакций при трансфузии и трансплантации [1,13,17-19]. Однако в лабораторных

условиях они могут обуславливать положительные реакции при постановке перекрестной пробы на индивидуальную совместимость, что приводит к необоснованному отказу от проведения трансплантации от данного потенциального донора.

Модификация лимфоцитотоксического теста с помощью дитиотреитолом (далее –ДТТ) используется для разрушения IgM антител, что позволяет выявить истинную сенсibilизацию, обусловленную антителами IgG класса. Присутствие IgM антител выявляют при помощи обработки сывороток сульфгидрильным раствором – дитиотреитолом (ДТТ), действие которого заключается в избирательном разрушении дисульфидных связей, поддерживающих структуру молекулы IgM. В образцы сывороток, содержащих HLA-антитела, добавляют 0,005М расвор ДТТ. Инкубируют при 37°C в течение 30 мин для инактивации всех IgM.

Затем сыворотки реципиентов исследуют в стандартном лимфоцитотоксическом тесте (в дубле), используя панель донорских лимфоцитов, выделенных из крови 60-ти доноров, с установленным HLA-фенотипом. Кроме стандартных положительных и отрицательных контролей, в панели используют дополнительно положительный и отрицательный контроль с добавлением ДТТ для оценки клеточной жизнеспособности и подтверждения отсутствия инактивации IgG антител после обработки ДТТ.

Считывание результатов с помощью микроскопа осуществляют через 60 минут (после оседания лимфоцитов). Интерпретацию результатов проводят в соответствии со следующими параметрами:

- если после обработки сыворотки ДТТ лимфоцитотоксический тест отрицателен, то, соответственно, сыворотка содержала IgM антитела;
- если после обработки сыворотки ДТТ отмечается частичное уменьшение цитотоксической активности сыворотки, то, следовательно, реакция обусловлена как IgG, так и IgM антителами;
- если после обработки сыворотки ДТТ цитотоксичность сохраняется, следовательно, реакция происходит исключительно за счет IgG антител [13-14].

2.3 Постановка перекрестной пробы на совместимость «кросс матч»

Цель исследования:

- Определить гистосовместимость реципиента и донора органов.
- Поиск совместимой дозы тромбоцитов для онкогематологических больных [8, 12-14, 16-18].

Ход исследования

Постановку пробы на совместимость проводят методом серологического типирования в стандартном лимфоцитотоксическом тесте (ЛЦТТ) в трех этапах.

I этап. Приготовление панелей для постановки пробы на совместимость «Кросс-матч».

Ход приготовления панелей:

Прежде чем начать работу необходимо составить протокол пробы (Приложение 2) на совместимость «Кросс-матч». До проведения пробы на совместимость «Кросс-матч» необходимо развести сыворотку реципиента с фосфатно-солевым раствором до концентрации 1/16 (при необходимости можно продолжить разведение сыворотки). Согласно протоколу в иммунологическую панель в каждую лунку необходимо внести по 15 мкл минерального масла шестиканальным дозатором Терасаки (рисунок 4). В лунку A1 внести 1 мкл отрицательную контрольную сыворотку одноканальным микрошприцом Терасаки, а в лунку F5 внести 1 мкл положительную контрольную сыворотку одноканальным микрошприцом Терасаки. Внести по 1 мкл разведенные сыворотки реципиента в лунки от 1 до 5 ряда панели одноканальным микрошприцом как указано на протоколе, кроме A1 и F5, так как в данные лунки были внесены отрицательный и положительный контрольные сыворотки. Приготовленные панели готовы к применению. Если не предполагается ставить анализ в данный день, то панели можно хранить в морозильнике (-18-22°C) до использования, вместе с составленным протоколом.



Рисунок 4 - Порядок раскапывания сыворотки реципиента в иммунологическую панель для постановки пробы на совместимость «Кросс-матч»

II этап. Выделение лимфоцитов доноров.

