

Реагент Galileo Diluent

Раствор для проведения реакций гемагглютинации на полуавтоматических и автоматических приборах

•  In Vitro Diagnostic Medical Device

•  Temperature Limitation
• Discard if markedly turbid

•  Consult Instructions for Use
•  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Раствор для проведения реакций гемагглютинации на полуавтоматических и автоматических приборах. Готовый для применения изотонический раствор для разведения эритроцитов и приготовления суспензии для полуавтоматических приборов и автоматического прибора Galileo.

Реагент Galileo Diluent используется во всех случаях, когда необходимо приготовить суспензию эритроцитов для проведения реакции с сывороткой.

Принцип

При проведении реакций гемагглютинации в лунки микропланшеты вносится суспензия эритроцитов и сыворотка. Далее микропланшета центрифугируется, затем встряхивается для ресуспендирования эритроцитов в лунках с отрицательным результатом реакции.

Реагент Galileo Diluent является изотонической средой для ресуспендирования эритроцитов и позволяет их ресуспендировать в случае отрицательного результата реакции.

Реагент

Реагент Galileo Diluent представляет собой изотонический раствор, содержащий метилцеллюлозу и азид натрия 0,1%.

Невыкрытые флаконы реагента могут храниться при комнатной температуре (20-25°C). Вскрытые флаконы должны храниться при температуре 2-8°C и быть использованы в течение 4-х недель.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения. После вскрытия хранить при температуре 2-8°C. Не использовать после истечения срока годности. После вскрытия флакона использовать его в течение 4-х недель.

При помутнении выбрасывать.

Не использовать реагент в случае помутнения или изменения окраски.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидов натрия с водопроводными трубами.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Взятие образцов для исследования

Для автоматических или полуавтоматических методик может использоваться только кровь, заготовленная на ЭДТА. Не следует использовать образцы крови, взятой в сухие пробирки, поскольку сгустки могут блокировать дозирующие зонды прибора.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент Galileo Diluent, готовый к использованию.

Дополнительные материалы

Для всех мануальных методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Полуавтоматический прибор или прибор Galileo.
3. Микропланшеты для определения группы крови на приборе Galileo.
4. Сыворотка Galileo в зависимости от вида предполагаемого исследования.

Проведение исследования (на приборе Galileo)

Все образцы и реагенты должны иметь температуру 18-30°C.

Перенести реагент Galileo Diluent в чистую емкость для раствора, имеющую соответствующий штрих-код.

Для загрузки материалов и реагентов в прибор и проведения исследования пользуйтесь соответствующей инструкцией для оператора прибора.

Контроль качества

При проведении исследований на полуавтоматических и автоматических приборах контроль качества должен проводиться ежедневно для подтверждения пригодности реагентов для проведения исследований.

Интерпретация результатов

См. инструкции к использованию сывороток.

Примечание: Прибор Galileo производит интерпретацию результатов автоматически.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации реагента. Кроме того, ошибочные результаты могут быть получены при несоблюдении правил проведения исследований.

Характеристики реагентов

Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002



0088

Run Control for Daily QC

Набор реагентов для ежедневного контроля качества



CorQC™ EXTEND Complete
CorQC™ EXTEND 1, 2 и 3
CorQC™ EXTEND Standard

Назначение: Набор CorQC™ EXTEND предназначен для проведения рутинного контроля качества при определении антигенов систем Rh и Kell.

Общая информация

Сыворотки и эритроциты для определения групп крови тщательно тестируются производителем для того, чтобы убедиться, что их чувствительность и специфичность соответствуют стандартам FDA. Однако в дальнейшем качество реагентов может снижаться вследствие неадекватных условий транспортировки и хранения или вследствие микробной или химической контаминации. Это может приводить к снижению активности реагентов, т.е. к снижению их способности вступать в реакцию антиген-антитело и тем самым снижать эффективность исследования. Поэтому персонал лабораторий должен ежедневно убеждаться в пригодности реагентов для дальнейшего исследования (1-3). Реагенты CorQC™ EXTEND предназначены для рутинного контроля качества реагентов для определения антигенов эритроцитов (например, anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e, anti-K, anti-CDE и соответствующих контрольных материалов), используемых в автоматических и мануальных методиках.

Принцип

Каждый флакон реагента CorQC™ EXTEND содержит суспензию эритроцитов человека определенного Rh- и Kell-фенотипа. Отобранные комбинации эритроцитов CorQC™ EXTEND тестируются с соответствующими реагентами для фенотипирования эритроцитов (anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e, anti-K, anti-CDE и соответствующие контрольные материалы) в автоматических и мануальных методиках.

Если при постановке реакции проверяемых реагентов с реагентом CorQC™ EXTEND получается соответствующая комбинация положительных и отрицательных результатов, реагенты признаются пригодными для дальнейшего использования. Получение результата иного, чем ожидаемый, означает непригодность проверяемого реагента для дальнейшего использования вследствие снижения его активности или контаминации, техническую ошибку при проведении исследования или дефект работы прибора.

Реагент

Каждый флакон реагента CorQC™ EXTEND содержит 2-4% суспензию эритроцитов группы O, взятые от одного донора, суспензированные в (например, содержащем аденозин и аденин для предотвращения гемолиза и снижения экспрессии антигенов на протяжении срока годности. В качестве консервантов используются хлорамфеникол (0,25 мг/мл), гентамицина сульфат (0,1 мг/мл) и неомицина сульфат (0,05 мг/мл).

Реагент CorQC™ EXTEND выпускается в трех форматах:

CorQC™ EXTEND Complete: набор из 5 флаконов – Стандарт, 1, 2, 3 и 4.
CorQC™ EXTEND 1, 2 и 3: набор из трех флаконов – 1, 2 и 3.
CorQC™ EXTEND Standard: 1 флакон Стандарт

Каждый флакон реагента CorQC™ EXTEND содержит эритроциты определенного фенотипа и предназначен для тестирования определенных реагентов в мануальных или автоматических методиках.

EXTEND Standard: фенотип O,CCD_{ee}, предназначен для тестирования реагентов anti-D в реакции агглютинации (и автоматической методике определения слабого варианта антигена), а также специфичности реагента anti-c.

EXTEND 1: фенотип O, Ccd_{dee}, K-, применяется для проверки активности реагента anti-C, anti-c, а также активности комплекса anti-CDE против антигена C. Также используется для проверки специфичности реагента anti-K.

EXTEND 2: фенотип O, ccd_{dEe}, K-, используется для проверки активности реагентов anti-E, anti-e, а также активности комплекса anti-CDE против антигена E.

EXTEND 3: фенотип O, ccd_{dee}, K+, используется для проверки активности реагента anti-K, а также для проверки специфичности реагентов anti-D, anti-C, anti-E, anti-CDE и соответствующих контрольных материалов.

EXTEND 4: фенотип O, ccD_{EE}, используется для проверки специфичности реагента anti-E.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.

В промежутках между использованием хранить реагенты при температуре 1-10°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур. Во время использования избегать контаминации реагента. Контаминация может отрицательно сказаться на активности реагента и на сроке его службы. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты из негерметичных флаконов. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной маркировкой. Не использовать реагенты в случаях потемнения эритроцитов, образования сгустков или при наличии значительного гемолиза. По мере хранения реагентов может иметь место легкий гемолиз.

Перед использованием ресуспензируйте эритроциты, аккуратно перевернув флакон несколько раз. Для перемешивания эритроцитов в автоматических приборах используются специальные магниты. Если магнит не добавлен, эритроциты в приборе не будут перемешиваться и полученные результаты могут быть некорректными. Не прикасайтесь к магнитам. Магниты должны добавляться во флаконы с эритроцитами с помощью специального диспенсора. При прикосновении к магнитам возможна контаминация реагентов.

Со всеми реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированными и утилизировать их соответствующим образом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность. Упаковка реагентов содержит резиновую грушу.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Процедура проведения исследования

Состав упаковки

Реагент эритроцитов CorQC™ EXTEND во флаконах с пипетками, готовые к использованию.

Дополнительные материалы для автоматического метода исследования

См. соответствующие инструкции для оператора.

Дополнительные материалы для мануального метода исследования

1. Фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), изотонический, pH 6,5-7,5
2. Центрифуга* серологическая
3. Маркер
4. Пипетка
5. Пробирки 10x75 мм или 12x75 мм или штатив пробирок
6. Реагенты anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e, anti-K, anti-CDE и соответствующие контрольные материалы.

* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.

Проведение исследования

Автоматический метод исследования

Для проведения исследований в микропланшетах на автоматическом приборе см. соответствующие инструкции для оператора автоматического прибора.

Мануальный метод

Примечание: Следует использовать метод исследования, рекомендованный производителем для данного реагента. Описанный ниже метод

предназначен для использования в сочетании с информацией производителя реагентов (например, объем реагента или время реакции).

1. Перед началом исследования осмотрите реагенты. Убедитесь в отсутствии признаков контаминации (выраженного помутнения сывороток или гемолиза эритроцитов). Согретьте реагенты до комнатной температуры. Отметьте номера серий и сроки годности проверяемых реагентов.
2. Промаркируйте по две пробирки для каждого проверяемого реагента. Пробирки могут быть промаркированы, как указано в приведенной таблице.

Номер пробирки	Реагент
1	Anti-C
2	Anti-c
3	Anti-E
4	Anti-e
5	Anti-CDE
6	Anti-CDE
7	Anti-K
8	Anti-k

Номер пробирки	Реагент
9	Anti-c
10	Anti-E
11	Anti-e
12	Anti-CDE
13	Anti-K
14	Anti-D
15	Anti-D
16	Rh-контрольный материал

Если какие-либо из перечисленных реагентов не используются, соответствующие пробирки можно из исследования исключить. Если используется несколько однородных реагентов, можно соответствующие пробирки добавить. Если используется один источник сывороток, дальнейшая процедура выглядит следующим образом:

3. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 1 в пробирку 1.
4. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 1 в пробирку 2.
5. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 2 в пробирку 3.
6. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 2 в пробирку 4.
7. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 1 в пробирку 5.
8. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 1 в пробирку 6.
9. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 3 в пробирку 7.
10. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 3 в пробирку 8.
11. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND Standard в пробирку 9.
12. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 3 в пробирку 10.
13. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 4 в пробирку 11.
14. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 3 в пробирку 12.
15. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 1 в пробирку 13.
16. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND Standard в пробирку 14.
17. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 3 в пробирку 15.
18. Добавить 1 каплю реагента corQC™ EXTEND 3 в пробирку 16.
19. Добавить рекомендованный объем проверяемых реагентов в соответствующие пробирки.
20. Хорошо перемешать содержимое пробирок.
21. Инкубировать пробирки при рекомендованной температуре в течение рекомендованного времени.
22. Если рекомендовано производителем реагентов, провести антиглобулиновый тест.
23. Центрифугировать пробирки и тотчас после центрифугирования аккуратно ресуспензировать осадок.**
24. Читать и фиксировать полученные результаты.

** Предлагаемое время центрифугирования – 15-30 секунд при 900-1000G или режим, рекомендованный для данной центрифуги, обеспечивающий оптимальную реакцию антиген-антитело и при этом позволяющий легко ресуспензировать осадок эритроцитов в случае отрицательной реакции.

Стабильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после встряхивания планшеты после центрифугирования. В противном случае возможна ошибочная интерпретация результатов как вследствие диссоциации агглютинатов, так и вследствие повторного оседания эритроцитов.

Автоматические приборы проводят чтение и интерпретацию результатов автоматически.

Интерпретация результатов

Автоматический метод

Для ознакомления с интерпретацией результатов автоматическими приборами см. соответствующие инструкции для оператора прибора.

Мануальный метод

Ожидаемые результаты исследования представлены в таблице (ниже). Полученные при исследовании результаты должны быть аналогичны представленным в таблице. Сила реакции должна быть сопоставимой с приведенной в таблице и не должна меняться в зависимости от серии реагентов или контрольных эритроцитов. Если результат значительно отличается от ожидаемого или сила реакции значительно изменяется от исследования к исследованию, это может говорить о том, что состояние реагентов или техническое исполнение методики не соответствует требованиям. Значительное снижение силы реакции требует изучения, поскольку может говорить о потере активности реагента или неправильной работе прибора.

Пробирка №	Реагент	Реагент corQC™ EXTEND	Ожидаемый результат	Тест подтверждает
1	Anti-C	1	2-4+	Активность Anti-C
2	Anti-c	1	2-4+	Активность Anti-c
3	Anti-E	2	2-4+	Активность Anti-E
4	Anti-e	2	2-4+	Активность Anti-e
5	Anti-CDE	1	2-4+	Активность компонента Anti-C
6	Anti-CDE	2	2-4+	Активность компонента Anti-E
7	Anti-K	3	2-4+	Активность Anti-K
8	Anti-C	3	Отрицательный	Специфичность Anti-C
9	Anti-c	Standard	Отрицательный	Специфичность Anti-c
10	Anti-E	3	Отрицательный	Специфичность Anti-E
11	Anti-e	4	Отрицательный	Специфичность Anti-e
12	Anti-CDE	3	Отрицательный	Специфичность компонентов Anti-C и Anti-E
13	Anti-K	1	Отрицательный	Специфичность Anti-K
14	Anti-D	Standard	2-4+	Активность Anti-D
15	Anti-D	3	Отрицательный	Специфичность Anti-D
16	Rh-контроль	3	Отрицательный	Специфичность Rh-контроля

Ограничения

Тесты контроля качества не дают абсолютной гарантии, что в процессе работы с реагентами не будут получены неправильные результаты. Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут быть получены при бактериальной или химической контаминации материалов. При мануальном методе исследований ошибки могут быть связаны с неправильной температурой или длительностью инкубации, неправильным режимом центрифугирования, неправильным хранением реагентов или потерей ими активности.

Реагенты corQC™ EXTEND предназначены для определения активности рутинно используемых реагентов для фенотипирования эритроцитов. Реагенты не предназначены для диагностики in vitro (с образцами донора или реципиента), если они не включены в протокол работы автоматического прибора.

При мануальном методе недопустимо использование реагентов, которые в контрольном исследовании показали силу реакции более слабую по сравнению с ожидаемой. Возможными причинами этого явления могут быть снижение активности реагента, неоптимальная работа оборудования (например, центрифуги или отмывателя) или недостаточная подготовка лабораторного персонала. Реже к таким результатам приводят нарушения собственно контрольных реагентов. При получении результатов, не соответствующим ожидаемым, исследование необходимо повторить.

Повторное получение такого результата является поводом для серьезного изучения причин данного явления.

Активность реагента corQC™ EXTEND может снижаться после окончания срока его годности.

Характеристики реагентов

Каждая серия реагента corQC™ EXTEND перед выпуском в продажу тестируется с реагентами, лицензированными FDA и полученными из двух и более источников для подтверждения работоспособности реагента. Все эритроциты отрицательны в прямом тесте Кумбса. При правильном хранении и использовании эритроциты сохраняют антигены, указанные в сопроводительном паспорте. Активность продукта зависит от правильности его применения.

За дополнительной информацией обращайтесь в Техническую службу 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Библиография

1. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
2. Taswell HF. Error production and its control, In: A seminar of performance evaluation. Washington DC: American Association of Blood Banks, 1976: 115-120
3. CLIA Reagent Quality requirements clarified. Newsbriefs, Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1993;14(3):1

CE
0088

Реагент Capture-R® Select

Твердофазная система для иммобилизации эритроцитов человека



Назначение: реагент Capture-R® Select представляет собой модифицированные микропланшеты для иммобилизации эритроцитов человека для последующего использования в твердофазных исследованиях, имеющих целью выявление антиэритроцитарных антител IgG или антигенов эритроцитов (скрининг и последующая идентификация с панелью эритроцитов, тесты на совместимость или фенотипирование антигенов).

Общая информация

Многие антиэритроцитарные антитела класса IgG связываются с эритроцитами, но не вызывают агглютинации. Выявление таких антител возможно с помощью антиглобулинового реагента или реагента Capture-R® Select для обнаружения антител в твердофазной методике. Реагент Capture-R® Select разработан для облегчения выявления антиэритроцитарных антител в исследуемой плазме или сыворотке, а также для типирования эритроцитов известными сыворотками. Образцы эритроцитов, иммобилизованные на поверхности лунок, инкубируются с сывороткой, известной или типизирующей реагентом при условиях, максимально облегчающих протекание реакции антиген-антитело. Методика Capture-R® Select может быть применима для скрининга и идентификации антител, постановки тестов на совместимость или фенотипирования эритроцитов.

Принцип

Методика Capture-R® Select основана на работах Plapp et al., (1) и Juli et al. (2). Вначале эритроциты иммобилизируются на поверхности лунок полистироновых микропланшетов, образуя подложку. Антигены иммобилизованных эритроцитов используются для фиксации антител IgG. После инкубации лунки промываются, оставшиеся несвязанными иммуноглобулины удаляются, затем добавляются индикаторные эритроциты. При центрифугировании индикаторные эритроциты соединяются с антителами, фиксированными на иммобилизованных эритроцитах. Таким образом, в случае положительной реакции образуются комплексы IgG - anti-IgG, посредством которых индикаторные эритроциты фиксируются к подложке. Вследствие этого индикаторные эритроциты покрывают поверхность лунок вторым клеточным слоем. При отрицательной реакции – отсутствии антител – индикаторные эритроциты не фиксируются к подложке. В этом случае при центрифугировании индикаторные эритроциты образуют компактный осадок в виде «пуговицы» на дне лунки.

При скрининге или идентификации антител подложка для микропланшетов формируется из стандартных эритроцитов, в дальнейшем к ним добавляется исследуемая сыворотка пациента. По характеру распределения положительных и отрицательных результатов делается заключение о специфичности выявленных антител (см. Capture-R® Ready-ID).

При проведении теста на совместимость в качестве подложки используются эритроциты донора. К ним добавляется сыворотка (или плазма) пациента. Положительный результат означает наличие в сыворотке реципиента антител к антигенам эритроцитов донора. Отрицательный результат говорит об отсутствии таких антител.

При фенотипировании эритроцитов исследуемые эритроциты иммобилизируются на поверхности лунок планшеты. К ним добавляются для инкубации фенотирующие сыворотки в параллели с аутоконтролем. Положительный результат означает наличие соответствующего антигена на эритроцитах (при отрицательном аутоконтроле). Если аутоконтроль положителен, результаты исследования недостоверны. Отрицательный результат исследования означает отсутствие на эритроцитах соответствующего антигена.

Реагенты

Реагент Capture-R® Select: стрипы с лунками, покрытыми аффинно выделенными антителами козла против антигенов морской свинки и антителами против антигенов эритроцитов, предназначенные для иммобилизации эритроцитов. Упаковка включает двенадцать 1x8 стрипов

и рамку, в фольге, с осушителем и индикатором влажности. Каждая планшета или стрип готова к использованию. Стрипы Capture-R® Select упакованы во влагонепроницаемую фольгу. Хранить при температуре 1-30°C. Стрипы могут быть использованы все сразу или по очереди. Неиспользованные стрипы необходимо сразу завернуть в упаковку вместе с осушителем и индикатором влажности, поскольку влажность может повредить покрытие лунок стрипов. Изменение цвета индикатора влажности с голубого на розовый говорит о наличии избыточной влажности, в этом случае стрипы использовать нельзя. После того, как стрипы вынуты из упаковки, они должны быть использованы в течение 16 часов.

Дополнительные реагенты для проведения исследования (поставляются отдельно):

1. Capture LISS
2. Capture-R готовые индикаторные эритроциты
3. Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая)
4. Capture-R отрицательная контрольная сыворотка

ПРИМЕЧАНИЕ: Перечисленные дополнительные реагенты (Capture-R готовые индикаторные эритроциты, Capture-R контрольная сыворотка, Capture LISS) могут быть использованы также с реагентами других лотов при условии, что они имеют подходящий срок годности.

