

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2009г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Президент Фонда развития
медицинских и биологических
технологий «МеДиКлон»



ИНСТРУКЦИЯ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИзосероклонTM анти-D IgG предназначен для определения резус-принадлежности крови человека путем выявления антигена D эритроцитов, включая слабый антиген D (D^u) и варианты $D^I - D^{VII}$, в непрямом антиглобулиновом тесте (непрямая реакция Кумбса) или в реакции конглоутинации с желатином в пробирочном тесте.

Реагент анти-D IgG может быть использован:

- в качестве дополнительного, уточняющего реагента для выявления частичных вариантов антигена D ($D^I - D^{VII}$) в образцах эритроцитов доноров, которые в реакции с ИзосероклономTM анти-D IgM или другими моноклональными анти-D IgM реагентами были определены как D-отрицательные*;
- в качестве самостоятельного реагента для определения всех разновидностей антигена D эритроцитов человека – D; D^u ; $D^I - D^{VII}$.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАГЕНТА

2.1. Принцип действия

Принцип действия реагента основан на реакции гемагглютинации. Реакция наступает в результате специфического взаимодействия антигенов D, D^u или $D^I - D^{VII}$ эритроцитов человека с ИзосероклономTM анти-D IgG.

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

*Примечание. Тест с анти-D IgG реагентом на наличие слабых антигенов или вариантов антигена D для реципиентов не проводят. - 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 IgG используют в непрямом антиглобулиновом тесте (непрямая реакция Кумбса) или в реакции конглоутинации с желатином в пробирочном тесте путем смешивания ИзосероклонаTM с исследуемыми образцами крови (эритроцитов).

Положительная реакция выражается в склеивании эритроцитов в отчетливо видимые агрегированные скопления клеток – агглютинаты, и просветлении поля реакции.

При отсутствии антигена D и его разновидностей (D^u ; D^I - D^{VII}) на исследуемых эритроцитах 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 IgG агглютинирует все разновидности D-положительных эритроцитов. ИзосероклонTM анти-D IgG не агглютинирует D-отрицательные эритроциты.

3.2. Титр:

- титр ИзосероклонаTM анти-D IgG в непрямом антиглобулиновом тесте (непрямая проба Кумбса) или в реакции конглоутинации с желатином в пробирочном тесте – не менее 1:128.

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

- пробирки стеклянные круглодонные вместимостью 2,0 – 5,0 мл;
- пипетки пастеровские вместимостью 5,0 мл или полуавтоматическая пипетка со сменным объемом;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) или раствор с низкой ионной силой – LISS;
- антиглобулиновый реагент (сыворотка Кумбса);
- 10%-ный желатин;
- центрифуга, развивающая ускорение 2000 об/мин;
- термостат лабораторный или баня водяная, поддерживающие температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и $48 \pm 1^\circ\text{C}$;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- стандартные D-положительные и D-отрицательные эритроциты.

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 непрямой антиглобулиновый тест (непрямая проба Кумбса) или реакция конглоутинации с желатином в пробирочном тесте.

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

7.1. Порядок проведения анализа

7.1.1. Непрямой антиглобулиновый тест (непрямая проба Кумбса).

7.1.1.1. Приготовить образец исследуемой крови. Для этого в пробирку внести примерно 0,25 мл крови, три раза отмыть эритроциты в 5-10 мл физиологического раствора; ресуспендировать осадок в 2-3 мл физиологического раствора или в растворе с низкой ионной силой – LISS для получения 2-5%-ной суспензии исследуемых эритроцитов.

7.1.1.2. Промаркировать чистую пробирку, указав Ф.И.О. исследуемого лица.

7.1.1.3. Внести в пробирку одну каплю (~ 0,1 мл) ИзосероклонаTM анти-D IgG.

7.1.1.4. Добавить одну каплю 2-5%-ной взвеси исследуемых эритроцитов, смешать с реагентом анти-D IgG.

7.1.1.5. Инкубировать смесь в термостате или на водяной бане при температуре 37°C в течение 10-15 мин.

7.1.1.6. Добавить в пробирку 5-10 мл физиологического раствора. Центрифугировать пробирку со смесью в течение 2-5 мин при 1500-3000 об/мин. Полностью удалить физиологический раствор.