III этап. Проведение ЛЦТТ. Во все лунки подготовленной панели с сывороткой реципиента вносят по 1,0 мкл взвеси выделенных лимфоцитов донора в концентрации 2×10^6 /мл. Инкубируют планшеты при температуре 22°C в течение 45 мин. По окончании инкубации в каждую лунку вносят по 5,0 мкл кроличьего комплемента и продолжают инкубировать при тех же температурных условиях в течение 60 минут.

VI этап. Интерпретация результатов. Для дифференциации живых (инактивных) и погибших клеток в каждую лунку вносят по 5,0 мкл 5% раствора эозина. Учет реакции производят при помощи светового инвертированного микроскопа не ранее чем через 30 минут для осаждения клеток в лунки планшета. Результат реакции оценивают в баллах, по 8-ми балльной шкале, соответственно количеству погибших клеток (Таблица 1). Результаты реакции отмечают в протоколе (Приложение 2).

Примечание: Для повышения чувствительности метода проведения кросс-матча следует использовать сыворотку реципиента, взятую в день проведения кросс-матча и предыдущий образец сыворотки, используемый при исследовании предсуществующей сенсибилизации. Если в сыворотке реципиента присутствуют донорспецифические антитела, то есть кросс-матч является «положительным», то трансплантация от данного донора абсолютно противопоказана в связи с высоким риском развития гиперострого отторжения трансплантата.

3. Требования Европейской федерации иммуногенетиков к постановке лимфоцитотоксического теста

3.1. Требования к серологическим тестам:

- Результат реакции комплемент-зависимой цитотоксичности сыворотки с каждым видом клеток должны оцениваться по международной шкале (1,2,4,6,8,16).

3.2. Требования к гистотипирующим панелям:

- Каждая новая серия и партия гистотипирующих панелей должны пройти внутренний лабораторный контроль, постановкой ЛТТЦ с 5-ю различными клетками известного фенотипа и должна быть оценена в параллели с предыдущими анализами.
- Каждая гистотипирующая панель должна содержать по одной лунке положительной и отрицательной контрольных сывороток.
- Если положительные и отрицательные контрольные лунки не сработали, то анализ необходимо повторить.
- При всех сомнениях в антигене, определенным серологическим методом, необходимо подтвердить молекулярно-генетическое типирование.

3.3. Требования к комплементу:

- Каждая серия и партия комплемента должны пройти внешний контроль качества, постановкой анализа с 3-мя предварительно

исследуемыми наборами для типирования или разными 3-мя образцами клеток.

- Комплемент должен храниться при соответствующей температуре, указанной в его инструкции.

3.4. Требования к контрольным реагентам:

- Каждая серия и партия контрольных сывороток должны пройти внешний контроль качества, постановкой анализа с 3-мя предварительно исследуемыми наборами для типирования или разными 3-мя образцами клеток.

- Контрольные реагенты должны храниться при соответствующей температуре, указанной в его инструкции.

3.5. Требования к клеточной донорской панели для определения HLA-антител:

- Клеточную панель подбирают таким образом, чтобы были максимально представлены все известные HLA-антигены на основе лимфоцитотоксического теста.

- Клеточная панель должна быть охарактеризована по HLA фенотипу I и II класса [14,16].

Заключение

На сегодня отечественная служба крови - одна из динамично развивающихся отраслей здравоохранения, которая за короткое время достигла серьезных успехов, и получила признание международного сообщества.

При поиске совместимого донора для трансплантации органов и гемопоэтических стволовых клеток большое значение имеет правильное проведение гистосовместимости по системе HLA. Основой серологических реакций, определяющих видов HLA-антигенов и антител, является лимфоцитотоксический тест.

В методических рекомендациях впервые в Республике Казахстан описана методика серологических реакций, определяющих антигенов и антител HLA-системы, а также требования к проведению иммуногенетических исследований крови реципиентов и их доноров.