Предупреждения

1. Реагент предназначен только для диагностики in vitro.
2. Перед началом работы все реагенты должны быть согреты до 18-30°C. Пренебрежение этим правилом может приводить к получению неправильных результатов.
3. Capture-R готовые индикаторные эритроциты перед использованием должны быть аккуратно ресуспендированы, для этого надо несколько раз перевернуть флакон. В процессе хранения при 1-10°C происходит легкая агрегация эритроцитов, что не является признаком их негодности.
4. Реагент не должен использоваться, если эритроциты потемнели, приобрели коричневый цвет, если появился выраженный гемолиз, если эритроциты не дают четкой реакции в положительном и отрицательном контроле. По мере хранения реагента может появляться легкий гемолиз.
5. Помутнение реагентов Capture LISS и Capture-R Control может говорить об их микробной контаминации. Реагенты с признаками контаминации использовать не следует.
6. Не использовать реагент после истечения срока годности. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью.
7. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.
8. С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.
9. Эритроциты с признаками выраженного гемолиза подлежат утилизации.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Взятие образцов для исследования

Плазма или сыворотка: взять образец крови из вены путем стандартной венопункции. Для проведения исследования может использоваться свежая сыворотка или плазма (заготовленная на ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D). Все исследования рекомендуется проводить как можно скорее после заготовки образцов во избежание ложноположительных или ложноотрицательных реакций, возникающих вследствие неправильного хранения образцов или их контаминации. Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 1-10°C. Образцы плазмы или сыворотки, отделенные от эритроцитов, могут также храниться в замороженном виде. Образцы, хранившиеся при комнатной температуре в течение нескольких дней, могут представлять затруднение для определения слабых антител, равно как и образцы, длительное время хранившиеся при температуре 1-10°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Примечание: Образцы эритроцитов, имеющие явления гемолиза – от слабых до умеренных – перед приготовлением подложки следует отмыть. Образцы, имеющие выраженные явления гемолиза, использовать для приготовления подложки не следует.

Эритроциты донора/пациента:

Выделить эритроциты из образцов, взятых на антикоагулянт (ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D). Образцы, которые не планируется исследовать в течение ближайших 24 часов, следует как можно быстрее поместить на хранение при 1-10°C. Наилучшие результаты могут быть получены при использовании эритроцитов, которые при заготовке на ЭДТА хранились не более 14 дней, при заготовке на ACD, CPD, CPD-A или CP2D – не более 35 дней. Если для заготовки образца использовался другой антикоагулянт, эритроциты могут быть использованы для приготовления подложки в сроки, указанные в инструкции к данному антикоагулянту. Хранение эритроцитов до использования в течение более длительного срока может привести к получению неправильного результата исследования.

Сыворотки для фенотипирования эритроцитов:

Для фенотипирования эритроцитов может использоваться плазма, сыворотка или готовый реагент, содержащий IgG против соответствующего антигена. Ответственность за определение пригодности сыворотки для проведения исследования с реагентом Capture-R Select лежит на пользователе. Пользователь должен проверять чувствительность и специфичность сывороток для подтверждения их пригодности для проведения исследований.

Процедура проведения исследования

Состав упаковки

Микропланшеты Capture-R Select в упаковке из фольги.

Дополнительные реагенты, поставляемые отдельно от реагента Capture-R Select

1. Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками
2. Реагент Capture-R готовые индикаторные эритроциты во флаконах с пипетками
3. Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая) во флаконах с пипетками
4. Capture-R отрицательная контрольная сыворотка во флаконах с пипетками

Дополнительные материалы

Для всех методик

1. Плазма донора или реципиента (или сыворотка для мануальных тестов) или фенотипирующие сыворотки (содержащие IgG).
2. Эритроциты донора или реципиента или стандартные эритроциты.

Для мануального или полуавтоматического метода исследования

1. Пипетки или распыляющие системы
2. Центрифуга* с ротором, адаптированным для стрипов 1 x 8 лунок
3. Нагревательный блок или сухой инкубатор 37°C
4. Фосфатно-солевой изотонический буфер (примерно 15mM), pH 6,5-7,5
5. Устройство для отмывания или мануальный диспенсор для подачи физиологического раствора
6. Многоканальный диспенсор или пипетка, предназначенная для работы с микропланшетами
7. Дополнительные стрипы для балансировки центрифуги
8. Таймер
9. Поверхность с подсветкой
10. Маркер

* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.

Для автоматического метода исследования

См. соответствующие инструкции для оператора автоматического прибора.

Методика исследования:

Автоматический метод

См. соответствующие инструкции для оператора автоматического прибора.

Мануальный или полуавтоматический метод

1. К моменту начала исследования все реагенты Capture и образцы должны иметь температуру 18-30°C
2. Вскрыть упаковку стрипа Capture-R® Select. Проверить состояние индикатора влажности. Если индикатор показывает наличие повышенной влажности стрипы из этой упаковки использовать нельзя. Если влажность не повышена, неиспользованные стрипы положить обратно в упаковку вместе с осушителем и индикатором влажности и тщательно завернуть.
3. Проверить маркировку на обратной стороне стрипа. НЕ использовать стрипы с нечитаемой маркировкой названия теста и номера серии.
4. Поместить стрип в рамку. Внимание: стрип может быть установлен в рамку только в правильном положении.
5. Внести по 2 капли (100±10мкл) фосфатно-солевого буфера в лунки.
6. Подложка может быть приготовлена из цельной крови либо из 2-4% суспензии эритроцитов.
- А. Для цельной крови (не центрифугированной): внести по 10-20 мкл цельной крови в лунку.
- В. Для готовых стандартных эритроцитов или разведенной цельной крови (2-4%): Внести 1 каплю (50±5 мкл) в лунку.

Примечание: Эритроциты должны быть без явлений гемолиза. Фрагментированные мембраны эритроцитов могут отрицательно повлиять на формирование подложки. Если образец эритроцитов имеет умеренные признаки гемолиза (от 1+ до 2+), образец следует отмыть минимум два раза фосфатно-солевым буфером и затем приготовить суспензию в фосфатно-солевом буфере. Образцы, имеющие выраженные явления гемолиза (3+ и более), использовать для приготовления подложки не следует.

7. Добавить образец в указанном объеме в две лунки стрипа. Эти лунки будут служить положительным и отрицательным контролем.
 8. Если протоколом исследования предусмотрен аутоконтроль, внесите соответствующее количество эритроцитов в дополнительную лунку. Если проводится фенотипирование, внесите в лунки два дополнительных образца эритроцитов, один из которых имеет антиген, соответствующий антителам анти-сыворотки, другой данного антигена не имеет. Они будут служить контролем анти-сыворотки.
 9. Встряхнуть планшету, чтобы в лунках образовалась суспензия эритроцитов.
 10. Центрифугировать планшету в течение 5 минут при 190-450G.
- ПРИМЕЧАНИЕ:** Если в подложке есть участки, не закрытые эритроцитами, это говорит о том, что для ее приготовления было взято недостаточное количество эритроцитов. Отсутствие «пуговицы» после центрифугирования говорит о нарушениях при разведении образца эритроцитов или при внесении его в лунки. Если после центрифугирования «пуговица» не образуется, стрип подлежит утилизации. Повторно разведите образец эритроцитов и приготовьте подложку на новом стрипе. Если после центрифугирования «пуговица» вновь не появилась, прервите выполнение теста. Если «пуговица» появилась, продолжите выполнение теста.
11. Осторожно встряхните планшету для удаления несвязанных эритроцитов.
 12. Удалите остатки несвязанных эритроцитов путем отмывания следующим образом:

Примечание: Наличие отверстий в подложке говорит о неадекватном отмывании микропланшеты или о гемолизе эритроцитов. Такой стрип подлежит утилизации. Если отверстия вновь появляются, прервите проведение исследования. Если отверстий нет, продолжите выполнение теста.

Мануальная методика отмывки

А. Переверните планшету, чтобы вылить из нее жидкость в раковину или в контейнер для отходов и быстрыми движениями встряхните остатки жидкости из лунок.

В. Заполните лунки изотоническим раствором при помощи многоканального диспенсора или коллектора для промывки планшет. Можно также залить раствор непосредственно из флакона. Раствор не должен вноситься в лунки с чрезмерным усилием, чтобы не повредить подложку. Промойте лунки раствором не менее 6 раз. Удалите жидкость из лунок, как указано в пункте А.

С. После каждой промывки проверяйте сохранность подложки в лунках. Правильно сформированная подложка дает равномерное красноватое окрашивание лунок без признаков скопления

эритроцитов. Скопление эритроцитов может говорить о том, что не все несвязанные эритроциты удалены. В этом случае следует продолжать отмывание до полного удаления несвязанных эритроцитов.

Предупреждение: Чрезмерно интенсивное отмывание может привести к появлению отверстий в подложке. Это, в свою очередь, может приводить к получению ложноположительных результатов.

Полуавтоматическая методики отмывки

Для отмывки планшет с использованием полуавтоматического оборудования см. соответствующие инструкции для оператора.

Примечание: Оборудование должно быть отрегулировано таким образом, чтобы после аспирации жидкости в лунках оставалось по 4-8 мкл жидкости. Жидкость из лунок не должна аспирироваться полностью.

13а. Скрининг антител с панелью стандартных эритроцитов, проведение тестов на совместимость:

1. Незамедительно внесите по 2 капли (100 ± 5 мкл) реагента Capture LISS в каждую лунку.
2. Добавить по 1 капле (50 ± 5 мкл) исследуемой сыворотки в каждую лунку стрипа. **Примечание:** При добавлении сыворотки или плазмы цвет реагента Capture LISS изменится с фиолетового на голубой или бирюзовый. Отсутствие изменения цвета может говорить о том, что сыворотка не была добавлена в данную лунку.
3. Добавить 1 каплю (50 ± 5 мкл) реагента Capture-R положительный контроль (слабый) в лунку для положительного контроля.
4. Добавить 1 каплю (50 ± 5 мкл) реагента Capture-R отрицательный контроль в лунку для отрицательного контроля. **Примечание:** В состав тестов, проводимых в каждой рамке, должен включаться как минимум один образец положительного и отрицательного контроля для подтверждения правильности режимов центрифугирования и промывания.

13б. Фенотипирование эритроцитов

1. Незамедительно внесите по 2 капли (100 ± 5 мкл) реагента Capture LISS в каждую лунку.
 2. Добавить по 1 капле анти-сыворотки (50 ± 5 мкл) во все лунки для фенотипирования. **Примечание:** При добавлении сыворотки или плазмы цвет реагента Capture LISS изменится с фиолетового на голубой или бирюзовый. Отсутствие изменения цвета может говорить о том, что сыворотка не была добавлена в данную лунку. Однако некоторые коммерческие анти-сыворотки могут не приводить к изменению цвета реагента.
 3. Если проводится аутоконтроль, добавить 1 каплю сыворотки (50 ± 5 мкл) также в лунку для аутоконтроля.
 4. Добавить 1 каплю (50 ± 5 мкл) реагента Capture-R положительный контроль (слабый) в лунку для положительного контроля.
 5. Добавить 1 каплю (50 ± 5 мкл) реагента Capture-R отрицательный контроль в лунку для отрицательного контроля. **Примечание:** В состав тестов, проводимых в каждой рамке, должен включаться как минимум один образец положительного и отрицательного контроля для подтверждения правильности режимов центрифугирования и промывания.
 6. Добавить по 1 капле анти-сыворотки в лунки контроля анти-сыворотки.
14. Инкубировать стрипы при температуре $36-38^\circ\text{C}$ в течение 15-60 минут. Если используется сухой инкубатор, прибавить 5 минут инкубации.
 15. Отмыть смесь сыворотки и LISS с помощью мануальной методики или полуавтоматического оборудования, как описано в пункте 12.
 16. Добавить в каждую лунку по 1 капле (50 ± 5 мкл) Capture-R индикаторных эритроцитов.
 17. Незамедительно центрифугировать стрипы в течение 2 минут при 61000G.
 18. Поместить стрип на поверхность с подсветкой и оценить адгезию индикаторных эритроцитов. Для признания результатов

исследования достоверными в контрольных лунках должна иметь место приведенная ниже картина.

Контрольные исследования

Если результаты исследования в контрольных лунках отличаются от ожидаемых, результаты исследования считаются недостоверными и исследование следует повторить.

- Положительный контроль (слабый) = адгезия индикаторных эритроцитов по всей поверхности или ее части.
- Отрицательный контроль = Индикаторные эритроциты образуют компактный осадок в виде «пуговицы» на дне лунки, адгезия отсутствует.
- Положительный контроль анти-сыворотки = адгезия индикаторных эритроцитов по всей поверхности или ее части.
- Отрицательный контроль анти-сыворотки = Индикаторные эритроциты образуют компактный осадок в виде «пуговицы» на дне лунки, адгезия отсутствует.
- Отрицательный аутоконтроль = Индикаторные эритроциты образуют компактный осадок в виде «пуговицы» на дне лунки, адгезия отсутствует.

* Время и интенсивность центрифугирования G для получения оптимальной адгезии эритроцитов приведены ориентировочно. Режим центрифугирования должен быть определен применительно к конкретной используемой центрифуге.

Стабильность реакции

Результаты исследования, как мануального, так и полуавтоматического, должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре $1-10^\circ\text{C}$. При этих условиях можно производить повторную мануальную оценку результата в течение 2 дней.

Автоматические приборы производят чтение и интерпретацию результатов тотчас после окончания исследования.

Контроль качества

Мануальный или полуавтоматический метод: Ежедневный контроль качества компонентов Capture-R Select должен осуществляться путем включения в исследование реагентов Capture-R положительная и Capture-R отрицательная контрольная сыворотка. Эти сыворотки должны включаться в каждый стрип для подтверждения качества реагентов и отсутствия технических ошибок. Повторное получение неправильных результатов с контрольными реагентами означает либо снижение чувствительности какого-либо из компонентов исследования, либо наличие постоянной технической ошибки при проведении исследования.

Фенотирующие антисыворотки: Ежедневный контроль состояния сывороток включает определение их чувствительности и специфичности. Контроль качества включает в себя проведение исследования с образцами эритроцитов, имеющими соответствующий антиген и не имеющими его. Сыворотку можно использовать для проведения исследований только в том случае, если с обоими образцами она показала правильные результаты.

Автоматический метод исследования: См. соответствующие инструкции для оператора автоматического прибора.

Интерпретация результатов

Отрицательная реакция: Индикаторные эритроциты Capture-R Ready-Screen образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы», адгезия за пределами осадка отсутствует.

Положительная реакция: Наблюдается адгезия индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen по всей поверхности дна лунки.

Информацию об интерпретации результатов автоматическими приборами см. в соответствующих инструкциях для операторов приборов.

Ограничения

Данная информация не имеет отношения к ABS2000.

1. Проведение теста на совместимость с реагентом Capture-R Select имеет целью только выявление у реципиента IgG против эритроцитов донора. Данное исследование НЕ предназначено для выявления IgM, например, в случае АВО-несовместимости. Если требуется определение IgM, следует провести спин-тест. Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или промывания или повреждении отдельных компонентов теста.

2. При чрезмерно интенсивном центрифугировании после добавления индикаторных эритроцитов может произойти повреждение подложки, что, как следствие, приведет к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов.
3. Параметры торможения центрифуги также могут влиять на получаемые результаты. Недостаточное торможение и большое время остановки центрифуги может приводить к получению ложноотрицательных результатов. Чрезмерное интенсивное торможение и слишком короткое время остановки может также искажать результаты исследования. Ответственность за регулировку параметров центрифуги перед проведением исследования (время и скорость центрифугирования, интенсивность разгона и торможения) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.
4. Внесение в лунки индикаторных эритроцитов в избыточном количестве может приводить к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов. Внесение в лунки индикаторных эритроцитов в недостаточном количестве (что может произойти вследствие недостаточного перемешивания эритроцитов или их частичного гемолиза) может приводить к получению слабых ложноположительных результатов. Использование индикаторных эритроцитов, которые имеют к моменту проведения исследования температуру ниже 18°C, может также приводить к получению слабых ложноположительных результатов.
5. Образцы сыворотки или плазмы, полученные из пробирок, содержащих разделительный гель, при скрининге антител могут давать ложноположительные результаты. Пробирки, содержащие разделительный гель, не предназначены для использования в банках крови.
6. Некоторые исследуемые образцы могут содержать гетерофильные антитела. Образцы с высокими титрами гетерофильных антител могут давать нетипичные положительные реакции.
7. Коммерческие анти-сыворотки и антитела, не предназначенные для исследований в пробирках, могут давать неожиданные ложноположительные и ложноотрицательные результаты.
8. Эритроциты, положительные в прямом антиглобулиновом тесте, в тесте Capture-R Select будут давать положительный результат. Для валидации положительного результата необходимо проведение аутоконтроля.
9. Контаминация индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen сывороткой, содержащей IgG или плазменные протеины, приводит к нейтрализации содержащегося в индикаторных эритроцитах компонента анти-IgG и, как следствие, к ложноотрицательным результатам. Получение отрицательного результата при постановке положительного контроля говорит о такой нейтрализации индикаторных эритроцитов при проведении мануального или полуавтоматического исследования.
10. Некоторые варианты антител, представленные изолированными субклассами IgG, могут не взаимодействовать с индикаторными эритроцитами. Следует иметь в виду, однако, что антитела субкласса IgG4 в изолированном виде встречается крайне редко.
11. Такие антитела, как анти-M, -P1, -Le^a, Le^b обычно лучше выявляются в пробирочных тестах при комнатной температуре, чем в антиглобулиновом тесте при 37°C. Некоторые авторы уместно отмечают причину этого в том, что данные антитела обычно представлены IgM, реагирующими в солевых растворах. Некоторые из этих антител могут быть выявлены в тесте Capture-R Ready-Screen несмотря на то, что данный тест предназначен для выявления IgG, поскольку содержит анти-IgG компоненты. Антитела, не являющиеся IgG, могут выявляться потому, что индикаторные эритроциты имеют антигены, с которыми данные IgM могут непосредственно связываться. Некоторые IgM могут одновременно связываться с антигенами индикаторных эритроцитов и подложки и тем самым фиксировать индикаторные эритроциты к подложке. Поэтому факт обнаружения антител (анти-M, -Le^a, -Le^b, -P1) не обязательно говорит о принадлежности выявленных антител к классу IgG. Большинство авторов считает, что антитела указанных специфичностей не имеют клинического значения и, если эти антитела выявляются в тесте Capture-R Ready-Screen, то это не говорит об их клинической значимости. В то же время в

данном тесте могут не выявляться IgM, имеющие клиническое значение (например, анти-K или анти-E).

12. Некоторые IgG слабо взаимодействуют с антигенами подложки в твердофазном тесте. К ним относятся Bg^a, Bg^b, Kp^a, Cs^a, Yk^a, JMN, McC^a, Ch и Rg.^{7,8}
13. Раствор низкой ионной силы (LISS) обычно способствует усилению взаимодействия антиэритроцитарных антител с антигенами. Однако встречаются антитела, для выявления которых присутствие LISS не является оптимальным.
14. Эритроциты плохо адгезируются к поверхности планшеты Capture-R в следующих случаях:
 - Суспензия эритроцитов контаминирована свободным гемоглобином
 - Срок годности эритроцитов прошел.
 Во многих случаях адгезию эритроцитов можно улучшить если отмыть их 1-2 раза изотоническим раствором.
15. В случае, если исследуемый образец содержит антитела в концентрации ниже порога определения, тест покажет отрицательный результат.⁸
16. Ни один метод исследования не способен обеспечить выявление всех возможных антител.
17. Некорректные результаты могут быть получены также в случаях, когда лабораторный персонал не прошел должного обучения работе с методикой Capture-R Ready-Screen. Лаборатории, в которых данная методика вводится в употребление, должны иметь специальные программы обучения персонала. До того, как переходить на скрининг антител исключительно методом Capture-R Ready-Screen следует, обучив предварительно персонал, некоторое время применять эту методику параллельно с методиками, которые постоянно применялись в лаборатории ранее (используя большое количество известных положительных и отрицательных образцов) для того, чтобы убедиться в достоверности получаемых результатов.

Характеристики реагентов

Реагент Capture-R Select оценивался в параллели с модифицированным методом Capture-R и мануальными методами гемагглютинации. Результаты исследования показали, что тест Capture-R Select при выявлении известных IgG имеет чувствительность и специфичность, аналогичную референтным методикам.

Перед выпуском в продажу все партии реагента тестируются со стандартными эритроцитами и референтными сыворотками, содержащими известные антитела IgG, а также не содержащими антител. Качество реагента оценивается применительно к приведенной методике. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукоп по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

В США не существует стандартов качества для данного реагента.

