

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2009г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Президент Фонда развития
медицинских и биологических
технологий «МеДиКлон»
В.Е.Эмме
« 3 » февраля 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению реагента моноклонального анти-D IgM для определения
антигена D системы Резус эритроцитов человека (ИзосероклонTM анти-D IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИзосероклонTM анти-D IgM предназначен для определения резус-принадлежности крови человека путем выявления антигена D эритроцитов в реакции прямой гемагглютинации.

ИзосероклонTM анти-D IgM вызывает агглютинацию большинства исследуемых D-положительных образцов крови, за исключением образцов эритроцитов, содержащих частичный антиген D – вариант D^{VI}.

Антиген D в образцах крови доноров определяют с помощью анти-D IgM реагента. При отрицательных результатах в реакции с анти-D IgM реагентом, образцы крови доноров дополнительно исследуют на наличие слабых антигенов или вариантов антигена D с анти-D IgG реагентом.

Антиген D в образцах крови реципиентов определяют с помощью анти-D IgM реагента. Тест с анти-D IgG реагентом на наличие слабых антигенов или вариантов антигена D для реципиентов не проводят.*

2. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАГЕНТА

2.1. Принцип действия

Принцип действия реагента основан на реакции гемагглютинации. Реакция наступает в результате специфического взаимодействия антигена D эритроцитов человека с ИзосероклономTM анти-D IgM.

Действующее начало реагента анти-D IgM – человеческие моноклональные антитела класса IgM, продуцируемые гетерогибридомной линией клеток человек-мышь. Для производства реагента используется культуральная питательная среда, в которой в результате культивирования клеток гетерогибридомы содержатся анти-D IgM антитела.

* - Требования к проведению иммуногематологических исследований доноров и реципиентов на СПК и в ЛПУ.
Методические указания № 2001/109 МЗ РФ. СПб. 2002 г.

Реагент анти-D IgM используют в реакции прямой агглютинации путем смешивания ИзосероклонаTM с исследуемыми образцами крови (эритроцитами). Наступление агглютинации (положительная реакция) выражается в склеивании эритроцитов в отчетливо видимые агрегированные скопления клеток – агглютинаты, и просветлении поля реакции.

При взаимодействии анти-D IgM реагента с D-отрицательными эритроцитами или эритроцитами, содержащими частичный вариант антигена D – D^{VI}, агглютинация не появляется.

2.2. Состав комплекта

- 5 или 10 флаконов реагента (по 2,0; 5,0 или 10 мл в каждом).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

ИзосероклонTM анти-D IgM агглютинирует D-положительные эритроциты. ИзосероклонTM анти-D IgM не агглютинирует D-отрицательные эритроциты и эритроциты, содержащие разновидность антигена D – частичный антиген D^{VI}.

3.2. Титр.

Титр ИзосероклонаTM анти-D IgM в реакции агглютинации в планшете – не менее 1:128.

3.3. Авидность.

Время наступления агглютинации D-положительных эритроцитов с ИзосероклономTM анти-D IgM в реакции на плоскости не превышает 60 сек.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с анализируемыми образцами крови следует использовать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека необходимо рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита и др. возбудителей инфекций.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- белые пластины со смачиваемой поверхностью;
- планшеты круглодонные для иммунологических реакций;
- пробирки стеклянные круглодонные вместимостью 2,0 – 5,0 мл;
- стеклянные или пластмассовые палочки для перемешивания капель крови и реагентов;
- пипетки пастеровские вместимостью 5,0 мл;
- физиологический раствор (0,9% NaCl);
- центрифуга, развивающая ускорение 2000 об/мин;
- термостат, поддерживающий температуру 37±1°C;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- стандартные D-положительные и D-отрицательные эритроциты.



Зиме В.Е.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Определение производится в нативной крови, взятой в консервант; в крови, взятой без консерванта, в том числе взятой из пальца.

Максимальный срок хранения образцов крови, предназначенных для исследования – не более 3 суток при температуре от 2 до 8°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Используется метод реакции прямой гемагглютинации на плоскости, в пробирках или в планшете.

Определение производится в помещении с хорошим освещением при комнатной температуре от 15 до 25°C.

7.1. Порядок проведения анализа

ИзосероклонTM анти-D IgM может быть использован в реакции агглютинации на плоскости, в пробирках или в планшете.

7.1.1. Реакция гемагглютинации на плоскости.