Выполнение данного алгоритма исследований позволит обеспечить достоверность диагностики определения гистосовместимости пар донор - реципиент.

Список использованных источников

1. Зарецкая Ю.М., Леднев Ю.А. HLA 50 лет: 1958 – 2008. - Тверь: 000 3-34. «Издательство «Триада», 2008. – 152 с.
2. Классическая и современная иммунология/Тузова-Юсковец Р.В., Ковалев Н.А. - Минск: Белорус. наука, 2006. – 691 с.
3. Гематология: руководство для врачей/ под ред. Н.Н. Мамаева, С.И.Рябова. - СПб.: СпецЛит, 2008. – 543 с.
4. Полетаев А.Б. Клиническая и лабораторная иммунология: Избранные лекции. - М.: ООО «Медицинские информационное агентство», 2007 – 184 с.
5. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. М., 2006. –118 с.
6. Наглядная иммунология/ Бурместер Г.Р., Пецутто А.; пер. с англ.- 3-е изд. - Москва, 2014.- 90 с.
7. Иммунология: практикум: учебное пособие/под ред. Л.В.Ковальчук, Г.А.Игнатъева, Л.В.Ганковская. – М.: ГЕОТАР - Медиа, 2010. – 176 с.
8. Практическая и лабораторная гематология, С.М.Льюис, Б.Бэйн, И.Бэйтс, перевод с английского под редакцией А.Г.Румянцева. - Москва, 2009, 17-24 с.
9. Безопасное переливание крови: руководство для врачей / Ю.Л. Шевченко, Е.Б. Жибурт. – СПб. – Питер, 2000. - 491 с.
10. Клиническая иммунология и аллергология: учеб. пособие/ Под. ред. А.В. Караукулова. М., 2002.- 257 с.
11. Курчанов Н.А. Генетика человека с основами общей генетики: учебное пособие. - М: Изд-во: СпецЛит, 2009 г. -192 с.
12. Михеев В.С. Медицинская биология и генетика клетки. СПб.: Изд-во «ВВМ», 2009. – 164 с.
13. Определение HLA-сенсibilизации у больных, находящихся на диализе и получающих гемокомпонентную терапию (медицинская технология). Санкт-Петербург, 2010 ФГУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии». - 18 с.
14. Практическое руководство «Руководство по диагностическому лабораторному обеспечению трансплантации солидных органов». - Москва 2013. -16 с.
15. Приказ Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 27.12.2011 г. № 928 «О некоторых вопросах трансплантации тканей и (или) органов (части органов)». www.zakon.kz.
16. Standards for histocompatibility & immunogenetics testing (Стандарт по проведению тестов гистосовместимости). Version 7.0. European Federation for Immunogenetics (EFI) <https://www.efi-web.org/.../version-7-of-the-standards-for-hi>

17. Opelz G. Collaborative Transplant Study. Non-HLA transplantation immunity revealed by cytotoxic antibodies // Lancet. - 2005 / Vol. 365.- № 9470. - P. 1570-1576.

18. Roelen D. van Bree J. Witvliet M. et al. Ig G antibodies against this antigen. Ig M are not // Transplantation. - 2004, - Vol. 57. - № 9. - P. 1388-1392.

19. A Guide to the Services provided by the Department of Histocompatibility and Immunogenetics (The National Histocompatibility And Immunogenetics Service For Solid Organ Transplantation (NHISSOT), 8th Edition - November 2011.

20. Оприщенко С.А., Захаров В.В., Русанов В.М. Международные регулирующие документы и стандарты службы крови и производства препаратов плазмы,- М.: ИД «Медпрактика М», 2008.- 464 с.

21. Жибурт Е.Б., Клочова Е.А., Губанова М.Н. и др. Развитие службы крови США// Трансфузиология.- 2010.- Т.11, №1.- С.59-71.