Библиография

1. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. *Am J Clin Pathol* 1984;82:719
2. Juji T, Kano K, Milgrom F. Mixed agglutination with platelets. *Int Arch Allergy* 1972;42:474
3. Beck ML, Rachel JM, Sinor LT et al. Semiautomated solid phase adherence assays for pretransfusion testing. *Med Lab Sci* 1984;41:374
4. Rolih SD, Eisinger RW, Moheng NC et al. Solid phase adherence assays: alternatives for conventional blood bank tests. *Lab Med* 1985;16:766



Реагенты для определения антигенов эритроцитов

Anti-S micro, Anti-s micro
Anti-C^W micro, Anti-k micro

Для определения антигенов эритроцитов
в тестах Capture-R Select

- IVD In Vitro Diagnostic Medical Devices
- CE Marking
- Comparison Limitation
- Discard if markedly turbid
- Consult Instructions for Use
- Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение:

Реагенты Anti-S micro, Anti-s micro, Anti-C^W micro, Anti-k micro предназначены для определения антигенов эритроцитов S (MNS 3), s (MNS 4), C^W (Rh 8), k (Cellano, KEL 2) в тестах Capture-R Select.

Общая информация

Два антигена системы MNSs были описаны Landshtainer и Levine в 1927 году при проведении экспериментов с иммунизацией кроликов эритроцитами человека (1,2). Антиген S был описан в 1947 году Walsh и Montgomery и вскоре стало очевидно, что он является продукцией того же гена, который определяет аллельную пару M и N (4). Аллельный антиген s был описан в 1951 году (5), а в 1953 году Wiener, Unger и Gordon описали антиген U (6). Антиген U является антигеном высокой частоты распространения, он встречается у всех европеоидов, за исключением имеющих редкий фенотип Rh-nul. U-отрицательный фенотип был обнаружен у индивидов, имеющих предков из Африки и было показано, что он ассоциируется с S-s- фенотипом. В африканской популяции фенотип U- встречается с частотой 0,2-1%. Также существует описанный Francis и Hatcher в 1966 году фенотип S-s-Uweak (7). Сейчас система групп крови MNSs включает в себя около 40 антигенов, многие из которых настолько редки, что их трудно встретить в рутинной практике (8).

Антитела anti-S могут являться естественными антителами, активными при комнатной температуре. Антитела anti-S, anti-s и anti-U способны вызывать гемолитическую болезнь новорожденных и посттрансфузионные гемолитические реакции.

Антиген C^W является одним из наиболее редких антигенов системы Rh и встречается в европейской популяции с частотой примерно 1% (9-11). Однако, антитела anti-C^W встречаются довольно часто, в том числе и у индивидов, не имевших контакта с антигеном C^W. Типирование доноров по антигену C^W позволяет осуществить подбор крови для трансфузии пациентам, имеющим антитела anti-C^W. Определение фенотипа эритроцитов также является конечным этапом установления специфичности выявленных аллоантител. Реагент anti-C^W может быть полезен при популяционных и семейных исследованиях. В момент выдачи крови для трансфузии определение антигена C^W позволяет выдать отрицательную по данному антигену кровь пациентам, имеющим антитела anti-C^W.

Реагенты Anti-S micro, Anti-s micro, Anti-C^W micro предназначены для определения антигенов эритроцитов доноров или пациентов S, s и C^W. Типирование доноров по данным антигенам позволяет осуществить подбор крови для трансфузии пациентам, имеющим соответствующие антитела.

Антиген k (Cellano) был впервые описан в 1949 году (12). Антитела против этого антигена выявляются в основном в непрямом антиглобулиновом тесте. Антигены k (Cellano) и K (Kell) кодируются кодоминантными аллелями, расположенными на одном локусе. Данный локус определяет три варианта аллели: K+k+, K-k+ и редкий вариант - K+k-.

Реагент anti-k micro предназначен для выявления на эритроцитах антигена k. Типирование доноров по антигену k позволяет осуществить подбор крови для трансфузии пациентам, имеющим антитела anti-k. Определение фенотипа эритроцитов также является конечным этапом установления специфичности выявленных аллоантител anti-k.

Принцип

Исследуемые эритроциты фиксируются к поверхности лунок полистереновой микропланшеты (Capture-R Select). В соответствующие лунки добавляются реагенты, при этом антитела взаимодействуют с соответствующими антигенами. После короткой инкубации непрореагировавшие иммуноглобулины удаляются из лунок. Вслед за этим в лунки добавляются Capture-R индикаторные эритроциты (покрытые анти-IgG). При центрифугировании индикаторные эритроциты соединяются с иммуноглобулинами, фиксированных на антигенах исследуемых эритроцитов.

При положительном результате исследования индикаторные эритроциты равномерно распределяются по поверхности лунок, связавшись через антитела с эритроцитами подложки и не могут перемещаться на дно лунок.

Индикаторные эритроциты образуют второй слой эритроцитов, покрывающий поверхность лунок.

При отсутствии реакции антиген-антитело (отрицательный результат) индикаторные эритроциты при центрифугировании перемещаются на дно лунок, образуя компактный осадок в виде «пуговицы».

Реагенты

Реагенты Anti-S micro, Anti-s micro, Anti-C^W micro, Anti-k micro изготавливаются из пулов сывороток человека, содержащих соответствующие поликлональные антитела. Сыворотки разведены раствором, который включает в себя хлорид натрия, БСА, буфер и макромолекулярные соединения для повышения активности реагента. В качестве консерванта используется азид натрия (в конечной концентрации 0,1%). БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (губчатого энцефалита).

Данные реагенты предназначены для использования без дополнительного разведения.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагентов не допускать их контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагентов на протяжении их срока годности. Помутнение реагентов может означать их контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты с явлениями преципитации либо инородными включениями во флаконах. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагенты из немаркированных флаконов.

Не использовать реагенты после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Все материалы, использованные для производства реагентов, тестировались на отсутствие инфекций HIV, HCV, HBs, EBV и вируса MAP (вирус продукции антител мышей). Тем не менее, ни один из существующих в настоящее время тестов не дает полной гарантии инфекционной безопасности.

Внимание:

Не раскапывать реагенты при помощи рта.

Упаковка реагентов включает сухую резиновую грушу.

Реагенты Capture-R к моменту начала исследования должны иметь комнатную температуру. Перед использованием индикаторные эритроциты следует ресуспензировать, перевернув флакон несколько раз.

Capture-R индикаторные эритроциты не следует использовать при изменении их цвета с красного на коричневый, при наличии гемолиза или в тех случаях, когда эритроциты дают неправильный результат при контрольных исследованиях. По мере хранения индикаторных эритроцитов в них может появиться легкий гемолиз. Помутнение Capture-R реагентов может говорить об их микробной контаминации.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции.

Кровь следует брать в пробирки, содержащие ЭДТА. Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагенты Anti-S micro, Anti-s micro, Anti-k micro, Anti-k micro во флаконах с пипетками, готовые для использования.

Дополнительные материалы

Для всех методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Планшеты Capture-R Select
4. Capture-R индикаторные эритроциты
5. Реагент Capture-LISS
6. Реагент Negative Control micro
7. Изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Автоматический метод

1. Прибор серии Galileo

Полуавтоматический метод

1. Пипетки или распыляющие системы (например, ABS Precip)
2. Микропланшетная центрифуга
3. Микропланшетный шейкер
4. Инкубатор
5. Микропланшетный ридер (например, I-STAR)
6. Отмыватель микропланшет

Мануальный метод

1. Микропланшетная центрифуга
2. Микропланшетный шейкер
3. Инкубатор
4. Микропланшетный ридер (например, I-STAR)
5. Отмыватель микропланшет

Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Проведение исследования

А. Автоматический метод

Перед загрузкой реагентов в прибор серии Galileo необходимо снять крышки с флаконов. Пипетки из снятых крышек рекомендуется выбрасывать. Изъятие пипетки из крышки производится потягиванием за грушу.

Для проведения исследования следуйте инструкции для оператора прибора.

После окончания исследования реагенты следует вынуть из прибора и закрыть крышками при этом важно крышки не перепутать во избежание кросс-контаминации. Перепутывание крышек может привести к неправильным результатам исследований.

В. Полуавтоматический метод

1. Вскрыть упаковку с микропланшетом, использовать нужное количество стрипов
 2. Правильно расположить стрипы в рамке. Обрезанный угол рамки должен располагаться слева
- Прибор производит следующие этапы:*
3. Разводит образцы эритроцитов фосфатно-солевым буфером (pH – 6,5 – 7,5).
 4. Готовит подложку
 5. Добавляет по 60 мкл PBS в соответствующие лунки
 6. Добавляет по 40 мкл±5мкл суспензии эритроцитов в назначенные лунки для реагентов для проведения теста и контроля.

Оператор должен выполнить следующие действия:

7. Осторожно покачать микропланшету чтобы убедиться, что эритроциты покрыли всю поверхность дна лунок.
8. Центрифугировать* 5 минут при 450-700G.**
9. Планшету следует встряхнуть, чтобы несвязанные эритроциты отошли от подложки.
10. Удалить супернатант.
11. Осторожно промыть микропланшету PBS.
12. Удалить оставшуюся жидкость и осторожно осушить стрипы.

Прибор производит следующие этапы:

13. Добавляет по 100±5 мкл реагента Capture-LISS в соответствующие лунки
14. Добавляет по 30±5 мкл соответствующих реагентов в лунки.

Оператор должен выполнить следующие действия:

15. Осторожно перемешать
16. Инкубировать от 20 до 60 минут при 37°C.
17. Удалить супернатант
18. Тщательно промыть PBS*
19. Удалить оставшуюся жидкость и осушить стрипы

Прибор проводит следующие этапы:

20. Добавляет по 50±5мкл Capture-R индикаторных эритроцитов

Оператор должен выполнить следующие действия:

21. Незамедлительно центрифугировать стрип при 600-1000G в течение двух минут.
22. Читать и фиксировать результаты

* Рекомендованные дополнительные материалы включают стандартное лабораторное оборудование для профессионального использования. Ответственность за валидацию оборудования лежит на пользователе.

** Режим центрифугирования должен обеспечивать чистый супернатант и возможность легко ресуспензировать несвязанные эритроциты. Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Если исследование проводится на приборе ABS, этапы 10, 11, 15, 16, 17 и 18 могут быть проведены в автоматическом режиме.

С. Мануальный метод

1. Приготовить подложку согласно инструкции к планшетам Capture-R.
2. Приготовить в пробирке суспензию исследуемых эритроцитов в PBS (фосфатно-солевой буфер, pH 6,5-7,5) в соотношении 1:20.
3. Вскрыть упаковку микропланшета, взять нужное количество стрипов.
4. Расположить стрипы в рамке. Срезанный угол рамки должен располагаться с левой стороны.
5. Внести по 60 мкл PBS в лунки.
6. Внести по 1 капле суспензии эритроцитов (50±5мкл) в соответствующие лунки для исследования и контролей.
7. Покачать микропланшету, чтобы суспензия эритроцитов покрыла все дно лунок.
8. Центрифугировать* 5 минут при 450-700G**
9. Встряхнуть планшету, чтобы несвязанные эритроциты отделились от подложки.
10. Удалить супернатант.
11. Тщательно отмыть 6 раз фосфатно-солевым буфером.*
12. Удалить оставшуюся жидкость и осушить лунки.

13. Добавить по 2 капли (100±5 мкл) реагента Capture-LISS в соответствующие лунки.

14. Добавить по 30±5 мкл соответствующего реагента в каждую лунку.

15. Осторожно перемешать.

16. Инкубировать от 20 до 60 минут при 37°C.

17. Удалить супернатант

18. Тщательно отмыть 6 раз фосфатно-солевым буфером*

19. Удалить оставшуюся жидкость и осторожно осушить стрипы.

20. Добавить по 1 капле 50±5мкл Capture-R индикаторных эритроцитов.

21. Незамедлительно центрифугировать стрип при 600-1000G в течение двух минут.

22. Читать и фиксировать результаты.

* Рекомендованные дополнительные материалы включают стандартное лабораторное оборудование для профессионального использования. Ответственность за валидацию оборудования лежит на пользователе.

** Режим центрифугирования должен обеспечивать чистый супернатант и возможность легкого ресуспендирования несвязанных эритроцитов.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Сильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после центрифугирования, независимо от того, проводилось ли исследование в мануальном или полуавтоматическом режиме. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и хранения при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную мануальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Анти-позитивные и антиген-отрицательные эритроциты должны использоваться параллельно с исследуемыми образцами.

При использовании системы Galileo тест контроля качества должен проводиться ежедневно для подтверждения работоспособности реагентов.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: Наблюдается адгезия индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen по всей поверхности дна лунки.

Примечание: если отрицательный контроль дал положительную реакцию, результат исследования недействителен.

Отрицательная реакция: Индикаторные эритроциты Capture-R образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы», адгезия за пределами осадка отсутствует.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов.

При правильной калибровке системы реагент должен давать положительную реакцию силой от 2+ до 4+. Реакции 1+ и слабее должны оцениваться отдельно до постановки окончательного диагноза, поскольку они могут говорить о том, что условия исследования – температура среды, интенсивность и время центрифугирования, объемы реагентов или клеточных суспензий – были неоптимальными. Снижение силы реакции также может происходить вследствие понижения экспрессии антигенов или при наличии в образце дополнительных антител.

Положительные реакции с образцами, хранившимися некоторое время, могут быть слабее, чем со свежими образцами от тех же пациентов.

Если эритроциты положительны в прямом антиглобулиновом тесте, корректное определение антигена K невозможно.

При определении антигена k положительная реакция с эритроцитами, имеющими фенотип K+k+Kp(a+) может быть слабее, чем с контрольными эритроцитами, полученными путем произвольной выборки.

В реагентах, приготовленных из поликлональных сывороток человека, могут встречаться дополнительные антитела против редко встречающихся антигенов. Кроме того, на эритроцитах могут присутствовать определенные антигены, например, Bg, Sda. Результатом этого могут явиться редкие ложноположительные реакции, в том числе имеющие место более чем с одной серией реагента данной специфичности. Поскольку различные производители часто пользуются сыворотками из одних и тех же источников, одни и те же контаминирующие антитела могут встречаться в реагентах различных производителей. Нельзя требовать от производителя обязательного отсутствия в реагентах всех контаминирующих антител, поскольку не всегда возможно найти для контрольных исследований сырьё эритроциты, имеющие редко встречающиеся антигены. С другой стороны, снижение экспрессии антигенов может приводить к ложноотрицательным результатам. По этим причинам всегда следует с большой осторожностью делать выводы о генотипе по результатам серологических исследований.

Чрезмерно интенсивное центрифугирование после добавления Capture-R индикаторных эритроцитов может приводить к ложноотрицательным или сомнительным результатам вследствие повреждения подложки.

Параметры торможения центрифуги также могут влиять на результат. Длительное торможение может приводить к ложноотрицательным результатам. В то же время чрезмерно сильное торможение также может исказить результат исследования.

Контаминация Capture-R индикаторных эритроцитов плазменными белками может приводить к нейтрализации антиглобулинового реагента и связанным с этим ложноотрицательным результатам.

Неправильные результаты могут быть получены при недостаточном уровне подготовки персонала лаборатории. Технический персонал должен быть хорошо обучен технике проведения данных исследований.

Чувствительность Capture-R индикаторных эритроцитов снижается после истечения срока годности.

Запрещается проводить исследование с гемолизированными образцами.

Характеристики реагентов

Результаты проведенных исследований показали, что реагенты Anti-S micro, Anti-s micro, Anti-C^w micro, Anti-k являются безопасными и эффективными реагентами для выявления соответствующих антигенов.

Методика	Anti-S			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Автоматическая	63	100%	45	100%
Полу-Автоматическая	103	100%	88	100%
Мануальная	62	100%	46	100%

Методика	Anti-s			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Автоматическая	93	100%	15	100%
Полу-Автоматическая	171	100%	20	100%
Мануальная	97	100%	11	100%

Методика	Anti-C ^w			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Автоматическая	4	100%	112	100%
Полу-Автоматическая	7	100%	184	100%
Мануальная	4	100%	104	100%

Методика	Anti-k (Cellano)			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Автоматическая	122	100%	5	100%
Полу-Автоматическая	188	100%	4	100%
Мануальная	122	100%	5	100%

Реагенты исследовались параллельно с реагентами, выпускаемыми конкурирующей фирмой и в 100% случаев было отмечено 100% совпадения результатов.

Определение взято из Common Technical Specification (CTS).

Диагностическая Чувствительность: Вероятность, с которой тест дает положительный результат при исследовании образца, содержащего объект поиска.

12

Диагностическая Специфичность: Вероятность, с которой тест дает отрицательный результат при исследовании образца, не содержащего объекта поиска.

Перед выпуском в продажу все партии реагента проверяются во всех методиках на приборе Galileo. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Cutbush M, Mollison PL, Perkin DM. A new human blood group. Nature 1950; 165:88
2. Ikin EW, Mourant AE, Pettenkofer HJ, Blumenthal G. Discovery of the expected hemagglutinin, anti-Fyb. Nature 1951; 168:1077
3. Sanger R, Race RR, Jack JJ. The Duffy blood groups of New York Negroes: the phenotype Fy(a-b-). Brit J Haemat 1955; 1:370-374
4. Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy blood group system in Caucasians: evidence for a new allele. Am J Hum Genet 1965; 17:384-389
5. Allen FH, Diamond LK, Niedziela B. A new blood group antigen. Nature 1951; 167:482
6. Plaut G, Ikin EW, Mourant AE, Sanger R, Race RR. A new blood group antibody (anti-Jkb). Nature 1953; 171:431
7. Pinkerton FJ, Mermod LE, Liles BA, Jack JJ, Noades J. The phenotype Jk(a-b-) in the Kidd blood group system. Vox Sang 1959; 4:155-160
8. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6-th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1975:178

CE
0088

Реагент Capture-R® Ready-Screen® (3)

Твердофазная система для выявления неожиданных антител IgG к антигенам эритроцитов



Назначение: реагент Capture-R® Ready-Screen® (3) предназначен для определения неожиданных антител IgG к антигенам эритроцитов мануальным, полуавтоматическим или автоматическим методом твердофазной адгезии эритроцитов.

Общая информация

При обследовании доноров и реципиентов неожиданные антитела против антигенов эритроцитов выявляются с частотой от 0,3 до 3%.¹⁻³ Многие из этих антител имеют клиническое значение и могут приводить к посттрансфузионным гемолитическим осложнениям, гемолитической болезни новорожденных или аутоиммунной гемолитической анемии. Для обнаружения этих антител в сыворотке доноров и пациентов используются различные лабораторные тесты. Для этого специально подобранные эритроциты, например, Capture-R Ready-Screen инкубируются с исследуемой плазмой или сывороткой, что облегчает выявление антител.⁴

Capture-R Ready-Screen (3) в виде панели из трех образцов эритроцитов группы O, пригодных для использования в автоматических и полуавтоматических методиках определения антител методом твердофазной адгезии. Фенотип эритроцитов каждой серии представлен в прилагаемом мастер-листе. Реагент Capture-R Ready-Screen (3) составлен для оптимального выявления антител к антигенам эритроцитов.

Принцип

Реагент Capture-R® Ready-Screen® представляет собой модифицированную твердофазную систему определения антител, основанной на методе Plapp с соавторами⁵ и Juli с соавторами.⁶ Мембраны эритроцитов высушены и фиксированы на поверхности полистереновых микропланшетов. Мембранные антигены эритроцитов используются для фиксации антиэритроцитарных антител, находящихся в сыворотке донора или пациента. После короткой инкубации сыворотка с несвязанными иммуноглобулинами из лунок микропланшета удаляется, вслед за этим в лунки вносится суспензия эритроцитов, покрытых индикатором анти-IgG. При последующем центрифугировании происходит связывание индикаторных эритроцитов с антителами, фиксированными на антигенах мембран. В случае положительной реакции индикаторные эритроциты оказываются фиксированными на стенках лунок микропланшета, поэтому их миграция на дно лунок не происходит. Таким образом индикаторные эритроциты оказываются связанными со скрининговыми эритроцитами через антитела. Если в исследуемой сыворотке антител нет, связывания индикаторных эритроцитов со скрининговыми не происходит и поэтому индикаторные эритроциты мигрируют на дно лунок, образуя там компактный осадок.

Реагент

1. Реагент Capture-R® Ready-Screen®(3), блок 1 x 8 стрипов, на которых фиксированы мембраны высушенных эритроцитов, приготовленные из эритроцитов трех доноров группы 0 (а также лунка положительного контроля, в которой фиксированы мембраны эритроцитов, сенсibilизированные IgG). Расположение эритроцитов на стрипе показано на рис. 1.