7.1.1.7. Добавить одну каплю антиглобулинового реагента к осадку эритроцитов и тщательно перемешать.

7.1.1.8. Центрифугировать пробирку с исследуемым образцом эритроцитов 15-20 секунд при 2000-3000 об/мин.

7.1.1.9. Осторожно ресуспендировать осадок эритроцитов и визуально определить наличие или отсутствие агглютинации. При положительном результате на дне пробирки образуется один или несколько крупных агглютинатов на фоне прозрачного раствора. Менее выраженная агглютинация свидетельствует о наличии на эритроцитах вариантов антигена D (D^I - D^{VII}). В случае отрицательного результата реакции осадок легко разбивается и представляет собой непрозрачную суспензию эритроцитов.

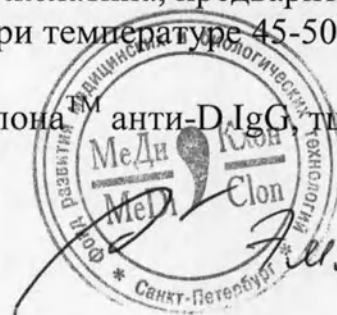
7.1.2. Реакция конглоутинации с желатином в пробирочном тесте.

7.1.2.1. Промаркировать чистую пробирку, указав Ф.И.О. исследуемого лица.

7.1.2.2. В пробирку внести одну каплю (0,05-0,1 мл) исследуемой крови.

7.1.2.3. Добавить две капли по 0,1 мл 10%-ного желатина, предварительно прогретого в термостате или на водяной бане при температуре 45-50°C до разжижения.

7.1.2.4. Добавить две капли по 0,1 мл ИзосероклонаTM анти-D IgG, тщательно перемешать суспензию.



7.1.2.5. Инкубировать 10-15 мин на водяной бане или 30 мин в термостате при температуре 48°C.

7.1.2.6. Добавить в пробирку 5-6 мл физиологического раствора, закрыть её резиновой пробкой, а затем осторожно перевернуть пробирку 1-2 раза.

7.1.2.7. Результаты реакции учесть визуально. При положительном результате образуется один или несколько крупных агглютинатов на фоне прозрачного физиологического раствора. Менее выраженная агглютинация свидетельствует о наличии на эритроцитах вариантов антигена D ($D^I - D^{VII}$). При отрицательном результате образуется равномерная, непрозрачная суспензия эритроцитов.

8. КОНТРОЛЬ СПЕЦИФИЧНОСТИ

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

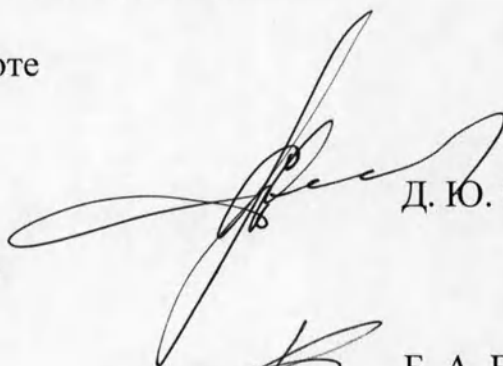
9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ РЕАГЕНТА

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.

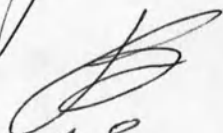
Вскрытые флаконы с реагентом можно хранить при температуре от 2 до 8°C в плотно закрытом виде не более 1 мес.

По вопросам, касающимся качества реагента ИзосероклонTM анти-D IgG, 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.

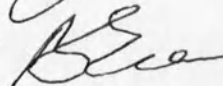
Проректор по лечебной работе
ГОУ ВПО СПбГМУ
им.акад. И.П.Павлова,
проф., д.м.н.


Д. Ю. Семёнов

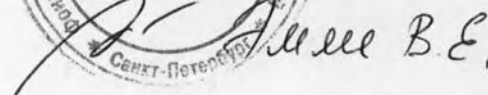
Заведующий ОПК СПбГМУ
им.акад. И.П.Павлова,
доц., к.м.н.


Б. А. Барышев

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


В. М. Чмелёв




В. Е. Мельник