22. Жибурт Е.Б., Максимов В.А., Вечерко А.В., Кузьмин Н.С. Европейский подход к прослеживаемости и уведомлениям о серьезных побочных реакциях и происшествиях в службе крови// Трансфузиология.- 2006.- Т.7. №3. - С. 27-42.

23. Жибурт Е.Б., Рейзман П.В., Голосова С.А. Аферез-технология для донора и реципиента// Трансфузиология.- 2004.-Т.5. №1. - С. 73-83.

24. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. - 2000. - №3. - С.4-12.

25. Чертков И.Л., Дризе Н.И. Взлёты и падения клеточной гематологии за три четверти века. // Гематология и трансфузиология. - 2001.- №3. - С.10-14.

Список рекомендуемой литературы

1. Трансфузиология. Учебник/ Е.Б. Жибурт. - Питер, 2002. 736 с.
2. Заготовка и переливание тромбоцитов. Руководство для врачей/ Е.Б.Жибурт, С.Р.Мадзаев. - М.: Издание Российской академии естественных наук, 2013. - 376 с.
3. Кабазиева Г.Ш. HLA-система и псориаз//Медицина. - 2000.- №6.- С.11-12.
4. Игембаева К.С., Игембаева Р.С. и соавт. Антигены системы HLA у больных туберкулезом органов дыхания казахской и русской популяции семипалатинского региона//Медицина. - 2001.- №5.- С.55-56.
5. Хаитов Р.М. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека/ Р.М. Хаитов, Л.П. Алексеев// Иммунология.- 2001.- №3. - С.4-12.
6. Акопян А.В., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Иммунологические и иммуногенетические аспекты периодической болезни// Иммунология.- 1998. - №1. - С.4-6.
7. Болдырева М.Н., Хаитов Р.М., Дедов И.И. и др. Новый взгляд на механизм HLA ассоциированной предрасположенности к сахарному диабету 1 типа. Теоретические и прикладные аспекты. Иммунология.- 2005. - №6. - С.324-329.
8. Алексеев Л.П. Межпопуляционный подход в установлении ассоциированной с HLA генетической предрасположенности к инсулинозависимому сахарному диабету// Л.П. Алексеев, И.И. Дедов, А.В. Зилов и др.// Сахарный диабет.-1998. - №1. - С.19-21.
9. Ахмедова Ш.У. Полиморфизм генов HLA II класса у больных инсулинозависимым сахарным диабетом в узбекской популяции//Ш.У. Ахмедова, Д.А. Рахимова// Иммунология.- 2002.- №5. - С.298-300.
10. Бубнова Л.Н. Регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток/ Л.Н. Бубнова, Е.В. Беляева, А.С. Беркос и др.// Вестник гематологии.-2005.- №1.- С.33-36.
11. Голованова О.В. Молекулярный полиморфизм HLA-генов DRB1 и DPB1 в популяции европеоидного происхождения, проживающей в ЗападноСибирском регионе// О.В. Голованова, А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев и др.// Иммунология. 2002.- №1.- С.29-31.
12. Киселев Л.Л. Геном человека и биология XXI века/ Л.Л. Киселев// Вестник РАН.- 2000.- Т.70, №5.- С.412-424.
13. Куклик Л.В. Особенности полиморфизма HLA-специфичностей I и II классов при различных типах сахарного диабета: Автореф. дис. канд. мед. наук/ Л.В. Куклик. СПб., 2000.- 20 с.
14. Новик А.А. Генетика в клинической медицине/ А.А. Новик, Т.А. Камилова, В.Н. Цыган. СПб.: Военно-медицинская академия.- 2001.- 219с.
15. Буркитбаев Ж.К., Турганбекова А.А. Распространения аллелей HLA - среди доноров города Астана и анализ генетической

Приложение 1

АНТИДЕНЕЛЕРДІ АНЫҚТАУ ХАТТАМАСЫ
ПРОТОКОЛ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ

Панель № _____ группа крови _____

Сарысу үлгісінің № _____
№ образца сыворотки

Реципиент фенотипі	HLA-A	B	Cw	Bw
Фенотип реципиента				

Дәрігер-зертханашының қолы _____
Подпись Врача-лаборанта _____
Зерттелген күні _____
Дата исследования _____