2.	Cell I	○
	Cell II	○
	Cell III	○
	Positive Control	○
	Cell I	○
	Cell II	○
	Cell III	○
	Positive Control	○

Упаковка включает 12 блоков, 1 x 8 стрипов в рамке, запечатана в фольгу с осушителем и индикатором влажности. Каждый стрип готов для использования. Стрипы могут использоваться по отдельности или вместе. Стрипы должны храниться при температуре 1-30°C (в холодильнике или при комнатной температуре). Если вложенный индикатор влажности показывает наличие влажности, стрип не должен использоваться. Неиспользованные стрипы должны храниться завернутыми в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности во избежание повреждения мембран эритроцитов излишней влажностью, заворачивать их необходимо немедленно после взятия из упаковки необходимого количества стрипов. Стрипы с сохранной упаковкой не должны использоваться, если индикатор показывает наличие избыточной влажности. После вскрытия упаковки стрипы должны использоваться в течение 8 часов.

3. Мастер лист: сопроводительный лист для каждой серии реагента, содержит информацию об антигенах, имеющихся на эритроцитах, вошедших в состав реагента.

Дополнительные реагенты для проведения исследования (поставляются отдельно):

1. Capture LISS
2. Capture-R готовые индикаторные эритроциты
3. Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая)
4. Capture-R отрицательная контрольная сыворотка
5. WB corQC

ПРИМЕЧАНИЕ: Перечисленные дополнительные реагенты (Capture-R готовые индикаторные эритроциты, Capture-R контрольная сыворотка, Capture LISS) могут быть использованы также с реагентами других лотов при условии, что они имеют подходящий срок годности. Мастер лист может применяться только для лота реагентов, к которому он прилагается.

Предупреждения

1. Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.
2. Перед началом работы все реагенты должны быть согреты до 18-30°C.
4. Capture-R готовые индикаторные эритроциты перед использованием должны быть аккуратно ресуспендированы, для этого надо несколько раз перевернуть флакон. В процессе хранения при 1-10°C происходит легкая агрегация эритроцитов, что не является признаком их негодности. Реагент не должен использоваться, если эритроциты потемнели, приобретя коричневый цвет, если появился выраженный гемолиз, если эритроциты не дают четкой реакции в положительном и отрицательном контроле. По мере хранения реагента может появляться легкий гемолиз.
5. Помутнение реагентов Capture LISS и сывороток Capture-R Control может говорить об их микробной контаминации. Реагент WB corQC не должен использоваться при наличии потемнения эритроцитов, образования сгустков или при наличии признаков значительного гемолиза. По мере хранения реагента может появляться легкий гемолиз. Реагенты с признаками контаминации использовать не следует.
6. Не использовать реагент после истечения срока годности. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью.
7. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.
8. С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Взятие образцов для исследования

Плазма или сыворотка: взять образец крови из вены путем стандартной венепункции. Для проведения исследования может использоваться свежая сыворотка или плазма (заготовленная на ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D). Все исследования рекомендуется проводить как можно скорее после заготовки образцов во избежание ложноположительных или

ложноотрицательных реакций, возникающих вследствие неправильного хранения образцов или их контаминации. Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 1-10°C. Образцы плазмы или сыворотки, отделенные от эритроцитов, могут также храниться в замороженном виде. Образцы, хранившиеся при комнатной температуре в течение нескольких дней, могут представлять затруднение для определения слабых антител, равно как и образцы, длительное время хранившиеся при температуре 1-10°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным элементом, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура проведения исследования

А. Состав упаковки

1. Реагент Capture-R Ready-Screen (3) в виде стрипов в упаковке из фольги.

В. Дополнительные реагенты Capture

1. Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками
2. Реагент Capture-R готовые индикаторные эритроциты во флаконах с пипетками
3. Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая) во флаконах с пипетками
4. Capture-R отрицательная контрольная сыворотка во флаконах с пипетками

С. Дополнительные материалы

Для всех методик

1. Изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 - 7,5
2. Сыворотка или плазма донора (автоматическая методика может потребовать плазму).

автоматического метода

1. Прибор Galileo Echo
2. WB corQC

Для ручного или полуавтоматического метода исследования

1. Пипетки или распыляющие системы
2. Центрифуга* с ротором, адаптированным для стрипов 1 x 8 лунок
3. Нагревательный блок или сухой инкубатор 37°C
4. Устройство для отмывания или ручной диспенсор для подачи физиологического раствора
5. Многоканальный диспенсор или пипетка, предназначенная для работы с микропланшетами
6. Дополнительные стрипы для балансировки центрифуги
7. Таймер
8. Поверхность с подсветкой
9. Маркер
10. Микропланшетный ридер* (опционально)
11. Реагент WB corQC (опционально)

* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.

Проведение исследования

Автоматический метод исследования

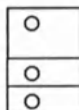
См. соответствующие инструкции для оператора автоматического прибора.

Ручной или полуавтоматический метод

1. К моменту начала исследования все реагенты Capture должны иметь температуру 18-30°C
2. Вскрыть упаковку стрипа Capture-R® Ready-Screen® (3). Проверить состояние индикатора влажности. Если индикатор показывает наличие повышенной влажности стрипа из этой упаковки использовать нельзя. Если влажность не повышена, неиспользованные стрипы положить обратно в упаковку вместе с осушителем и индикатором влажности и тщательно завернуть.
3. Проверить маркировку на обратной стороне стрипа. НЕ использовать стрипы с нечитаемой маркировкой названия теста и номера серии. Образец маркировки реагента приведен на рис.2

Capture-R Ready-Screen (3) strip

Cell I
Cell II
Cell III



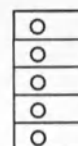
Positive Control

Cell I

Cell II

Cell III

Positive Control



4. Поместить стрип в рамку. Внимание: стрип может быть вставлен в рамку только в правильном положении.
5. Внести по 2 капли (100±10мкл) реагента Capture LISS в ячейки во все тестовые и контрольные лунки.
6. Внести по 1 капле (50±5мкл) образца плазмы или сыворотки в каждую из четырех лунок, предназначенных для данного образца (I, II, III и контрольная лунка). Если исследуется более одного образца, добавьте в соответствующие лунки все исследуемые образцы. ПРИМЕЧАНИЕ: Реагент Capture LISS в присутствии плазмы или сыворотки меняет свой цвет с пурпурного на голубой. Если реагент не поменял цвет, то это может означать, что образец плазмы не добавлен.
7. Ежедневный контроль качества: минимум один раз в 24 часа вносить по 1 капле реагента Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая) в соответствующие 4 лунки (I, II, III и контрольная лунка). В тот же стрип вносить по 1 капле реагента Capture-R отрицательная контрольная сыворотка (соответственно в лунки 5, 6, 7 и 8). Формат контрольного исследования см. на рисунке 3.

Cell I

Cell II

Cell III

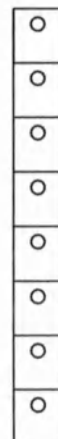
Positive Control

Cell I

Cell II

Cell III

Positive Control



Well 1: Capture-R Positive Control Serum (Weak)

Well 2: Capture-R Positive Control Serum (Weak)

Well 3: Capture-R Positive Control Serum (Weak)

Well 4: Capture-R Positive Control Serum (Weak)

Well 5: Capture-R Negative Control Serum

Well 6: Capture-R Negative Control Serum

Well 7: Capture-R Negative Control Serum

Well 8: Capture-R Negative Control Serum

8. Инкубировать стрипы при 36-38°C в течение не менее 15 минут, но не более 60 минут. Если для инкубации используется сухой инкубатор, добавить к указанному времени 5 минут.
9. Удалить из лунок жидкость (слить или аспирировать) и промыть лунки либо вручную, либо используя автоматическое оборудование.
 - Методика ручной промывки
 - Слить жидкость из лунок
 - Заполнить лунки физиологическим раствором используя многоканальную пипетку, пригодную для работы с микропланшетами. Физиологический раствор может быть разлит также непосредственно из флакона. Физиологический раствор не должен заливаться сильной струей, чтобы не повредить подложку из мембран эритроцитов.
 - Тщательно удалить жидкость из лунок. Для этого стрип можно перевернуть вверх дном и несколькими резкими движениями стряхнуть жидкость.
 - Промыть лунки физиологическим раствором минимум шесть раз.
 - Промывание с использованием автоматического оборудования (промывателя)
 - Пользоваться аппаратом в соответствии с инструкцией производителя.
 - ПРИМЕЧАНИЕ: При промывании стрипов на автоматическом аппарате последний должен быть отрегулирован таким образом, чтобы после аспирации жидкости в лунках оставалось по 4-8мкл жидкости. Жидкость не должна удаляться из лунок полностью.
10. Внести в каждую лунку по 1 капле (50±5мкл) реагента Capture-R готовые индикаторные эритроциты.

11. После внесения реагента немедленно центрифугировать стрипы в течение 1-3 минут при 450-600G.

ПРИМЕЧАНИЕ: Приведенные здесь время и интенсивность центрифугирования ориентированы на оптимальное взаимодействие антигенов и антител. Эти параметры могут варьировать в зависимости от вида используемой центрифуги.

12. Поместить стрип на подсвеченную поверхность (или в ридер микропланшет) и оценить наличие адгезии Capture-R индикаторных клеток. Критерии достоверности результатов исследования:

- Положительный контроль (слабый) – наблюдается адгезия Capture-R индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки
- Отрицательный контроль - Capture-R индикаторные эритроциты образуют компактный осадок («пуговицу») на дне лунки.

Если с контрольными реагентами получен неудовлетворительный результат, исследование не может быть признано достоверным и его необходимо повторить.

Стабильность реакции

Результаты исследования, как мануального, так и полуавтоматического, должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную мануальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Автоматический метод исследования: См. соответствующие инструкции для оператора автоматического прибора.

Мануальный или полуавтоматический метод исследования: В качестве ежедневного контроля качества в состав исследований необходимо включать положительный и отрицательный Capture-R контроли. Контроли должны быть использованы соответственно описанной методике как минимум 1 раз в 24 часа для подтверждения правильности работы оборудования и реагентов. Во всех лунках с положительным (слабым) контролем должен быть получен положительный результат.

ПРИМЕЧАНИЕ: В лунках I, II и III, в которые внесен отрицательный контроль, должен быть получен отрицательный результат.

При использовании автоматического метода исследования для ежедневного контроля качества вместо реагентов Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая) и Capture-R отрицательная контрольная сыворотка в качестве альтернативы может быть использован реагент WB coQC.

Данный скрининг антител предусматривает рутинное использование лунки положительного контроля для каждого образца. Положительный контроль является внутренним контролем качества исследования и представляет собой мембраны эритроцитов, sensibilizированные антителами IgG anti-D. Для каждой серии лунок (I, II и III) в четвертой лунке должен быть получен положительный результат для валидации результата исследования.

Повторное получение отрицательного результата с положительным контролем может означать, что один или более реагентов, используемых в исследовании, испорчены, или, что тест проводится неправильно.

Интерпретация результатов

Отрицательная реакция: Индикаторные эритроциты Capture-R Ready-Screen образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы», адгезия за пределами осадка отсутствует.

Положительная реакция: Наблюдается адгезия индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen по всей поверхности дна лунки.

Антитела, выявленные при проведении теста Capture-R Ready-Screen (3), могут быть идентифицированы с помощью реагентов Capture-R Ready-ID, Capture-R Ready-ID Extend или Capture-R Select (предназначенными для использования в твердофазной системе).

Ограничения

1. Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или промывания или повреждении отдельных компонентов теста.

2. Контаминация индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen сывороткой, содержащей IgG или плазменные протеины, приводит к нейтрализации содержащегося в индикаторных эритроцитах компонента анти-IgG и, как следствие, к ложноотрицательным результатам. Получение отрицательного результата при постановке положительного контроля говорит о такой нейтрализации индикаторных эритроцитов при проведении мануального или полуавтоматического исследования.
3. При чрезмерно интенсивном центрифугировании после добавления индикаторных эритроцитов может произойти повреждение подложки, что, как следствие, приведет к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов. Недостаточно интенсивное центрифугирование может привести к ложноположительным результатам.
4. Некоторые варианты антител, представленные изолированными субклассами IgG, могут не взаимодействовать с индикаторными эритроцитами. Следует иметь в виду, однако, что антитела субкласса IgG4 в изолированном виде встречается крайне редко.
5. Параметры торможения центрифуги также могут влиять на получаемые результаты. Недостаточное торможение и большое время остановки центрифуги может приводить к получению ложноотрицательных результатов. Чрезмерное интенсивное торможение и слишком короткое время остановки может также искажать результаты исследования. Ответственность за регулировку параметров центрифуги перед проведением исследования (время и скорость центрифугирования, интенсивность разгона и торможения) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.
6. Образцы сыворотки или плазмы, полученные из пробирок, содержащих разделительный гель, при скрининге антител могут давать ложноположительные результаты. Пробирки, содержащие разделительный гель, не предназначены для использования в банках крови.
7. Активность реагента Capture-R Ready-Screen может снижаться до истечения срока годности. Скорость, с которой реагент теряет свою активность, отчасти зависит от индивидуальных особенностей доноров и потому не может контролироваться или прогнозироваться производителем.
8. Внесение в лунки индикаторных эритроцитов в избыточном количестве может приводить к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов.
9. Внесение в лунки индикаторных эритроцитов в недостаточном количестве (что может произойти вследствие недостаточного перемешивания эритроцитов или их частичного гемолиза) может приводить к получению слабых ложноположительных результатов. Использование индикаторных эритроцитов, которые имеют к моменту проведения исследования температуру ниже 18°C, может также приводить к получению слабых ложноположительных результатов.
10. Раствор низкой ионной силы (LISS) обычно способствует усилению взаимодействия антиэритроцитарных антител с антигенами. Однако встречаются антитела, для выявления которых присутствие LISS не является оптимальным.
11. Такие антитела, как анти-M, -P1, -Le^a, -Le^b обычно лучше выявляются в пробирочных тестах при комнатной температуре, чем в антиглобулиновом тесте при 37°C. Некоторые авторы усматривают причину этого в том, что данные антитела обычно представлены IgM, реагирующими в солевых растворах. Некоторые из этих антител могут быть выявлены в тесте Capture-R Ready-Screen несмотря на то, что данный тест предназначен для выявления IgG, поскольку содержит анти-IgG компоненты. Антитела, не являющиеся IgG, могут выявляться потому, что индикаторные эритроциты имеют антигены, с которыми данные IgM могут непосредственно связываться. Некоторые IgM могут одновременно связываться с антигенами индикаторных эритроцитов и подложки и тем самым фиксировать индикаторные эритроциты к подложке. Поэтому факт обнаружения антител (анти-M, -Le^a, -Le^b, -P1) не обязательно говорит о принадлежности выявленных антител к классу IgG. Большинство авторов считает, что антитела указанных специфичностей не имеют клинического значения и, если эти антитела выявляются в тесте Capture-R Ready-Screen, то это не говорит об их клинической значимости. В то же время в

данном тесте могут не выявляться IgM, имеющие клиническое значение (например, анти-К или анти-Е).

12. Некоторые IgG слабо взаимодействуют с антигенами подложки в твердофазном тесте. К ним относятся Bg^a, Bg^b, Kn^a, Cs^a, Yk^a, JMN, Mcs^a, Ch и Rg.^{7,8} Некоторые слабые образцы антител, имеющих клиническое значение, в твердофазном тесте могут не выявляться, хотя они могут быть выявлены в альтернативных тестах. В тесте Capture-R Ready-Screen могут также не выявляться пассивно перенесенные антитела анти-D. НИ ОДИН ИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ ТЕСТОВ НЕ СПОСОБЕН ВЫЯВЛЯТЬ ВСЕ АНТИТЕЛА.
13. Исследования генетической истории доноров, имеющих фенотипы Fy(a+b-), Fy(a-b+), Jk(a+b-), Jk(a-b+), M+N-, M-N+, S+s-, S-s+ не проводились. Предполагается, что эти эритроциты получены от доноров, генетически гомозиготных по этим антигенам, но существует также теоретическая возможность наличия генетической гетерозиготности.⁴ Для изготовления реагентов Capture-R Ready-Screen или Capture-R Ready-ID серологические исследования для подтверждения генетической гомозиготности доноров не проводятся.⁸
14. В случае, если исследуемый образец содержит антитела в концентрации ниже порога определения, тест покажет отрицательный результат.⁸
15. Взаимодействие антигенов и антител может быть ослаблено, если для промывания лунок перед добавлением индикаторных эритроцитов использовался физиологический раствор без буфера, либо растров имел слишком низкое pH. Наилучшие результаты достигаются при использовании растворов, имеющих pH 6,5-7,5.⁹
16. Некорректные результаты могут быть получены также в случаях, когда лабораторный персонал не прошел должного обучения работе с методикой Capture-R Ready-Screen. Лаборатории, в которых данная методика вводится в употребление, должны иметь специальные программы обучения персонала. До того, как переходить на скрининг антител исключительно методом Capture-R Ready-Screen следует, обучив предварительно персонал, некоторое время применять эту методику параллельно с методиками, которые постоянно применялись в лаборатории ранее (используя большое количество известных положительных и отрицательных образцов) для того, чтобы убедиться в достоверности получаемых результатов.
17. Эритроциты, использованные при приготовлении реагента, могут иметь также антигены, не определенные производителем. Поэтому возможно получение положительных реакций, выходящих за рамки прилагаемой таблицы антигенов (Мастер лист).

Характеристики реагентов

Реагент Capture-R Ready-Screen оценивался в параллели с мануальными методами гематоглутинации в пяти независимых лабораториях. Исследования 7000 образцов показало способность реагента клинически выявить IgG. Антитела, которые не были выявлены, перечислены в разделе Ограничения.

Некоторые образцы плазмы/сыворотки доноров и реципиентов содержали антитела, которые были выявлены только в твердофазной методике и не были выявлены в референтной методике (в основном это были аутоантитела).

Качество покрытия индикаторных эритроцитов антиглобулиновым реагентом проверяется в реакциях с антителами анти-D и анти-Fy^a.

Перед началом производства эритроциты доноров фенотипируются в двух независимых лабораториях, в каждой из лабораторий для определения каждого антигена эритроцитов используется по два реагента, в состав которых входят антитела из различных донорских источников (за исключением редких сывороток); на основании этих исследований составляется Мастер лист. В схему контроля эритроцитов перед производством входит также постановка прямого антиглобулинового теста с полиспецифическим реагентом. За дополнительной информацией обращайтесь в Техническую службу 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Реагент Capture-R Ready-Screen соответствует требованиям FDA для стандартных эритроцитов, предназначенных для определения антител. В США не существует стандарта активности для подобных реагентов.

Срок годности для стрипов Capture-R Ready-Screen составляет 120 дней со дня производства; кровь доноров, использованная для производства, хранится на протяжении этого же срока.

Библиография

1. Boral LI, Henry JB. The type and screen: a safe alternative and supplement in selected surgical procedures. *Transfusion* 1977;17:163
2. Giblett ER. Blood group alloantibodies: an assessment of laboratory practices. *Transfusion* 1977;17:299
3. Roualt CL. Appropriate pretransfusion testing, in: *Pretransfusion testing for the "80's"*. Washington DC: American Association of Blood Banks, 1980:125.
4. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
5. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. *Am J Clin Pathol* 1984;82:719
6. Juji T, Kano K, Milgrom F. Mixed agglutination with platelets. *Int Arch Allergy* 1972;42:474
7. Beck ML, Rahel JM, Sinor LT et al. Semiautomated solid phase adherence assays for pretransfusion testing. *Med Lab Sci* 1984;41:374
8. Rolih SD, Eisinger RW, Moheng NC et al. Solid phase adherence assays: alternatives for conventional blood bank tests. *Lab Med* 1985;16:766
9. Rolih S, Thomas R, Fisher F et al. Antibody detection errors due to acidic or unbuffered saline. *Immunohematology* 1993;9:15



Reagent Capture-R® Ready-Screen® (Pooled Cells)

Твердофазная система для определения антител IgG к антигенам эритроцитов



Назначение: реагент Capture-R® Ready-Screen® (Pooled Cells) предназначен для определения антител класса IgG к антигенам эритроцитов мануальным, полуавтоматическим или автоматическим методом твердофазной адгезии эритроцитов.

Общая информация

При обследовании доноров и реципиентов антитела против антигенов эритроцитов выявляются с частотой от 0,3 до 3%.¹⁻³ Многие из этих антител имеют клиническое значение и могут приводить к посттрансфузионным гемолитическим осложнениям, гемолитической болезни новорожденных или аутоиммунной гемолитической анемии. Для обнаружения этих антител в сыворотке доноров и пациентов используются различные лабораторные тесты. С этой целью реагент Capture-R Ready-Screen изготовленный из специально подобранных эритроцитов, инкубируется с исследуемой плазмой или сывороткой при условиях, оптимальных для выявления антител.⁴ Проведение теста с реагентом Capture-R Ready-Screen не может проводиться вместо стандартных трансфузионных тестов для выявления антител у реципиента.