7.1.1.1. Необходимо промаркировать пластину, указав фамилию, имя, отчество исследуемого лица и специфичность используемого реагента.

7.1.1.2. Нанести на плоскость одну большую каплю (около 0,1 мл) ИзосероклонаTM анти-D IgM.

7.1.1.3. Рядом с реагентом нанести одну маленькую (0,01 – 0,05 мл) каплю исследуемой крови (эритроцитов). Для получения более выраженной и четкой агглютинации рекомендуется использовать эритроциты в высокой концентрации.

7.1.1.4. Смешать чистой стеклянной палочкой каплю исследуемой крови (эритроцитов) с реагентом.

7.1.1.5. Через 20-30 сек после смешивания, необходимо мягко покачивать пластину в течение 10-20 сек.

7.1.1.6. Результат реакции оценить визуально. Обычно четкая агглютинация наступает через 60 секунд после смешивания реагента с эритроцитами, но окончательный результат реакции следует учитывать через 3 мин, но не позднее, т.к. при подсыхании капли может наблюдаться мелкая неспецифическая агглютинация.

Использование предварительно подогретой в термостате до температуры 37°C пластины сокращает время наступления агглютинации.

7.1.2. Реакция гемагглютинации в пробирках.

7.1.2.1. Приготовить из отмытых анализируемых эритроцитов 5% взвесь в физиологическом растворе.

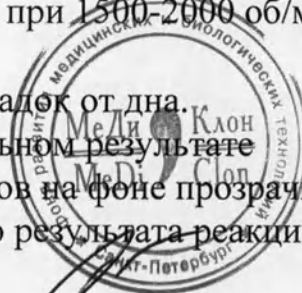
7.1.2.2. Внести в круглодонную пробирку 0,1 мл ИзосероклонаTM анти-D IgM и одну каплю эритроцитарной взвеси, тщательно смешать.

7.1.2.3. Инкубировать пробирку в течение 30 мин при температуре 37°C.

7.1.2.4. Центрифугировать пробирку в течение 30 сек при 1500-2000 об/мин при комнатной температуре от 15 до 25°C.

7.1.2.5. Осторожно встряхивая пробирку, отделить осадок от дна.

7.1.2.6. Результат оценить визуально. При положительном результате образуются один или несколько крупных агглютинатов на фоне прозрачного физиологического раствора. В случае отрицательного результата реакции



осадок легко разбивается и представляет собой гомогенную непрозрачную суспензию эритроцитов.

7.1.3. Реакция гемагглютинации в планшете.

7.1.3.1. В лунку круглодонного планшета внести 50 мкл ИзосероклонаTM анти-D IgM и 50 мкл 5% взвеси исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе. Перемешать пипетированием. Инкубировать планшет в течение 60 мин при комнатной температуре. Результат реакции оценить визуально по характеру осадка эритроцитов на дне лунки. При положительном результате агглютинаты равномерно выстилают дно лунки и имеют неровные, четко очерченные края. При отрицательном результате эритроциты образуют на дне лунки осадок в виде точки.

8. КОНТРОЛЬ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Для контроля специфичности (независимо от применяемой методики исследования) с каждой серией анализируемых образцов крови необходимо проводить контрольные исследования ИзосероклонаTM анти-D IgM со стандартными D-положительными и D-отрицательными эритроцитами.

Результаты учитывают только при наличии правильной реакции ИзосероклонаTM анти-D IgM со стандартными эритроцитами.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ РЕАГЕНТА

Реагент должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до 25°C не более 10 сут.

Вскрытые флаконы с реагентом можно хранить при температуре от 2 до 8°C в плотно закрытом виде не более 1 мес.

По вопросам, касающимся качества реагента ИзосероклонTM анти-D IgM, следует обращаться в Фонд развития медицинских и биологических технологий «МеДиКлон» по адресу: 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., д.2 и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, г. Москва, Научный проезд, д.14а. Телефоны: 120-60-95, 120-60-96.

Проректор по лечебной работе
ГОУ ВПО СПбГМУ
им.акад. И.П.Павлова,
проф., д.м.н.



Д. Ю. Семёнов

Заведующий ОПК СПбГМУ
им.акад. И.П.Павлова,
доц., к.м.н.

Б. А. Барышев

Зам. Президента Фонда «МеДиКлон»,
к.б.н.



В. М. Чмелёв