Приложение 2

«КРОСС-МАТЧ» ЖЕКЕ ІРІКТЕУ СЫНАМАСЫН АНЫҚТАУ ХАТТАМАСЫ
ПРОТОКОЛ ПОСТАНОВКИ ПРОБЫ НА СОВМЕСТИМОСТЬ «КРОСС-МАТЧ»

Реципиенттің аты-жөні _____
Ф.И.О. реципиента _____

Реципиент фенотипі HLA-A B Cw DRB1
Фенотип реципиента _____

Донордың аты-жөні (Ф.И.О. донора) Фенотип донора				Донордың аты-жөні (Ф.И.О. донора) Фенотип донора			
HLA-A	B	Cw	DRB1	HLA-A	B	Cw	DRB1
1A	контроль -			6F	контроль -		
1B	Нативная сыворотка			6E	Нативная сыворотка		
1C	Нативная сыворотка			6D	Нативная сыворотка		
1D	Нативная сыворотка			6C	Нативная сыворотка		
1E	Нативная сыворотка			6B	Нативная сыворотка		
1F	Нативная сыворотка			6A	Нативная сыворотка		
2F	Сыворотка в разведении 1/2			7A	Сыворотка в разведении 1/2		
2E	Сыворотка в разведении 1/2			7B	Сыворотка в разведении 1/2		
2D	Сыворотка в разведении 1/2			7C	Сыворотка в разведении 1/2		
2C	Сыворотка в разведении 1/2			7D	Сыворотка в разведении 1/2		
2B	Сыворотка в разведении 1/2			7E	Сыворотка в разведении 1/2		
2A	Сыворотка в разведении 1/2			7F	Сыворотка в разведении 1/2		
3A	Сыворотка в разведении 1/4			8F	Сыворотка в разведении 1/4		
3B	Сыворотка в разведении 1/4			8E	Сыворотка в разведении 1/4		
3C	Сыворотка в разведении 1/4			8D	Сыворотка в разведении 1/4		
3D	Сыворотка в разведении 1/4			8C	Сыворотка в разведении 1/4		
3E	Сыворотка в разведении 1/4			8B	Сыворотка в разведении 1/4		
3F	Сыворотка в разведении 1/4			8A	Сыворотка в разведении 1/4		
4F	Сыворотка в разведении 1/8			9A	Сыворотка в разведении 1/8		
4E	Сыворотка в разведении 1/8			9B	Сыворотка в разведении 1/8		
4D	Сыворотка в разведении 1/8			9C	Сыворотка в разведении 1/8		
4C	Сыворотка в разведении 1/8			9D	Сыворотка в разведении 1/8		
4B	Сыворотка в разведении 1/8			9E	Сыворотка в разведении 1/8		
4A	Сыворотка в разведении 1/8			9F	Сыворотка в разведении 1/8		
5A	Сыворотка в разведении 1/16			10F	Сыворотка в разведении 1/16		
5B	Сыворотка в разведении 1/16			10E	Сыворотка в разведении 1/16		
5C	Сыворотка в разведении 1/16			10D	Сыворотка в разведении 1/16		
5D	Сыворотка в разведении 1/16			10C	Сыворотка в разведении 1/16		
5E	Сыворотка в разведении 1/16			10B	Сыворотка в разведении 1/16		
5F	контроль +			10A	контроль +		

Дәрігер-зертханашының қолы _____
Подпись Врача-лаборанта _____

Зерттелген күні _____
Дата исследования _____

Приложение 3
Приложение 1 к алгоритму взаимодействия
медицинских организаций для доставки образцов крови
пациентов состоящих в «Листе ожидания»
для лабораторного сопровождения трансплантации
органов и тканей от трупного донора
в лабораторию Научно-производственного центра трансфузиологии для лабораторного сопровождения трансплантации органов и
тканей от трупного донора