Принцип

Реагент Capture-R® Ready-Screen® представляет собой модифицированную твердофазную систему определения антител, основанную на методе Plarr с соавторами⁵ и Juli с соавторами.⁶ Мембраны эритроцитов высушены и фиксированы на поверхности полистироновых микропланшет. Мембранные антигены эритроцитов используются для взаимодействия с антиэритроцитарными антителами, находящимися в сыворотке донора или пациента. После короткой инкубации сыворотка с несвязанными иммуноглобулинами из лунок микропланшеты удаляется, вслед за этим в лунки вносится суспензия индикаторных эритроцитов, покрытых анти-IgG. При последующем центрифугировании происходит связывание индикаторных эритроцитов с антителами, фиксированными на антигенах мембран. В случае положительной реакции индикаторные эритроциты оказываются фиксированными на стенках лунок микропланшеты, поэтому их миграция на дно лунок не происходит. Таким образом индикаторные эритроциты оказываются связанными со скрининговыми эритроцитами через антитела. Если в исследуемой сыворотке антител нет, связывания индикаторных эритроцитов со скрининговыми не происходит и поэтому индикаторные эритроциты мигрируют на дно лунок, образуя там компактный осадок.

Реагент

1. Реагент Capture-R® Ready-Screen® (Pooled Cells), блок 1 x 8 стрипов, на которых фиксированы мембраны высушенных эритроцитов, приготовленные из пула от двух доноров группы 0. Упаковка включает 12 блоков 1 x 8 стрипов, запечатана в фольгу с осушителем и индикатором влажности. Каждый стрип готов для использования. Стрипы могут использоваться по отдельности или вместе. Стрипы должны храниться при температуре 1-30°C (в холодильнике или при комнатной температуре). Если вложенный индикатор влажности показывает наличие повышенной влажности, стрип не должен использоваться. Неиспользованные стрипы должны храниться завернутыми в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности во избежание повреждения мембран эритроцитов вследствие повышенной влажности. Стрипы с сохранной упаковкой не должны использоваться, если индикатор показывает наличие повышенной влажности. После вскрытия упаковки стрипы должны использоваться в течение 8 часов.
2. Мастер лист: сопроводительный лист для каждой серии реагента, содержит информацию об антигенах, имеющихся на эритроцитах, вошедших в состав реагента.

Дополнительные реагенты для проведения исследования:

1. Capture LISS: раствор низкой ионной силы, содержащий глицин, бромкрезол розовый сухой и азид натрия (0,1%) в качестве консерванта. Хранить при 1-10°C.

2. Capture-R готовые индикаторные эритроциты: суспензия эритроцитов, покрытых моноклональными IgG морской свинки против антигенов человека. Реагент суспензирован в буферном растворе, содержащем в качестве консервантов хлорамфеникол (0,25 мг/мл), неомицина сульфат (0,1 мг/мл) и гентамицина сульфат (0,05 мг/мл). Хранить при 1-10°C.
3. Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая): содержит антитела к антигенам эритроцитов. Консервант - азид натрия (0,1%). Хранить при 1-10°C.
4. Capture-R отрицательная контрольная сыворотка: не содержит антител к антигенам эритроцитов. Хранить при 1-10°C.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перечисленные дополнительные реагенты (Capture-R готовые индикаторные эритроциты, Capture-R контрольная сыворотки, Capture LISS) могут быть использованы также с реагентами других лотов при условии, что они имеют подходящий срок годности. Мастер лист может применяться только для лота реагентов, к которому он прилагается.

Предупреждения

1. Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.

2.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

3. Не предназначен для использования с ABS2000.
4. Перед началом работы все реагенты должны быть согреты до 18-30°C.
5. Capture-R готовые индикаторные эритроциты перед использованием должны быть аккуратно ресуспензированы, для этого надо несколько раз перевернуть флакон. В процессе хранения при 1-10°C происходит легкая агрегация эритроцитов, что не является признаком их негодности. Реагент не должен использоваться, если эритроциты потемнели, приобретя коричневый цвет, если появился выраженный гемолиз, если эритроциты не дают четкой реакции в положительном и отрицательном контроле. По мере хранения реагента может появляться легкий гемолиз.
6. Помутнение реагентов Capture LISS и Capture Control может говорить об их микробной контаминации. Такие реагенты использовать не следует.
7. Не использовать реагент после истечения срока годности. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью.
8. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.
9. С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Взятие образцов для исследования

Плазма или сыворотка: взять образец крови из вены путем стандартной венепункции. Для проведения исследования может использоваться свежая сыворотка или плазма (заготовленная на ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D). Все исследования рекомендуется проводить как можно скорее после заготовки образцов во избежание ложноположительных или ложноотрицательных реакций, возникающих вследствие неправильного хранения образцов или их контаминации. Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 1-10°C. Образцы плазмы или сыворотки, отделенные от эритроцитов, могут также храниться в замороженном виде. Образцы, хранившиеся при комнатной температуре в течение нескольких дней, могут представлять затруднение для определения слабых антител, равно как и образцы, длительное время хранившиеся при температуре 1-

10°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

* Процедура проведения исследования

A. Состав упаковки

Реагент Capture-R® Ready-Screen®(Pooled Cells), в микропланшетах, запечатанный в упаковку из фольги.

B. Дополнительные материалы Capture

1. Раствор Capture LISS во флаконах с пипетками
2. Capture-R готовые индикаторные эритроциты во флаконах с пипетками
3. Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая) во флаконах с пипетками
4. Capture-R отрицательная контрольная сыворотка во флаконах с пипетками

C. Прочие дополнительные материалы

1. Сыворотка или плазма донора или пациента
2. Маркеры
3. Пипетки или распыляющие системы
4. Центрифуга* с ротором, адаптированным для стрипов 1 x 8 или 2 x 8
5. Нагревательный блок или сухой инкубатор 37°C
6. Фосфатно-солевой буфер (примерно 15 mM), pH 6,5-7,5
7. Устройство для отмывания или мануальный диспенсор для подачи физиологического раствора
8. Многоканальный диспенсор или пипетка, предназначенная для работы с микропланшетами
9. Дополнительные стрипы для балансировки центрифуги
10. Микропланшетный ридер* (опционально)

* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.

Проведение исследования

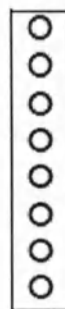
1. К моменту начала исследования все реагенты Capture должны иметь температуру 18-30°C
2. Вскрыть упаковку стрипа. Проверить состояние индикатора влажности. Если индикатор показывает наличие повышенной влажности стрипы из этой упаковки использовать нельзя. Если влажность не повышена, неиспользованные стрипы положить обратно в упаковку вместе с осушителем и индикатором влажности и тщательно завернуть.
3. Проверить маркировку на обратной стороне стрипа. НЕ использовать стрипы с нечитаемой маркировкой. Образец маркировки реагента приведен на рис.1.
4. Поместить стрип в штатив. Внимание: стрип может быть вставлен в штатив только в правильном положении.
5. Внести по 2 капли (100±10мкл) реагента Capture LISS в ячейки во все тестовые и контрольные лунки.
 - Внести 1 каплю (50±5мкл) реагента Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая) в одну лунку
 - Внести 1 каплю (50±5мкл) реагента Capture-R отрицательная контрольная сыворотка в другую лунку
 - Внести по 1 капле (50±5мкл) исследуемых образцов сыворотки или плазмы в отдельные лунки

ПРИМЕЧАНИЕ: Если для проведения исследования нужно использовать несколько стрипов, достаточно добавить контрольные реагенты только в один из них при условии, что стрипы центрифугируются в одном штативе (роторе).

ПРИМЕЧАНИЕ: В каждый центрифугируемый штатив должно быть включено минимум по одному образцу положительного и отрицательного контроля для подтверждения того, что отмывание и центрифугирование было проведено адекватно.

Рис. 1 Стрип Capture-R Ready-Screen (Pooled Cells)

Pooled Cells
Pooled Cells
Pooled Cells
Pooled Cells
Pooled Cells
Pooled Cells
Pooled Cells



7. Инкубировать стрипы при 36-38°C в течение не менее 15 минут, но не более 60 минут. Если для инкубации используется сухой инкубатор, добавить к указанному времени 5 минут.
8. Удалить из лунок жидкость (слить или аспирировать) и промыть лунки либо вручную, либо используя автоматическое оборудование.
 - Методика мануальной промывки
 - Слить жидкость из лунок
 - Заполнить лунки физиологическим раствором используя многоканальную пипетку, пригодную для работы с микропланшетами. Физиологический раствор может быть разлит также непосредственно из флакона. Физиологический раствор не должен заливаться сильной струей, чтобы не повредить подложку из мембран эритроцитов.
 - Тщательно удалить жидкость из лунок. Для этого стрип можно перевернуть вверх дном и несколькими резкими движениями стряхнуть жидкость.
 - Промыть лунки физиологическим раствором минимум шесть раз.
 - Промывание с использованием автоматического оборудования (промывателя)
 - Подготовить аппарат к работе. Заполнить магистрали прибора физиологическим раствором в соответствии с инструкцией производителя.
- ПРИМЕЧАНИЕ: При промывании стрипов на автоматическом аппарате штатив прибора должен быть заполнен стрипами полностью.
 - Произвести удаление жидкости из лунок, используя вакуумный отсос.
 - Произвести серию отмываний: промыть каждую лунку минимум три раза, внося в нее по 300 мкл физиологического раствора (с последующей вакуумной аспирацией). Отмывание необходимо производить в соответствии с инструкцией производителя аппарата. После трех отмываний развернуть стрипы на 180° и промыть их еще три раза. Этот прием является страховкой на тот случай, если один из каналов промывателя или отсоса засорился.
- ПРИМЕЧАНИЕ: промыватель может быть настроен таким образом, чтобы оставлять в лунках 4-8 мкл жидкости после аспирации. В данной методике жидкость должна удаляться полностью, лунки должны оставаться сухими.
9. Внести в каждую лунку по 1 капле (50±5мкл) реагента Capture-R готовые индикаторные эритроциты.
10. После внесения реагента незамедлительно центрифугировать стрипы в течение 1-3 минут при 450-600G.
 - ПРИМЕЧАНИЕ: Приведенные здесь время и интенсивность центрифугирования ориентированы на оптимальное взаимодействие антигенов и антител. Эти параметры могут варьировать в зависимости от вида используемой центрифуги.
11. Поместить стрип на подсвеченную поверхность и оценить наличие адгезии Capture-R индикаторных клеток. Критерии достоверности результатов исследования:
 - Положительный контроль (слабый) – наблюдается адгезия Capture-R индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки
 - Отрицательный контроль - Capture-R индикаторные эритроциты образуют компактный осадок («пуговицу») на дне лунки.

Если с контрольными реагентами получен неудовлетворительный результат, исследование не может быть признано достоверным и его необходимо повторить.

Стабильность реакции

Результаты исследования, как мануального, так и полуавтоматического, должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную мануальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Жедедневный контроль качества компонентов системы Capture-R Ready-Screen осуществляется путем использования реагентов Capture-R положительного и отрицательного контроля. Контрольные тесты должны использоваться при каждом центрифугировании, даже если центрифугируется только один стрип. Проведение контрольных тестов необходимо для того, чтобы исключить технические ошибки, а также для контроля состояния используемых реагентов. Повторное получение неадекватных результатов при проведении контрольных тестов означает, что либо один или более реагентов не соответствует требованиям качества, либо исследование проводится неправильно.

Интерпретация результатов

Отрицательная реакция: Индикаторные эритроциты Capture-R Ready-Screen образуют компактный

осадок на дне лунки в виде «пуговицы», адгезия

за пределами осадка отсутствует

Положительная реакция: Наблюдается адгезия индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen по всей поверхности дна лунки.

Антитела, выявленные при проведении теста Capture-R Ready-Screen, могут быть идентифицированы с помощью твердофазных систем Capture-R Ready-ID, Capture-R Ready-ID Extend или Capture-R Select, с которыми могут быть использованы стандартные эритроциты любых производителей.

Ограничения

1. Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или промывания или повреждении отдельных компонентов теста.
2. Контаминация индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen сывороткой, содержащей IgG или плазменные протеины, приводит к нейтрализации содержащегося в индикаторных эритроцитах компонента анти-IgG и, как следствие, к ложноотрицательным результатам. Получение отрицательного результата при постановке положительного контроля говорит о такой нейтрализации индикаторных эритроцитов при проведении мануального или полуавтоматического исследования.
3. При чрезмерно интенсивном центрифугировании после добавления индикаторных эритроцитов может произойти повреждение подложки, что, как следствие, приведет к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов. Недостаточно интенсивное центрифугирование может привести к ложноположительным результатам.
4. Некоторые варианты антител, представленные изолированными субклассами IgG, могут не взаимодействовать с индикаторными эритроцитами. Следует иметь в виду, однако, что антитела субкласса IgG4 в изолированном виде встречается крайне редко.
5. Параметры торможения центрифуги также могут влиять на получаемые результаты. Недостаточное торможение и большое время остановки центрифуги может приводить к получению ложноотрицательных результатов. Чересчур интенсивное торможение и слишком короткое время остановки может также исказить результаты исследования. Ответственность за регулировку параметров центрифуги перед проведением исследования (время и скорость центрифугирования, интенсивность разгона и торможения) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.
6. Образцы сыворотки или плазмы, полученные из пробирок, содержащих разделительный гель, при скрининге антител могут давать ложноположительные результаты. Пробирки, содержащие разделительный гель, не предназначены для использования в банках крови.

7. Активность реагента Capture-R Ready-Screen может снижаться до истечения срока годности. Скорость, с которой реагент теряет свою активность, отчасти зависит от индивидуальных особенностей доноров и потому не может контролироваться или прогнозироваться производителем.
8. Внесение в лунки индикаторных эритроцитов в избыточном количестве может приводить к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов.
9. Внесение в лунки индикаторных эритроцитов в недостаточном количестве (что может произойти вследствие недостаточного перемешивания эритроцитов или их частичного гемолиза) может приводить к получению слабых ложноположительных результатов. Использование индикаторных эритроцитов, которые имеют к моменту проведения исследования температуру ниже 180°C, может также приводить к получению слабых ложноположительных результатов.
10. Раствор низкой ионной силы (LISS) обычно способствует усилению взаимодействия антиэритроцитарных антител с антигенами. Однако встречаются антитела, для выявления которых присутствие LISS не является оптимальным.
11. Такие антитела, как анти-M, -P1, -Le^a, Le^b обычно лучше выявляются в пробирочных тестах при комнатной температуре, чем в антиглобулиновом тесте при 37°C. Некоторые авторы усматривают причину этого в том, что данные антитела обычно представлены IgM, реагирующими в солевых растворах. Некоторые из этих антител могут быть выявлены в тесте Capture-R Ready-Screen несмотря на то, что данный тест предназначен для выявления IgG, поскольку содержит анти-IgG компоненты. Антитела, не являющиеся IgG, могут выявляться потому, что индикаторные эритроциты имеют антигены, с которыми данные IgM могут непосредственно связываться. Некоторые IgM могут одновременно связываться с антигенами индикаторных эритроцитов и подложки и тем самым фиксировать индикаторные эритроциты к подложке. Поэтому факт обнаружения антител (анти-M, -Le^a, -Le^b, -P1) не обязательно говорит о принадлежности выявленных антител к классу IgG. Большинство авторов считает, что антитела указанных специфичностей не имеют клинического значения и, если эти антитела выявляются в тесте Capture-R Ready-Screen, то это не говорит об их клинической значимости. В то же время в данном тесте могут не выявляться IgM, имеющие клиническое значение (например, анти-K или анти-E).
12. Некоторые IgG слабо взаимодействуют с антигенами подложки в твердофазном тесте. К ним относятся Bg^a, Bg^b, Kn^a, Cs^a, Yk^a, JMN, McC^a, Ch и Rg.^{7,8} Некоторые слабые образцы антител, имеющие клиническое значение, в твердофазном тесте могут не выявляться, хотя они могут быть выявлены в альтернативных тестах. В тесте Capture-R Ready-Screen могут также не выявляться пассивно перенесенные антитела анти-D. НИ ОДИН ИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ ТЕСТОВ НЕ СПОСОБЕН ВЫЯВЛЯТЬ ВСЕ АНТИТЕЛА.
13. Тесты, основанные на использовании пулированных эритроцитов, уступают по чувствительности тестам, в которых используются эритроциты от одного донора. Тесты, включающие пулированные эритроциты, не должны использоваться при проведении проб на совместимость перед трансфузией.
14. Эритроциты, использованные при приготовлении реагента, могут иметь также антигены, не определенные производителем. Поэтому возможно получение положительных реакций, выходящих за рамки прилагаемой таблицы антигенов (Master list).
15. Исследования генетической истории доноров, имеющих фенотипы Fy(a+b-), Fy(a-b+), Jk(a+b-), Jk(a-b+), M+N-, M-N+, S+s-, S-s+ не проводились. Предполагается, что эти эритроциты получены от доноров, генетически гомозиготных по этим антигенам, но существует также теоретическая возможность наличия генетической гетерозиготности.⁴ Для изготовления реагента Capture-R Ready-Screen серологические исследования для подтверждения генетической гомозиготности доноров не проводятся.⁸
16. В случае, если исследуемый образец содержит антитела в концентрации ниже порога определения, тест покажет отрицательный результат.⁸

17. Взаимодействие антигенов и антител может быть ослаблено, если для промывания лунок перед добавлением индикаторных эритроцитов использовался физиологический раствор без буфера, либо раствор имел слишком низкое pH. Наилучшие результаты достигаются при использовании растворов, имеющих pH 6,5-7,5.⁹
18. Некорректные результаты могут быть получены также в случаях, когда лабораторный персонал не прошел должного обучения работе с методикой Capture-R Ready-Screen. Лаборатории, в которых данная методика вводится в употребление, должны иметь специальные программы обучения персонала. До того, как переходить на скрининг антител исключительно методом Capture-R Ready-Screen следует, обучив предварительно персонал, некоторое время применять эту методику параллельно с методиками, которые постоянно применялись в лаборатории ранее (используя большое количество известных положительных и отрицательных образцов) для того, чтобы убедиться в достоверности получаемых результатов.



8. Rolih SD, Eisinger RW, Moheng NC et al. Solid phase adherence assays: alternatives for conventional blood bank tests. Lab Med 1985;16:766
9. Rolih S, Thomas R, Fisher F et al. Antibody detection errors due to acidic or unbuffered saline. Immunohematology 1993;9:15

Характеристики реагентов

Способность реагента Capture-R Ready-Screen выявлять клинически значимые IgG против антигенов эритроцитов была проверена в ходе исследования, при котором было протестировано более 7.000 образцов плазмы или сыворотки в пяти различных лабораториях. В каждой лаборатории параллельно с тестом Capture-R Ready-Screen использовался также референтный метод. Было показано, что тест Capture-R Ready-Screen способен выявлять клинически значимые антитела класса IgG. Ограничения данной методики по выявлению антител различной специфичности – см. раздел «Ограничения». Некоторые образцы, использованные в исследовании, давали положительную реакцию с реагентом Capture-R Ready-Screen, но были отрицательны в референтном исследовании. В дальнейшем было показано, что большинство таких образцов содержало аутоантитела.

Качество покрытия индикаторных эритроцитов антиглобулиновым реагентом проверяется в реакциях с антителами анти-D и анти-Fy^a.

Перед началом производства эритроциты доноров фенотипируются в двух независимых лабораториях, в каждой из лабораторий для определения каждого антигена эритроцитов используется по два реагента, в состав которых входят антитела из различных донорских источников (за исключением редких сывороток); на основании этих исследований составляется Мастер лист. В схему контроля эритроцитов перед производством входит также постановка прямого антиглобулинового теста с полиспецифическим реагентом.

За дополнительной информацией обращайтесь в Техническую службу 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Реагент Capture-R Ready-Screen соответствует требованиям FDA для стандартных эритроцитов, предназначенных для определения антител. В США не существует стандарта активности для подобных реагентов.

Срок годности для стрипов Capture-R Ready-Screen составляет 120 дней со дня производства; кровь доноров, использованная для производства, хранится на протяжении этого же срока.

Библиография

1. Boral LI, Henry JB. The type and screen: a safe alternative and supplement in selected surgical procedures. Transfusion 1977;17:163
2. Giblett ER. Blood group alloantibodies: an assessment of laboratory practices. Transfusion 1977;17:299
3. Rbualt CL. Appropriate pretransfusion testing, in: Pretransfusion testing for the "80's". Washington DC: American Association of Blood Banks, 1980:125.
4. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
5. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. Am J Clin Pathol 1984;82:719
6. Juji T, Kano K, Milgrom F. Mixed agglutination with platelets. Int Arch Allergy 1972;42:474
7. Beck ML, Rahel JM, Sinor LT et al. Semiautomated solid phase adherence assays for pretransfusion testing. Med Lab Sci 1984;41:374

Реагент Galileo Концентрат Системной Жидкости

Концентрированный буфер для приборов, предназначенных для иммуногематологических исследований

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature limitation
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Концентрированный буфер для приборов, предназначенных для проведения иммуногематологических исследований. Galileo Концентрат Системной Жидкости является концентратом, из которого приготавливается изотонический PBS, используемый как системная жидкость в приборах Galileo и других приборах, где требуется подобный буфер.

Принцип

В приборах Galileo данный реагент используется в качестве «системной жидкости» в системе дозирования, где он используется для промывки дозирующих зондов, а также в качестве буфера для разведения эритроцитов в некоторых исследованиях и в качестве отмывающего буфера для твердофазных методик Capture, когда лунки микропланшет промываются для удаления материала, не фиксированного к стенкам лунок.

Реагент

Реагент Galileo Концентрат Системной Жидкости является десятикратным концентратом PBS и перед использованием должен разводиться деионизированной водой.

Невыскрывать флаконы реагента могут храниться при комнатной температуре (20-25°C). После вскрытия флакона все его содержимое должно быть использовано незамедлительно.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения.

После вскрытия хранить при температуре 2-8°C.

При хранении при температуре ниже 15°C во флаконах может наблюдаться преципитация и выпадение кристаллов. Эти кристаллы растворятся при помещении флакона в более теплую среду – температура 20°C в течение 24 часов или температура 37°C в течение 15 минут (до вскрытия флакона).

Не использовать реагент в случае помутнения или изменения окраски.

Не использовать после истечения срока годности.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Взятие образцов для исследования

Для автоматических или полуавтоматических методик может использоваться только кровь, заготовленная на ЭДТА. Не следует использовать образцы крови, взятой в сухие пробирки, поскольку сгустки могут блокировать дозирующие зонды прибора.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней.

Процедура

Состав упаковки

Реагент Galileo Концентрат Системной Жидкости, во флаконах по 500 мл.

Дополнительные материалы

Для всех мануальных методик

1. Деионизированная вода
2. Исследуемый образец, взятый у донора или пациента
3. Прибор Galileo
4. Микропланшеты Galileo для определения групп крови
5. Планшеты Capture
6. Сыворотки Galileo в соответствии с планируемым исследованием

Проведение исследования (на приборе Galileo)

Заполняемый контейнер для системной жидкости и отмывающего буфера должен регулярно опорожняться и очищаться для предотвращения микробной контаминации, как описано в инструкции для оператора прибора Galileo.

Для приготовления 5 литров буфера вылейте в контейнер 500 мл (содержимое 1 флакона) Galileo Концентрат Системной Жидкости и добавьте 4,5 литра деионизированной воды. Перемешайте полученный буфер.

Для установки контейнера в прибор и проведения исследований см. инструкцию для оператора прибора Galileo.

Контроль качества

При проведении исследований на полуавтоматических и автоматических приборах контроль качества должен проводиться ежедневно для подтверждения пригодности реагентов для проведения исследований. Исследования Capture автоматически включают в себя контроль качества.

Интерпретация результатов

См. инструкции к использованию реагентов и прибора.

Примечание: Прибор Galileo производит интерпретацию результатов автоматически.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации реагента. Кроме того, ошибочные результаты могут быть получены при несоблюдении правил проведения исследований.

Характеристики реагентов

Эффективность реагента зависит от соблюдения правил проведения исследований. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

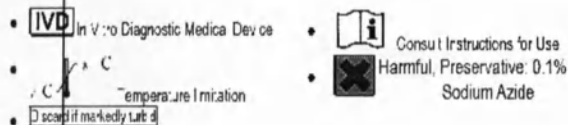
1. Инструкция для оператора прибора Galileo
2. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002



Реагенты для определения антигенов эритроцитов

Anti-Fy(a) micro, Anti-Fy(b) micro
Anti-Jk(a) micro, Anti-Jk(b) micro

Для определения антигенов эритроцитов
в тестах Capture-R Select



Назначение:

Реагенты Anti-Fy(a) micro, Anti-Fy(b) micro, Anti-Jk(a) micro, Anti-Jk(b) micro предназначены для определения антигенов эритроцитов в тестах Capture-R Select.

Общая информация

Впервые антитела к антигену Fy-a были обнаружены в 1950 году Cutbush, Mollison и Parkin (1) в сыворотке пациента по имени Даффи. Антиген, в отношении которого данные антитела были направлены, был обнаружен у 65% представителей европейской популяции. В 1951 году Ikin с соавторами описали антитела anti-Fy(b) (2). В дальнейшем состав антигенов системы Даффи был расширен в 1956 году, когда Sanger, Race и Jack (3) обнаружили, что у значительной части негроидного населения имеет место фенотип Fy(a)-Fy(b)-, очень редкий среди белого населения. В 1965 году Crown с соавторами (4) описали вариант гена Fy(x), при котором продукция антигена Fy(b) была значительно меньше, чем при наличии гена Fy(b). Предположили, что этот ген продуцирует антиген иной, чем Fy(b) и дающий с имеющимися реагентами anti-Fy(b) более слабую реакцию, что приводит к получению разноречивых результатов при исследовании семей.

Антитела к антигенам системы Даффи являются иммунными и иногда активируют систему комплемента. Они способны вызывать гемолитическую болезнь новорожденных и посттрансфузионные гемолитические реакции.

Антитела anti-Jk(a) были впервые описаны Alle, Diamond и Niedziela в 1951 году (5), anti-Jk(b) – в 1953 году Platt с соавторами (6). Обе разновидности антител способны вызывать гемолитическую болезнь новорожденных и посттрансфузионные гемолитические реакции. Фенотип Jk(a)-Jk(b)-, описанный впервые Pinkerton с соавторами, оказался довольно обычным для представителей азиатско-тихоокеанского региона, но не встречается в европеоидной, африканской и американской популяциях. Индивиды, имеющие этот фенотип, могут вырабатывать антитела anti-Jk(3), которые могут взаимодействовать как с антигенами Jk(a), так и с антигенами Jk(b).

Реагенты Anti-Fy(a) micro, Anti-Fy(b) micro, Anti-Jk(a) micro, Anti-Jk(b) micro предназначены для выявления соответствующих антигенов на эритроцитах доноров и пациентов. Фенотипирование доноров дает возможность подбора для пациентов, имеющих антиэритроцитарные антитела. Фенотипирование эритроцитов также является конечным этапом установления специфичности выявленных аллоантител.

Принцип

Исследуемые эритроциты фиксируются к поверхности лунок полистереновой микропланшеты (Capture-R Select). В соответствующие лунки добавляются реагенты, при этом антитела взаимодействуют с соответствующими антигенами. После короткой инкубации непрореагировавшие иммуноглобулины удаляются из лунок. Вслед за этим в лунки добавляются Capture-R индикаторные эритроциты (покрытые анти-IgG). При центрифугировании индикаторные эритроциты соединяются с иммуноглобулинами, фиксированных на антигенах исследуемых эритроцитов.

При положительном результате исследования индикаторные эритроциты равномерно распределяются по поверхности лунок, связавшись через антитела с эритроцитами подложки и не могут перемещаться на дно лунок. Индикаторные эритроциты образуют второй слой эритроцитов, покрывающий поверхность лунок.

При отсутствии реакции антиген-антитело (отрицательный результат) индикаторные эритроциты при центрифугировании перемещаются на дно лунок, образуя компактный осадок в виде «пуговицы».

Реагенты

Реагенты Anti-Fy(a) micro, Anti-Fy(b) micro, Anti-Jk(a) micro, Anti-Jk(b) micro изготавливаются из пулов сывороток человека, содержащих соответствующие антитела. Сыворотки разведены раствором, который включает в себя хлорид натрия, БСА, буфер и макромолекулярные соединения для повышения активности реагента. В качестве консерванта используется азид натрия (в конечной концентрации 0,1%). БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (губчатого энцефалита).

Данные реагенты предназначены для использования без дополнительного разведения.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагентов не допускать их контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагентов на протяжении их срока годности. Помутнение реагентов может означать их контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты с явлениями преципитации либо инородными включениями во флаконах. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагенты из немаркированных флаконов.

Не использовать реагенты после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Все материалы, использованные для производства реагентов, тестировались на отсутствие инфекций HIV, HCV, HBs, EBV и вируса MAP (вирус продукции антител мышей). Тем не менее, ни один из существующих в настоящее время тестов не дает полной гарантии инфекционной безопасности.

Внимание:

Не раскапывать реагенты при помощи рта.

Упаковка реагентов включает сухую резиновую грушу.

Реагенты Capture-R к моменту начала исследования должны иметь комнатную температуру. Перед использованием индикаторные эритроциты следует ресуспензировать, перевернув флакон несколько раз.

Capture-R индикаторные эритроциты не следует использовать при изменении их цвета с красного на коричневый, при наличии гемолиза или в тех случаях, когда эритроциты дают неправильный результат при контрольных исследованиях. По мере хранения индикаторных эритроцитов в них может появиться легкий гемолиз. Помутнение Capture-R реагентов может говорить об их микробной контаминации.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции.

Кровь следует брать в пробирки, содержащие ЭДТА. Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не

использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура исследования

Состав упаковок

Реагенты Anti-Fy(a) micro, Anti-Fy(b) micro, Anti-Jk(a) micro, Anti-Jk(b) во флаконах, готовые для использования.

Дополнительные материалы

Для всех методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Планшеты Capture-R Select
4. Capture-R индикаторные эритроциты
5. Реагент Capture-LISS
6. Реагент Negative Control micro
7. Изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Автоматический метод

1. Прибор серии Galileo

Полуавтоматический метод

1. Пипетки или распыляющие системы (например, ABS Precis)
2. Микропланшетная центрифуга
3. Микропланшетный шейкер
4. Микропланшетный ридер (например, I-STAR)
5. Отмыватель микропланшет

* Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Проведение исследования

А. Автоматический метод

Перед загрузкой реагентов в прибор серии Galileo необходимо снять крышки с флаконов. Пипетки из снятых крышек рекомендуется выбрасывать. Изъятие пипетки из крышки производится потягиванием за грушу.

Для проведения исследования следуйте инструкции для оператора прибора.

После окончания исследования реагенты следует вынуть из прибора и закрыть крышками при этом важно крышки не перепутать во избежание кросс-контаминации. Перепутывание крышек может привести к неправильным результатам исследований.

В. Полуавтоматический метод

1. Вскрыть упаковку с микропланшетой, использовать нужное количество стрипов
2. Правильно расположить стрипы в рамке. Обрезанный угол рамки должен располагаться слева

Прибор производит следующие этапы:

3. Разводит образцы эритроцитов фосфатно-солевым буфером (pH – 6,5 – 7,5).
4. Готовит подложку
5. Добавляет 60 мкл PBS в соответствующие лунки
6. Добавляет 40 мкл±5мкл суспензии эритроцитов в назначенные лунки для реагентов для проведения теста и контроля.

Оператор должен выполнить следующие действия:

1. Осторожно покачивать микропланшету чтобы убедиться, что эритроциты покрыли всю поверхность дна лунок.
8. Центрифугировать* 5 минут при 450-700G.**
9. Планшету следует встряхнуть, чтобы несвязанные эритроциты отошли от подложки.
10. Удалить супернатант.
11. Осторожно промыть микропланшету PBS.
12. Удалить оставшуюся жидкость и осторожно осушить стрипы.

Прибор производит следующие этапы:

13. Добавляет по 100±5 мкл реагента Capture-LISS в соответствующие лунки
14. Добавляет по 30±5 мкл соответствующих реагентов в лунки.

Оператор должен выполнить следующие действия:

15. Осторожно перемешать

16. Инкубировать от 20 до 60 минут при 37°C.

17. Удалить супернатант

18. Тщательно промыть PBS*

19. Удалить оставшуюся жидкость и осушить стрипы

Прибор производит следующие этапы:

20. Добавляет 50±5мкл Capture-R индикаторных эритроцитов

Оператор должен выполнить следующие действия:

21. Незамедлительно центрифугировать стрип при 600-1000G в течение двух минут.
22. Читать и фиксировать результаты

* Рекомендованные дополнительные материалы включают стандартное лабораторное оборудование для профессионального использования. Ответственность за валидацию оборудования лежит на пользователе.

** Режим центрифугирования должен обеспечивать чистый супернатант и возможность легко ресуспензировать несвязанные эритроциты.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Если исследование проводится на приборе ABS, этапы 10, 11, 15, 16, 17 и 18 могут быть проведены в автоматическом режиме.

С. Мануальный метод

1. Приготовить подложку согласно инструкции к планшетам Capture-R.
2. Приготовить в пробирке суспензию исследуемых эритроцитов в PBS (фосфатно-солевой буфер, pH 6,5-7,5) в соотношении 1:20.
3. Вскрыть упаковку микропланшеты, взять нужное количество стрипов.
4. Расположить стрипы в рамке. Срезанный угол рамки должен располагаться с левой стороны.
5. Внести по 60 мкл PBS в лунки.
6. Внести по 1 капле суспензии эритроцитов (50±5мкл) в соответствующие лунки для исследования и контролей.
7. Показать микропланшету, чтобы суспензия эритроцитов покрыла все дно лунок.
8. Центрифугировать* 5 минут при 450-700G**
9. Встряхнуть планшету, чтобы несвязанные эритроциты отделились от подложки.
10. Удалить супернатант.
11. Тщательно отмыть 6 раз фосфатно-солевым буфером.*
12. Удалить оставшуюся жидкость и осушить лунки.
13. Добавить по 2 капли (100±5 мкл) реагента Capture-LISS в соответствующие лунки.
14. Добавить по 30±5 мкл соответствующего реагента в каждую лунку.
15. Осторожно перемешать.
16. Инкубировать от 20 до 60 минут при 37°C.
17. Удалить супернатант
18. Тщательно отмыть 6 раз фосфатно-солевым буфером*
19. Удалить оставшуюся жидкость и осторожно осушить стрипы.
20. Добавить по 1 капле 50±5мкл Capture-R индикаторных эритроцитов.
21. Незамедлительно центрифугировать стрип при 600-1000G в течение двух минут.
22. Читать и фиксировать результаты.

* Рекомендованные дополнительные материалы включают стандартное лабораторное оборудование для профессионального использования. Ответственность за валидацию оборудования лежит на пользователе.

** Режим центрифугирования должен обеспечивать чистый супернатант и возможность легкого ресуспензирования несвязанных эритроцитов.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Стабильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после встряхивания планшеты после центрифугирования, независимо от того, проводилось ли исследование в мануальном или полуавтоматическом режиме. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную мануальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Антиген-положительные и антиген-отрицательные эритроциты должны использоваться параллельно с исследуемыми образцами. При использовании системы Galileo тест контроля качества должен проводиться ежедневно для подтверждения работоспособности реагентов.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: Наблюдается адгезия индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen по всей поверхности дна лунки.

Примечание: если отрицательный контроль дал положительную реакцию, результат исследования недействителен.

Отрицательная реакция: Индикаторные эритроциты Capture-R образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы», адгезия за пределами осадка отсутствует.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов.

При правильной калибровке системы реагент должен давать положительную реакцию силой от 2+ до 4+. Реакции 1+ и слабее должны оцениваться отдельно до постановки окончательного диагноза, поскольку они могут говорить о том, что условия исследования – температура среды, интенсивность и время центрифугирования, объемы реагентов или клеточных суспензий – были неоптимальными. Снижение силы реакции также может происходить вследствие понижения экспрессии антигенов или при наличии в образце дополнительных антител.

Положительные реакции с образцами, хранившимися некоторое время, могут быть слабее, чем со свежими образцами от тех же пациентов.

Чрезмерно интенсивное центрифугирование после добавления Capture-R индикаторных эритроцитов может приводить к ложноотрицательным или сомнительным результатам вследствие повреждения подложки.

Параметры торможения центрифуги также могут влиять на результат. Длительное торможение может приводить к ложноотрицательным результатам. В то же время чрезмерно сильное торможение также может искажать результат исследования.

Контаминация Capture-R индикаторных эритроцитов плазменными белками может приводить к нейтрализации антиглобулинового реагента и связанным с этим ложноотрицательным результатам.

Правильные результаты могут быть получены при недостаточном уровне подготовки персонала лаборатории. Технический персонал должен быть хорошо обучен технике проведения данных исследований.

Чувствительность Capture-R индикаторных эритроцитов снижается после истечения срока годности. Запрещается проводить исследование с гемолизированными образцами.

Нельзя проводить исследование с гемолизированными образцами.

Реагенты не тестировались на anti-Fy(3) и anti-Fy(5).

Реагенты могут не взаимодействовать с антигеном Fy(x).

Не определялась способность реагентов взаимодействовать с эритроцитами фенотипа Fy(a)-Fy(b)-.

Характеристики реагентов

Результаты проведенных исследований показали, что реагенты Anti-Fy(a) micro, Anti-Fy(b) micro, Anti-Jk(a) micro, Anti-Jk(b) являются безопасными и эффективными реагентами для выявления соответствующих антигенов.

Автоматическая	75	100%	33	100%
Полу-Автоматическая	120	100%	71	100%
Мануальная	74	100%	34	100%

Методика	Anti-Fy(b)			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Автоматическая	83	100%	25	100%
Полу-Автоматическая	158	100%	33	100%
Мануальная	790	100%	18	100%
Методика	Anti-Jk(a)			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Автоматическая	79	100%	29	100%
Полу-Автоматическая	135	100%	56	100%
Мануальная	82	100%	26	100%

Методика	Anti-Jk(b)			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Автоматическая	81	100%	27	100%
Полу-Автоматическая	139	100%	52	100%
Мануальная	79	100%	29	100%

Реагенты исследовались параллельно с реагентами, выпускаемыми конкурирующей фирмой и в 100% случаев было отмечено 100% совпадения результатов.

Определение взято из Common Technical Specification (CTS).

Диагностическая Чувствительность: Вероятность, с которой тест дает положительный результат при исследовании образца, содержащего объект поиска.

Диагностическая Специфичность: Вероятность, с которой тест дает отрицательный результат при исследовании образца, не содержащего объекта поиска.

Перед выпуском в продажу все партии реагента проверяются во всех методиках на приборе Galileo. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Cutbush M, Mollison PL, Perkin DM. A new human blood group. Nature 1950; 165:88
2. Ikin EW, Mourant AE, Pettenkofer HJ, Blumenthal G. Discovery of the expected hemagglutinin, anti-Fyb. Nature 1951; 168:1077
3. Sanger R, Race RR, Jack JJ. The Duffy blood groups of New York Negroes: the phenotype Fy(a-b-). Brit J Haemat 1955; 1:370-374
4. Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy blood group system in Caucasians: evidence for a new allele. Am J Hum Genet 1965; 17:384-389
5. Allen FH, Diamond LK, Niedziela B. A new blood group antigen. Nature 1951; 167:482
6. Plaut G, Ikin EW, Mourant AE, Sanger R, Race RR. A new blood group antibody (anti-Jkb). Nature 1953; 171:431
7. Pinkerton FJ, Mermod LE, Liles BA, Jack JJ, Noades J. The phenotype Jk(a-b-) in the Kidd blood group system. Vox Sang 1959; 4:155-160
8. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6-th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1975:178



Методика	Anti-Fy(a)			
	n	Чувствительность	n	Специфичность

25

Реагенты Capture-R® Ready-ID® Capture-R® Ready-ID® Extend I Capture-R® Ready-ID® Extend II

Твердофазная система для выявления антител IgG к
антигенам эритроцитов



Назначение: реагенты Capture-R® Ready-ID® предназначены для выявления антител IgG к антигенам эритроцитов мануальным, полуавтоматическим или автоматическим методом. Реагенты Capture-R® Ready-ID® предназначен для идентификации выявленных антиэритроцитарных антител.