№	№ ул. личности	Фамилия Имя Отчество (полностью)	Дата рождения	Национальность	Домашний адрес, телефоны: раб., дом., сот. Пациента	Диагноз, (первичный диагноз приведен к ТХПН), сопутствующие заболевания	Группа крови	Направившая медицинская организация	ФИО, контактные телефоны лечащего врача	Трансплантация какого органа необходима
1										
2										
3										

*Строго заполнять все графы направления, так как данные информации являются необходимыми для включения реципиента в лист ожидания.
Ф.И.О. заведующего отделением _____ Печать организации _____
Подпись заведующего отделения _____
Контактные телефоны заведующего _____
Дата забора крови _____

А4 форматы
Формат А4

ҚҰЖЖ бойыншауым коды
Код организации по ОКПО

Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения Республики Казахстан	Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрінің міндетін атқарушының 2010 жылғы «23» қарашадағы № 907 бұйрығымен бекітілген № 410-10/е нысанды медициналық құжаттама
Ұйымның атауы Наименование организации	Медицинская документация Форма № 410-10/у утверждена приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан «23» ноября 2010 года № 907

HLA-жүйесі бойынша типтеуге жолдама
Направление на типирование по HLA-системе

Типтеу әдісі (Метод типирования):

Типтеу әдісін белгілеңіз: Отметьте метод типирования:	
☐ CDC	☐ гепаринді қан (гепаринизированная кровь)
	☐ EDTA бар қан (Кровь с EDTA)
☐ SSP	☐ EDTA бар қан (Кровь с EDTA)
☐ SBT	☐ EDTA бар қан (Кровь с EDTA)
☐ SSO	☐ EDTA бар қан (Кровь с EDTA)

МҰ (МО) _____

Бөлімше (Отделение) _____

Реципиент немесе донордың ТАӘ (ФИО реципиента или донора) _____

Туған күні _____

(Дата рождения) _____

Ұлты (Национальность) _____

Мекенжайы, телефон _____

(Домашний адрес, телефон) _____

Диагнозы (Диагноз) _____

Гематрансфузиялық сыртартқы

(Гемотрансфузионный анамнез)

Акушерлік сыртартқы

(Акушерский анамнез)

Қан тобы мен резус-тиістілігі

(Группа крови и резус-фактор)

ҚЖТ лейкоциттердің жалпы саны

(Количество лейкоцитов в ОАК)

Емдеуші дәрігердің ТАӘ (ФИО лечащего врача)

Байланыс телефонда (Контактные телефоны)

Қанды алу күні мен уақыты

(Дата и время забора крови)

А5 форматы

Формат А5

Нысанның БҚСЖ бойынша коды _____

Код формы по ОКУД _____

ҚҰЖЖ бойыншауым коды _____

Код организации по ОКПО _____

Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения Республики Казахстан	Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрінің міндетін атқарушының 2010 жылғы «23» қарашадағы № 907 бұйрығымен бекітілген № 410-9/с нысанды медициналық құжаттама
Ұйымның атауы Наименование организации	Медицинская документация Форма № 410-9/у утверждена приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан «23» ноября 2010 года № 907

Лейкоциттік антиденелерді анықтауға жолдама
Направление на определение лейкоцитарных антител

Материал түрі (Вид материала):

☐ CDC ☐ антикоагулянты бар қан (кровь с антикоагулянтom)

☐ ИФА ☐ антикоагулянты бар қан (кровь с антикоагулянтom)

МҰ (МО) _____

Бөлімше (Отделение) _____

Реципиенттің немесе донордың ТАӘ (ФИО реципиента или донора) _____

Туған күні (Дата рождения) _____

Типтеу әдісі (Метод типирования):