Общая информация

При обследовании доноров и реципиентов неожиданные антитела против антигенов эритроцитов выявляются с частотой от 0,3 до 3%.¹⁻³ Многие из этих антител имеют клиническое значение и могут приводить к трансфузионным гемолитическим осложнениям, гемолитической болезни новорожденных или аутоиммунной гемолитической анемии. Для обнаружения этих антител в сыворотке доноров и пациентов используются различные лабораторные тесты. Для этого специально подобраны реагенты, например, Capture-R Ready-Screen инкубируются с исследуемой плазмой или сывороткой, что облегчает выявление антител⁴. Установление специфичности выявленных антител производится с помощью реагентов Capture-R® Ready-ID® и Capture-R® Ready-ID® Extend с целью подбора доноров для последующих трансфузий. Также идентификация антител производится с целью диагностики и лечения ГБН и, иногда, аутоиммунной гемолитической анемии.

Принцип

Реагенты Capture-R® Ready-ID® и Capture-R® Ready-ID® Extend представляет собой модифицированную твердофазную систему определения антител, основанной на методе Plarr с соавторами⁵ и Juli с соавторами⁶. Мембраны эритроцитов высушены и фиксированы на поверхности полистереновых микропланшет. Мембранные антигены эритроцитов используются для фиксации антиэритроцитарных антител, находящихся в сыворотке донора или пациента. После короткой инкубации сыворотка с несвязанными иммуноглобулинами из лунок микропланшеты удаляется, вслед за этим в лунки вносится суспензия эритроцитов, покрытых индикатором анти-IgG. При последующем центрифугировании происходит связывание индикаторных эритроцитов с антителами, фиксированными на антигенах мембран. В случае положительной реакции индикаторные эритроциты оказываются фиксированными на стенках лунок микропланшеты, поэтому их миграция на дно лунок не происходит. Таким образом индикаторные эритроциты оказываются связанными со скрининговыми эритроцитами через антитела. Если в исследуемой сыворотке антител нет, связывания индикаторных эритроцитов со скрининговыми не происходит и поэтому индикаторные эритроциты мигрируют на дно лунок, образуя там компактный осадок.

Реагент

1. Реагент Capture-R® Ready-ID®, блок 2 x 8 стрипов, на которых фиксированы мембраны высушенных эритроцитов 14 доноров группы O. Доноры подобраны таким образом, чтобы в панели был представлен весь набор часто встречающихся антигенов. Стрип Capture-R® Ready-ID® также содержит две лунки, покрытые мембранами эритроцитов, для контроля (см. рис.1 после Методики исследования). Лунка 15 является положительным контролем и имеет мембраны эритроцитов, сенсibilизированных IgG, лунка 16 является отрицательным контролем.

Capture-R® Ready-ID® Extend, блок 2 x 8 стрипов, на которых фиксированы мембраны высушенных эритроцитов 14 доноров группы O. Доноры подобраны таким образом, чтобы в панели был представлен весь набор часто встречающихся антигенов и не имеют антигена с или е. Все,

кроме 1 образца, не имеют антигена D. Стрип Capture-R® Ready-ID® Extend также содержит две лунки, покрытые мембранами эритроцитов, для контроля (см. рис.1 после Методики исследования). Лунка 15 является положительным контролем и имеет мембраны эритроцитов, сенсibilизированных IgG, лунка 16 является отрицательным контролем. Каждый стрип готов к использованию. Стрипы можно использовать по одному или все вместе. Когда стрипы не используются, их следует хранить при температуре 1-30°C (в холодильнике или при комнатной температуре).

Если вложенный индикатор влажности показывает наличие влажности, стрип не должен использоваться. Неиспользованные стрипы должны храниться завернутыми в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности во избежание повреждения мембран эритроцитов излишней влажностью, заворачивать их необходимо немедленно после взятия из упаковки необходимого количества стрипов. Стрипы с сохранной упаковкой не должны использоваться, если индикатор показывает наличие избыточной влажности. **После вскрытия упаковки стрипы должны использоваться в течение 8 часов.**

2. **Мастер лист:** сопроводительный лист для каждой серии реагента, содержит информацию об антигенах, имеющихся на эритроцитах, вошедших в состав реагента.

Дополнительные реагенты для проведения исследования:

1. **Capture LISS:** Раствор низкой ионной силы, содержит глицин, бромкрезол розовый и азид натрия 0,1% в качестве консерванта. Хранить при температуре 1-10°C.
2. **Capture-R готовые индикаторные эритроциты:** суспензия эритроцитов, покрытых моноклональными IgG морской свинки против антигенов человека. Реагент суспензирован в буферном растворе, содержащем в качестве консервантов хлорамфеникол (0,25 мг/мл), неомицина сульфат (0,1 мг/мл) и гентамицина сульфат (0,05 мг/мл). Хранить при 1-10°C.

Оptionальные дополнительные реагенты:

1. **Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая):** содержит антитела к антигенам эритроцитов. Консервант - азид натрия (0,1%). Хранить при 1-10°C.
2. **Capture-R отрицательная контрольная сыворотка:** не содержит антител к антигенам эритроцитов. Хранить при 1-10°C.

Предупреждения

1. Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.

2.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылился в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидата натрия с водопроводными трубами.

3. Не предназначен для использования с ABS2000.
4. Перед началом работы все реагенты должны быть согреты до 18-30°C.
5. Capture-R готовые индикаторные эритроциты перед использованием должны быть аккуратно ресуспендированы, для этого надо несколько раз перевернуть флакон. В процессе хранения при 1-10°C происходит легкая агрегация эритроцитов, что не является признаком их негодности. Реагент не должен использоваться, если эритроциты потемнели, приобретя коричневый цвет, если появился выраженный гемолиз, если эритроциты не дают четкой реакции в положительном и отрицательном контроле. По мере хранения реагента может появляться легкий гемолиз.
6. Помутнение реагентов Capture LISS и Capture Control может говорить об их микробной контаминации. Такие реагенты использовать не следует.
7. Не использовать реагент после истечения срока годности. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью.

8. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.
 9. С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ:** Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Взятие образцов для исследования

Плазма или сыворотка: взять образец крови из вены путем стандартной венопункции. Для проведения исследования может использоваться свежая сыворотка или плазма (заготовленная на ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D). Все исследования рекомендуется проводить как можно скорее после заготовки образцов во избежание ложноположительных или ложноотрицательных реакций, возникающих вследствие неправильного хранения образцов или их контаминации. Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 1-10°C. Образцы плазмы или сыворотки, отделенные от эритроцитов, могут также храниться в замороженном виде. Образцы, хранившиеся при комнатной температуре в течение нескольких дней, могут представлять затруднение для определения слабых антител, равно как и образцы, длительное время хранившиеся при температуре 1-10°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура проведения исследования

A. Состав упаковки

1. Реагент Capture-R Ready-ID в виде стрипов в упаковке из фольги.
2. Реагент Capture-R Ready-ID Extend в виде стрипов в упаковке из фольги.

B. Дополнительные реагенты Capture

1. Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками
2. Реагент Capture-R готовые индикаторные эритроциты во флаконах с пипетками

C. Дополнительные опциональные материалы

1. Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая) во флаконах с пипетками
2. Capture-R отрицательная контрольная сыворотка во флаконах с пипетками

D. Дополнительные материалы для мануального или полуавтоматического метода исследования

1. Сыворотка или плазма пациента или донора
2. Таймер
3. Поверхность с подсветкой
4. Маркер
5. Пипетки или распыляющие системы
6. Центрифуга* с ротором, адаптированным для стрипов 1 x 8 лунок
7. Нагревательный блок или сухой инкубатор 37°C
8. Фосфатно-солевой буфер, pH 6,5-7,5 (примерно 15 ммоль)
9. Устройство для отмывания или мануальный диспенсор для подачи физиологического раствора
10. Многоканальный диспенсор или пипетка, предназначенная для работы с микропланшетами
11. Дополнительные стрипы для балансировки центрифуги
12. Микропланшетный ридер* (опционально)

E. Дополнительные материалы для автоматического метода исследования

Для проведения исследований на автоматическом приборе см. соответствующую инструкцию для оператора.

* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.

Проведение исследования

Мануальный или полуавтоматический метод

1. К моменту начала исследования все реагенты Capture должны иметь температуру 18-30°C
2. Вскрыть упаковку стрипа Capture-R* Ready-ID. Проверить состояние индикатора влажности. Если индикатор показывает наличие повышенной влажности стрипы из этой упаковки использовать нельзя. Если влажность не повышена,

неиспользованные стрипы положить обратно в упаковку вместе с осушителем и индикатором влажности и тщательно завернуть.

3. Проверить маркировку на обратной стороне стрипа. Не использовать стрипы с нечитаемой маркировкой названия теста и номера серии. Образец маркировки реагента приведен на рис. 1
4. Поместить стрип в рамку. Внимание: стрип может быть вставлен в рамку только в правильном положении.
5. Внести по 2 капли (100±10мкл) реагента Capture LISS в ячейки во все тестовые и контрольные лунки.

▲ Рис 1. Стрипы Capture-R Ready-ID и Extend

Лунка 1	○	○	Лунка 9
Лунка 2	○	○	Лунка 10
Лунка 3	○	○	Лунка 11
Лунка 4	○	○	Лунка 12
Лунка 5	○	○	Лунка 13
Лунка 6	○	○	Лунка 14
Лунка 7	○	○	Положительный контроль (лунка 15)
Лунка 8	○	○	Отрицательный контроль (лунка 16)

Примечание: Опционально использование коммерческой сыворотки в качестве контроля. Рекомендуется добавлять плазму (сыворотку) в лунку 15, но не 16 (в последнюю добавлять только коммерческую контрольную сыворотку). Для выполнения этой рекомендации после этапа 6 переходите к этапу 9, минуя этапы 7 и 8. Однако, для использования коммерческой контрольной сыворотки выполните альтернативную процедуру из этапа 6.

6. Внести по 1 капле (50+5мкл) образца плазмы или сыворотки в лунки 1-15 и затем переходите к этапу 9 (рекомендованная процедура).

Альтернативная процедура: Для использования коммерческой контрольной сыворотки внесите 1 каплю (50+5мкл) в лунки 1-14 и затем переходите к этапу 7.

7. Добавить 1 каплю (50+5мкл) Capture-R положительной контрольной сыворотки (слабой) в лунку положительного контроля (см. рис.1)
8. Добавить 1 каплю (50+5мкл) Capture-R отрицательной контрольной сыворотки в лунку отрицательного контроля (см. рис.1)
9. Инкубировать стрипы при 36-38°C в течение не менее 15 минут, но не более 60 минут. Если для инкубации используется сухой инкубатор, добавить к указанному времени 5 минут.
10. Удалить из лунок жидкость (слить или аспирировать) и промыть лунки либо вручную, либо используя автоматическое оборудование.

• Методика мануальной промывки

- Слить жидкость из лунок

- Заполнить лунки физиологическим раствором используя многоканальную пипетку, пригодную для работы с микропланшетами. Физиологический раствор может быть разлит также непосредственно из флакона. Физиологический раствор не должен заливаться сильной струей, чтобы не повредить подложку из мембран эритроцитов.

- Тщательно удалить жидкость из лунок. Для этого стрип можно перевернуть вверх дном и несколькими резкими движениями стряхнуть жидкость.

- Промыть лунки физиологическим раствором минимум шесть раз.

• Промывание с использованием полуавтоматического оборудования (промывателя)

Пользоваться аппаратом в соответствии с инструкцией производителя.

ПРИМЕЧАНИЕ: При промывании стрипов на полуавтоматическом аппарате последний должен быть отрегулирован таким образом, чтобы после аспирации жидкости в лунках оставалось по 4-8мкл жидкости. Жидкость не должна удаляться из лунок полностью.

11. Внести в каждую лунку по 1 капле (50±5мкл) реагента Capture-R готовые индикаторные эритроциты.

12. После внесения реагента немедленно центрифугировать стрипы в течение 1-3 минут при 450-600G.

ПРИМЕЧАНИЕ: Приведенные здесь время и интенсивность центрифугирования ориентированы на оптимальное взаимодействие антигенов и антител. Эти параметры могут варьировать в зависимости от вида используемой центрифуги.

13. Поместить стрип на подсвеченную поверхность (или в ридер микропланшет) и оценить наличие адгезии Capture-R индикаторных клеток. Критерии достоверности результатов исследования:

- Положительный контроль (слабый) – наблюдается адгезия Capture-R индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки

- Отрицательный контроль - Capture-R индикаторные эритроциты образуют компактный осадок («пуговицу») на дне лунки.

Если с контрольными реагентами получен неудовлетворительный результат, исследование не может быть признано достоверным и его необходимо повторить.

Автоматический метод исследования

Для проведения исследований на автоматическом приборе см. соответствующую инструкцию для оператора.

Стабильность реакции

Результаты исследования, как мануального, так и полуавтоматического, должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную мануальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

В лунках с положительным контролем (покрытой сенсibilизированными мембранами эритроцитов) и отрицательным контролем исследование проводится каждый раз при проведении идентификации антител. Для признания результата достоверным в стрипах Capture-R® Ready-ID и Capture-R® Ready-ID Extend в лунке положительного контроля должен быть получен положительный результат, а в лунке отрицательного контроля – отрицательный результат в виде «пуговицы» индикаторных клеток на дне лунки без фиксации эритроцитов за пределами «пуговицы».

Мануальный или полуавтоматический метод исследования: В качестве ежедневного контроля качества в состав исследований необходимо включать положительный и отрицательный Capture-R контроли. Контроли должны быть использованы соответственно описанной методике как минимум 1 раз в 24 часа для подтверждения правильности работы исследования и реагентов. Во всех лунках с положительным (слабым) контролем должен быть получен положительный результат.

ПРИМЕЧАНИЕ: В лунках I, II и III, в которые внесен отрицательный контроль, должен быть получен отрицательный результат.

При использовании автоматического метода исследования для ежедневного контроля качества вместо реагентов Capture-R положительная контрольная сыворотка (слабая) и Capture-R отрицательная контрольная сыворотка в качестве альтернативы может быть использован реагент WB corQC.

Данный скрининг антител предусматривает рутинное использование лунки положительного контроля для каждого образца. Положительный контроль является внутренним контролем качества исследования и представляет собой мембраны эритроцитов, сенсibilизированные антителами IgG anti-D. Для каждой серии лунок (I, II и III) в четвертой лунке должен быть получен положительный результат для валидации результата исследования.

Повторное получение отрицательного результата с положительным контролем может означать, что один или более реагентов, используемых в исследовании, испорчены, или, что тест проводится неправильно.

Интерпретация результатов

Отрицательная реакция: Индикаторные эритроциты Capture-R образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы», адгезия за пределами осадка отсутствует.

Положительная реакция: Наблюдается адгезия индикаторных эритроцитов Capture-R по всей поверхности дна лунки.

Антитела, выявленные при проведении теста Capture-R Ready-Screen (3), могут быть идентифицированы с помощью реагентов Capture-R Ready-ID, Capture-R Ready-ID Extend или Capture-R Select (предназначенными для использования в твердофазной системе).

Ограничения

1. Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или промывания или повреждении отдельных компонентов теста.
2. Контаминация индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen сывороткой, содержащей IgG или плазменные протенны, приводит к нейтрализации содержащегося в индикаторных эритроцитах компонента анти-IgG и, как следствие, к ложноотрицательным результатам. Получение отрицательного результата при постановке положительного контроля говорит о такой нейтрализации индикаторных эритроцитов при проведении мануального или полуавтоматического исследования.
3. При чрезмерно интенсивном центрифугировании после добавления индикаторных эритроцитов может произойти повреждение подложки, что, как следствие, приведет к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов. Недостаточно интенсивное центрифугирование может привести к ложноположительным результатам.
4. Некоторые варианты антител, представленные изолированными субклассами IgG, могут не взаимодействовать с индикаторными эритроцитами. Следует иметь в виду, однако, что антитела субкласса IgG4 в изолированном виде встречается крайне редко.
5. Параметры торможения центрифуги также могут влиять на получаемые результаты. Недостаточное торможение и большое время остановки центрифуги может приводить к получению ложноотрицательных результатов. Чересчур интенсивное торможение и слишком короткое время остановки может также исказить результаты исследования. Ответственность за регулировку параметров центрифуги перед проведением исследования (время и скорость центрифугирования, интенсивность разгона и торможения) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.
6. Образцы сыворотки или плазмы, полученные из пробирок, содержащих разделительный гель, при скрининге антител могут давать ложноположительные результаты. Пробирки, содержащие разделительный гель, не предназначены для использования в банках крови.
7. Активность реагента Capture-R Ready-Screen может снижаться до истечения срока годности. Скорость, с которой реагент теряет свою активность, отчасти зависит от индивидуальных особенностей доноров и потому не может контролироваться или прогнозироваться производителем.
8. Внесение в лунки индикаторных эритроцитов в избыточном количестве может приводить к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов.
9. Внесение в лунки индикаторных эритроцитов в недостаточном количестве (что может произойти вследствие недостаточного перемешивания эритроцитов или их частичного гемолиза) может приводить к получению слабых ложноположительных результатов. Использование индикаторных эритроцитов, которые имеют к моменту проведения исследования температуру ниже 18°C, может также приводить к получению слабых ложноположительных результатов.
10. Раствор низкой ионной силы (LISS) обычно способствует усилению взаимодействия антиэритроцитарных антител с антигенами. Однако встречаются антитела, для выявления которых присутствие LISS не является оптимальным.
11. Такие антитела, как анти-M, -P1, -Le^a, Le^b обычно лучше выявляются в пробирочных тестах при комнатной температуре, чем в антиглобулиновом тесте при 37°C. Некоторые авторы

усматривают причину этого в том, что данные антитела обычно представлены IgM, реагирующими в солевых растворах. Некоторые из этих антител могут быть выявлены в тесте Capture-R Ready-Screen несмотря на то, что данный тест предназначен для выявления IgG, поскольку содержит анти-IgG компоненты. Антитела, не являющиеся IgG, могут выявляться потому, что индикаторные эритроциты имеют антигены, с которыми данные IgM могут непосредственно связываться. Некоторые IgM могут одновременно связываться с антигенами индикаторных эритроцитов и подложки и тем самым фиксировать индикаторные эритроциты к подложке. Поэтому факт обнаружения антител (анти-M, -Le^a, -Le^b, -P1) не обязательно говорит о принадлежности выявленных антител к классу IgG. Большинство авторов считает, что антитела указанных специфичностей не имеют клинического значения и, если эти антитела выявляются в тесте Capture-R Ready-Screen, то это не говорит об их клинической значимости. В то же время в данном тесте могут не выявляться IgM, имеющие клиническое значение (например, анти-K или анти-E).

12. Некоторые IgG слабо взаимодействуют с антигенами подложки в твердофазном тесте. К ним относятся Bg^a, Bg^b, Kn^a, Cs^a, Yk^a, JMN, McC^a, Ch и Rg.^{7,8} Некоторые слабые образцы антител, имеющих клиническое значение, в твердофазном тесте могут не выявляться, хотя они могут быть выявлены в альтернативных тестах. В тесте Capture-R Ready-Screen могут также не выявляться пассивно перенесенные антитела анти-D. НИ ОДИН ИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ ТЕСТОВ НЕ СПОСОБЕН ВЫЯВЛЯТЬ ВСЕ АНТИТЕЛА.
13. Исследования генетической истории доноров, имеющих фенотипы Fy(a+b-), Fy(a-b+), Jk(a+b-), Jk(a-b+), M+N-, M-N+, S+s-, S-s+ не проводились. Предполагается, что эти эритроциты получены от доноров, генетически гомозиготных по этим антигенам, но существует также теоретическая возможность наличия генетической гетерозиготности.⁴ Для изготовления реагентов Capture-R Ready-Screen или Capture-R Ready-ID серологические исследования для подтверждения генетической гомозиготности доноров не проводятся.⁸
14. В случае, если исследуемый образец содержит антитела в концентрации ниже порога определения, тест покажет отрицательный результат.⁸
15. Взаимодействие антигенов и антител может быть ослаблено, если для промывания лунок перед добавлением индикаторных эритроцитов использовался физиологический раствор без буфера, либо раствор имел слишком низкое pH. Наилучшие результаты достигаются при использовании растворов, имеющих pH 6,5-7,5.⁹
16. Некорректные результаты могут быть получены также в случаях, когда лабораторный персонал не прошел должного обучения работе с методикой Capture-R Ready-Screen. Лаборатории, в которых данная методика вводится в употребление, должны иметь специальные программы обучения персонала. До того, как переходить на скрининг антител исключительно методом Capture-R Ready-Screen следует, обучив предварительно персонал, некоторое время применять эту методику параллельно с методиками, которые постоянно применялись в лаборатории ранее (используя большое количество известных положительных и отрицательных образцов) для того, чтобы убедиться в достоверности получаемых результатов.
17. Эритроциты, использованные при приготовлении реагента, могут иметь также антигены, не определенные производителем. Поэтому возможно получение положительных реакций, выходящих за рамки прилагаемой таблицы антигенов (Мастер лист).