☐ CDC	☐ сенсбилизациялау пайызы/процент сенсбилизации
☐ ELISA (ИФА)	☐ сенсбилизациялау пайызы процент сенсбилизации
	☐ рекшелігі/специфичность

Ұлты (Национальность) _____

Мекенжайы, тел (Домашний адрес, тел) _____

Диагнозы (Диагноз) _____

Гематрансфузиялық анамнез

Гемотрансфузионный анамнез

Акушерлік сыртартқы

(Акушерский анамнез)

ABO мен Rh (ABO и Rh)

Емдеуші дәрігердің ТАӘ

(ФИО лечащего врача)

Дәрігердің байланыс тел.

(Контактные тел. врача)

Қан алынған күн мен уақыты

Дата и время забора крови

Приложение 6

Формат А5

Нысанның БҚСЖ бойынша коды _____
Код формы по ОКУД _____
ҚҰЖЖ бойынша ұйым коды _____
Код организации по ОКПО _____

Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения Республики Казахстан	Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрінің міндетін атқарушының 2010 жылғы «23» қарашадағы № 907 бұйрығымен бекітілген № 410-11/е нысанды медициналық құжаттама
Ұйымның атауы Наименование организации	Медицинская документация Форма № 410-11/у утверждена приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан «23» ноября 2010 года № 907

«Кросс-матч» үйлесімділігіне жеке сынамаға жолдама
Направление на индивидуальную пробу на совместимость «Кросс-матч»

Материал түрі (Вид материала):

Реципиент	☐ антикоагулянт бар қан (кровь с антикоагулянт)
Донор	☐ EDTA бар қан (кровь с EDTA) ☐ литий-гепарині бар қан (кровь с литий-гепарином)

МУ атауы (Наименование МО) _____
Бөлімше (Отделение) _____

Реципиент ТАӘ (ФИО) _____
Қан тобы (Группа крови) _____
Туған түні _____

(Дата рождения)

Донор ТАӘ (ФИО) _____
Қан тобы (Группа крови) _____
Туған түні _____

(Дата рождения)

Талдауға жолдаған дәрігердің қолы _____
(Подпись направившего врача)

Талдауға жодаған күні _____

Приложение

Нысанның БҚСЖ бойынша коды _____
Код формы по ОКУД _____
ҚҰЖЖ бойынша ұйым коды _____
Код организации по ОКПО _____

Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения Республики Казахстан	Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрінің міндетін атқарушының 2010 жылғы «23» қарашадағы № 907 бұйрығымен бекітілген № 410-12/е нысанды медициналық құжаттама
Ұйымның атауы Наименование организации	Медицинская документация Форма № 410-12/у утверждена приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан «23» ноября 2010 года № 907

Тромбоциттерді HLA-жүйесі бойынша арнайы іріктеу сынамағына жолдама
Направление на специальный подбор тромбоцитов по HLA-системе

Материал түрі (Вид материала):

Реципиент	☐ антикоагулянтсыз қан (кровь без антикоагулянта)
-----------	--

МУ (МО) _____

Бөлімше (Отделение) _____

Реципиенттің немесе донордың ТАӘ _____

(ФИО реципиента или донора) _____

Туған күні (Дата рождения) _____

Ұлты (Национальность) _____

Мекенжайы, телефон _____

(Домашний адрес, телефон)

Диагнозы (Диагноз) _____

Гематрансфузиялық сыртартқы _____

(Гемотрансфузионный анамнез)

Акушерлік сыртартқы _____

(Акушерский анамнез)

ABO мен Rh (ABO и Rh) _____

ҚЖТ тромбоциттер саны _____

(Количество тромбоцитов в ОАК)

Қажет доза молшері мен трансфузия күндері _____

Требуемое количество доз и даты трансфузии

Емдеуші дәрігердің ТАӘ (ФИО лечащего врача) _____

Байланыс телефондар (Контактные телефоны) _____

Қанды алған күні мен уақыты _____

(Дата и время забора крови) _____