Характеристики реагентов

Реагент Capture-R Ready-Screen оценивался в параллели с мануальными методами гемагглютинации в пяти независимых лабораториях. Исследования 7000 образцов показало способность реагента клинически значимые IgG. Антитела, которые не были выявлены, перечислены в разделе Ограничения.

Некоторые образцы плазмы/сыворотки доноров и реципиентов содержали антитела, которые были выявлены только в твердофазной методике и не были выявлены в референтной методике (в основном это были аутоантитела).

Качество покрытия индикаторных эритроцитов антиглобулиновым реагентом проверяется в реакциях с антителами анти-D и анти-Fy^a.

Перед началом производства эритроциты доноров фенотипируются в двух независимых лабораториях, в каждой из лабораторий для определения каждого антигена эритроцитов используется по два реагента, в состав которых входят антитела из различных донорских источников (за исключением редких сывороток); на основании этих исследований составляется Мастер лист. В схему контроля эритроцитов перед производством входит также постановка прямого антиглобулинового теста с полиспецифическим реагентом. За дополнительной информацией обращайтесь в Техническую службу 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Реагент Capture-R Ready-Screen соответствует требованиям FDA для стандартных эритроцитов, предназначенных для определения антител. В США не существует стандарта активности для подобных реагентов.

Срок годности для стрипов Capture-R Ready-Screen составляет 120 дней со дня производства; кровь доноров, использованная для производства, хранится на протяжении этого же срока.

Библиография

1. Boral LI, Henry JB. The type and screen: a safe alternative and supplement in selected surgical procedures. *Transfusion* 1977;17:163
2. Giblett ER. Blood group alloantibodies: an assessment of laboratory practices. *Transfusion* 1977;17:299
3. Roualt CL. Appropriate pretransfusion testing, in: *Pretransfusion testing for the "80's"*. Washington DC: American Association of Blood Banks, 1980:125.
4. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
5. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. *Am J Clin Pathol* 1984;82:719
6. Juji T, Kano K, Milgrom F. Mixed agglutination with platelets. *Int Arch Allergy* 1972;42:474
7. Beck ML, Rahel JM, Sinor LT et al. Semiautomated solid phase adherence assays for pretransfusion testing. *Med Lab Sci* 1984;41:374
8. Rolih SD, Eisinger RW, Moheng NC et al. Solid phase adherence assays: alternatives for conventional blood bank tests. *Lab Med* 1985;16:766
9. Rolih S, Thomas R, Fisher F et al. Antibody detection errors due to acidic or unbuffered saline. *Immunohematology* 1993;9:15



Реагенты

Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая)

Capture-R® Отрицательная Контрольная Сыворотка

Контроли для исследований, предназначенных для выявления IgG к антигенам эритроцитов и основанных на адгезии эритроцитов в твердофазной методике

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature Limitation
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
-  Discard if markedly turbid



Назначение: реагенты Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая) и Capture-R® Отрицательная Контрольная Сыворотка предназначены для проведения параллельных исследований в качестве контролей при проведении твердофазных методик Capture-R, включая Capture-R Select, Capture-R Ready-Screen и Capture Ready-ID.

Общая информация

Твердофазные методики выявления антител IgG к антигенам эритроцитов являются непрямым антиглобулиновым тестом и используют индикаторные эритроциты, покрытые IgG (1-2). Достоверность получаемых результатов зависит от следующих факторов:

1. Анти-IgG-активности реагента
2. Качества проведения этапов отмывания лунок перед добавлением в них индикаторных эритроцитов
3. Времени и интенсивности центрифугирования
4. Времени и температуры инкубации.

Компонент индикаторных эритроцитов анти-IgG может быть нейтрализован, если во флакон, где они хранятся, попадает небольшое количество сывороточных протеинов. Алогичная нейтрализация может произойти в случае недостаточного отмывания лунок микропланшеты. Реагент Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая) предназначен для проверки активности индикаторных эритроцитов. Отрицательная или ослабленная реакция предполагает наличие нейтрализации индикаторных эритроцитов.

Реагент Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая) может также использоваться для определения изменения режима центрифугирования или инкубации. Инкубация при температуре 36-38°C способствует реакции антиген-антитело. Центрифугирование облегчает адгезию эритроцитов и дифференцировку положительных результатов от отрицательных. Изменение режима работы инкубатора по мере его эксплуатации (понижению температуры или укорочению периода инкубации) ведет к ослаблению реакции с контрольным реагентом вплоть до отрицательной. Аналогично, изменение режима центрифугирования в сторону ужесточения приведет к получению ложноотрицательных результатов с данным реагентом.

Реагент Capture-R® Отрицательная Контрольная Сыворотка используется для контроля недостаточного центрифугирования и избыточной инкубации, которые могут привести к получению ложноположительных результатов с данным реагентом.

Принцип

Реагенты Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая) и Capture-R® Отрицательная Контрольная Сыворотка должны использоваться при каждом исследовании или с каждой новой серией реагентов для подтверждения достоверности результатов исследования. Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая) должна показывать сходные положительные результаты во всех исследованиях. Отрицательная контрольная Сыворотка должна всегда показывать отрицательные результаты. Получение результатов, отличающихся от

ожидаемых ведет к признанию результатов всех исследований данной серии недостоверными.

Реагент

Реагент Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая): содержит антитела к антигенам эритроцитов. Содержит азид натрия 0,1% в качестве консерванта. Хранить при температуре 1-10°C. Готов к применению.

Реагент Capture-R® Отрицательная Контрольная Сыворотка: не содержит антител к антигенам эритроцитам. Содержит азид натрия 0,1% в качестве консерванта. Хранить при температуре 1-10°C. Готов к применению.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур. Не использовать после истечения срока годности. Помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты.

Реагенты предназначены для проведения контрольных исследований только с реагентами Capture-R.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

Внимание:

Не раскапывать реагенты при помощи рта. Существующие в настоящее время методы исследования не могут полностью гарантировать отсутствие в продуктах инфекционных агентов.

Упаковка реагента включает сухую грушу из натуральной резины.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Руководствуйтесь инструкциями к планшетах для определения антител, которые будут использованы для исследования (Capture-R Select, Capture-R Ready-Screen или Capture Ready-ID).

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая) во флаконах, готовый для использования.
Реагент Capture-R® Отрицательная Контрольная Сыворотка во флаконах, готовый для использования.

Дополнительные материалы

1. Планшеты Capture-R Select, Capture-R Ready-Screen или Capture Ready-ID
2. Реагент Capture LISS
3. Capture-R готовые индикаторные эритроциты
4. Фосфатно-солевой изотонический буфер (примерно 15mM), pH 6,5-7,5
5. Исследуемые образцы донора или пациента
6. Нагревательный блок или сухой инкубатор 37°C
7. Центрифуга* с ротором, адаптированным для стрипов и их рамок
8. Автоматический или полуавтоматический отмыватель* микропланшет или мануальный диспенсор для подачи физиологического раствора
9. Многоканальный диспенсор или пипетка, предназначенная для работы с микропланшетами
10. Таймер
11. Поверхность с подсветкой
12. Маркер
13. Дополнительные стрипы для балансировки центрифуги

* Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.



*Проведение исследования

1. К моменту начала исследования все реагенты Capture и образцы должны иметь температуру 18-30°C
2. Приготовить для исследования образец эритроцитов или сыворотки/плазмы в соответствии с требованиями инструкции к планшетам Capture.
3. Приготовить лунки планшеты Capture, добавить реагент Capture LISS и исследуемые образцы в соответствии с требованиями инструкции к планшетам Capture.
4. Внести по 1 капле (примерно 50±5 мкл) контрольного реагента Capture в соответствующие пробирки. Каждый контроль необходимо использовать только один раз за исследование.
5. После инкубации отмыть лунки планшеты вручную или с использованием полуавтоматического отмывателя в соответствии с требованиями инструкции к планшетам Capture.
6. Читать и фиксировать результаты исследования.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

*Стабильность реакции

Результаты исследования, как мануального, так и полуавтоматического, должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную мануальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Характеристики планшет Capture оцениваются при каждом исследовании с помощью контрольных сывороток Capture. Контроли помогают обнаружить технические проблемы выполнения исследования, а также оценить пригодность реагентов к использованию. Повторное получение неправильных результатов при контрольных исследованиях может означать, индикаторные эритроциты или какой-либо другой реагент испорчен, или что имеет место постоянная ошибка в методике проведения исследования.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: Наблюдается адгезия индикаторные эритроциты Capture-R Ready-Screen по всей поверхности дна лунки.

Отрицательная реакция: Индикаторные эритроциты Capture-R Ready-Screen образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы», адгезия за пределами осадка отсутствует.

Сила положительной реакции с реагентом реагенты Capture-R® Положительная Контрольная Сыворотка (Слабая) должна быть не слабее, чем умеренно сильная. Если результат слабее ожидаемого, это может означать о том, что активность реагента снижена или прибор работает неправильно. В этом случае можно пропустить слабopоложительные результаты с исследуемыми образцами.

Ограничения

Контрольные сыворотки Capture-R предназначены только для контроля технических ошибок и качества реагентов при проведении исследований Capture-R. Реагенты не предназначены для контроля других методов исследования. Реагенты не предназначены для использования с ABS2000.

Характеристики реагентов

Перед выпуском в продажу все партии реагентов для подтверждения их соответствия предъявляемым к ним требованиям. Характеристики продукта соответствуют методике, для которой он создан. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. Am J Clin Pathol 1984;82:719
2. Sinor LT. Advances in solid phase red cell adherence methods and transfusion serology. Transfusion Med Rev 1992;9:26-31

Reagent Negative Control Micro

Реагент только для тестов Capture-R Select

• IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

•  Temperature limitation
Discard if markedly turbid

•  Consult Instructions for Use
•  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение

Реагент Negative Control Micro используется для параллельного исследования с фенотипирующими сыворотками в непрямом антиглобулиновом тесте в качестве контроля ложноположительных результатов, которые могут иметь место вследствие наличия аутоантител, положительного прямого антиглобулинового теста или белковых аномалий. Реагент Negative Control Micro используется в качестве отрицательного контроля для следующих реагентов: Anti-Jk(a) micro, Anti-Jk(b) micro, Anti-Fy(a) micro, Anti-Fy(b) micro, Anti-S micro, Anti-s micro, Anti-k micro, Anti-C^W micro.

Общая информация

Реагент Negative Control Micro используется только для валидации результатов определения отдельных антигенов.

Принцип

Реагент Negative Control Micro не содержит каких-либо антител. Фенотипирование эритроцитов пациента в непрямом антиглобулиновом тесте проводится параллельно с постановкой реакции с реагентом Negative Control Micro. Если тест с реагентом Negative Control Micro положителен, все результаты, полученные с данными эритроцитами в непрямом антиглобулиновом тесте, считаются недостоверными.

Исследуемые эритроциты фиксируются к поверхности лунок полистироновых микропланшет (Capture-R Select). Далее в лунки добавляются соответствующие фенотипирующие реагенты. Антитела взаимодействуют с соответствующими антигенами эритроцитов, фиксированных на поверхности лунок. После короткого периода инкубации иммуноглобулины, не связавшиеся с антигенами, удаляются из лунок путем отмывания. Далее в лунки добавляются Capture-R готовые индикаторные эритроциты, которые при центрифугировании взаимодействуют с антителами, связавшимися с фиксированными эритроцитами.

В случае положительного результата индикаторные эритроциты не могут при центрифугировании мигрировать на дно лунки, поскольку они связались с антителами по всей ее поверхности. Индикаторные эритроциты образуют второй клеточный слой на поверхности лунки.

В случае отрицательного результата индикаторные эритроциты не фиксируются на поверхности лунки и при центрифугировании мигрируют, образуя компактный осадок в виде «пуговицы» на дне лунки.

Реагент

Реагент Negative Control Micro содержит буферный раствор, аналогичный таковому в антиглобулиновой сыворотке, но не содержит собственно антиглобулиновый реагент.

Реагент содержит бычий сывороточный альбумин и 0,1% азид натрия. БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (губчатого энцефалита).

Данный реагент предназначен для использования без дополнительного разведения и добавок.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.

Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).

Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагентов не допускать их контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагентов на протяжении их срока годности. Помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагенты из немаркированных флаконов.

Не использовать реагент после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

Внимание:

Не распылять реагенты при помощи рта. Существующие в настоящее время методы исследования не могут полностью гарантировать отсутствие в продуктах инфекционных агентов.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Реагенты Capture-R перед использованием должны быть согреты до комнатной температуры. Capture-R индикаторные эритроциты следует ресуспензировать, аккуратно перевернув флакон несколько раз.

Capture-R индикаторные эритроциты не следует использовать при изменении их цвета с красного на коричневый, при наличии гемолиза или если эритроциты не проходят положительный и отрицательный контроль. По мере хранения эритроцитов может иметь место легкий гемолиз. Помутнение супернатанта может означать наличие микробной контаминации.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции.

Кровь можно брать в пробирки, содержащие ЭДТА. Исследование следует производить как можно скорее после забора образца во избежание ложноположительных или ложноотрицательных реакций вследствие контаминации или неадекватных условий хранения. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент Negative Control Micro во флаконах, готовый для использования (с пипеткой для мануальных методик).

Дополнительные материалы

Для всех методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Планшеты Capture-R Select
4. Capture-R индикаторные эритроциты
5. Реагент Capture-LISS
6. Изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Для автоматического метода

1. Прибор из серии Galileo

Для полуавтоматического метода

1. Автоматические распыляющие системы ABS Precis
2. Микропланшетная центрифуга

3. Микропланшетный шейкер
4. Инкубатор
5. *Ридер I-Star (опционально)
6. Отмыватель микропланшет

Для мануального метода

1. Микропланшетная центрифуга
2. Микропланшетный шейкер
3. Инкубатор
4. Ридер I-Star (опционально)
5. Отмыватель микропланшет

Ответственность за валидацию дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Методика исследования

А. Автоматический метод

Перед загрузкой реагентов в прибор серии Galileo необходимо снять крышки с флаконов. Пипетки из снятых крышек рекомендуется выбрасывать. Изъятие пипетки из крышки производится потягиванием за грушу.

Для проведения исследования следуйте инструкции для оператора прибора.

После окончания исследования реагенты следует вынуть из прибора и закрыть крышками при этом важно крышки не перепутать во избежание кросс-контаминации. Перепутывание крышек может привести к неправильным результатам исследований.

Б. Полуавтоматический метод

1. Вскрыть упаковку с микропланшетом, использовать нужное количество стрипов
2. Правильно расположить стрипы в рамке. Обрезанный угол рамки должен располагаться слева

Прибор производит следующие этапы:

3. Разводит образцы эритроцитов фосфатно-солевым буфером (рН – 6,5 – 7,5).
4. Готовит подложку
5. Добавляет 60 мкл PBS в соответствующие лунки
6. Добавляет 40 мкл±5мкл суспензии эритроцитов в назначенные лунки для реагентов для проведения теста и контроля.

Оператор производит следующие этапы:

7. Осторожно покачивать микропланшету чтобы убедиться, что эритроциты покрыли всю поверхность дна лунок.
8. Центрифугировать 5 минут при 450-700G.**
9. Планшету следует встряхнуть, чтобы несвязанные эритроциты отошли от подложки.
10. Удалить супернатант.
11. Осторожно промыть микропланшету PBS.
12. Удалить оставшуюся жидкость и осторожно осушить стрипы.

Прибор производит следующие этапы:

13. Добавляет по 100±5 мкл реагента Capture-LISS в соответствующие лунки
14. Добавляет по 30±5 мкл соответствующих реагентов в лунки.

Оператор производит следующие этапы:

15. Осторожно перемешать
16. Инкубировать от 20 до 60 минут при 37°C.
17. Удалить супернатант
18. Тщательно промыть PBS*
19. Удалить оставшуюся жидкость и осушить стрипы

Прибор проводит следующие этапы:

20. Добавляет 50±5мкл Capture-R индикаторных эритроцитов
21. Незамедлительно центрифугировать стрип при 600-1000G в течение двух минут.
22. Читать и фиксировать результаты

* Рекомендованные дополнительные материалы включают стандартное лабораторное оборудование для профессионального использования. Ответственность за валидацию оборудования лежит на пользователе.

** Режим центрифугирования должен обеспечивать чистый супернатант и возможность легко ресуспензировать несвязанные эритроциты.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Если исследование проводится на приборе ABS, этапы 10, 11, 15, 16, 17 и 18 могут быть проведены в автоматическом режиме.

С. Мануальный метод

1. Приготовить подложку согласно инструкции к планшетам Capture-R.
2. Приготовить в пробирке суспензию исследуемых эритроцитов в PBS (фосфатно-солевой буфер, рН 6,5-7,5) в соотношении 1:20.
3. Вскрыть упаковку микропланшеты, взять нужное количество стрипов.
4. Расположить стрипы в рамке. Срезанный угол рамки должен располагаться с левой стороны.
5. Внести по 60 мкл PBS в лунки.
6. Внести по 1 капле суспензии эритроцитов (50±5мкл) в соответствующие лунки для исследования и контролей.
7. Покачать микропланшету, чтобы суспензия эритроцитов покрыла все дно лунок.
8. Центрифугировать* 5 минут при 450-700G**
9. Встряхнуть планшету, чтобы несвязанные эритроциты отделились от подложки.
10. Удалить супернатант.
11. Тщательно отмыть 6 раз фосфатно-солевым буфером.*
12. Удалить оставшуюся жидкость и осушить лунки.
13. Добавить по 2 капли (100±5 мкл) реагента Capture-LISS в соответствующие лунки.
14. Добавить по 30±5 мкл соответствующего реагента в каждую лунку.
15. Осторожно перемешать.
16. Инкубировать от 20 до 60 минут при 37°C.
17. Удалить супернатант
18. Тщательно отмыть 6 раз фосфатно-солевым буфером*
19. Удалить оставшуюся жидкость и осторожно осушить стрипы.
20. Добавить по 1 капле 50±5мкл Capture-R индикаторных эритроцитов.
21. Незамедлительно центрифугировать стрип при 600-1000G в течение двух минут.
22. Читать и фиксировать результаты.

* Рекомендованные дополнительные материалы включают стандартное лабораторное оборудование для профессионального использования. Ответственность за валидацию оборудования лежит на пользователе.

** Режим центрифугирования должен обеспечивать чистый супернатант и возможность легкого ресуспензирования несвязанных эритроцитов. Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Стабильность реакции

Результаты исследования, как мануального, так и полуавтоматического, должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную мануальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Антиген-положительные и антиген-отрицательные эритроциты должны использоваться параллельно с исследуемыми образцами. При использовании системы Galileo тест контроля качества должен проводиться ежедневно для подтверждения работоспособности реагентов.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: Наблюдается адгезия индикаторных эритроцитов Capture-R Ready-Screen по всей поверхности дна лунки.

Примечание: если отрицательный контроль дал положительную реакцию, результат исследования недействителен.

Отрицательная реакция: Индикаторные эритроциты Capture-R образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы», адгезия за пределами осадка отсутствует.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов.

При правильной калибровке системы реагент должен давать положительную реакцию силой от 2+ до 4+. Реакции 1+ и слабее должны оцениваться отдельно до постановки окончательного диагноза, поскольку они могут говорить о том, что условия исследования – температура среды, интенсивность и время центрифугирования, объемы реагентов или летучих суспензий – были неоптимальными. Снижение силы реакции также может происходить вследствие понижения экспрессии антигенов или при наличии в образце дополнительных антител.

Положительные реакции с образцами, хранившимися некоторое время, могут быть слабее, чем со свежими образцами от тех же пациентов.

Чрезмерно интенсивное центрифугирование после добавления Capture-R индикаторных эритроцитов может приводить к ложноотрицательным или сомнительным результатам вследствие повреждения подложки.

Параметры торможения центрифуги также могут влиять на результат. Длительное торможение может приводить к ложноотрицательным результатам. В то же время чрезмерно сильное торможение также может искажать результат исследования.

Контаминация Capture-R индикаторных эритроцитов плазменными белками может приводить к нейтрализации антиглобулинового реагента и связанным с этим ложноотрицательным результатам.

Неправильные результаты могут быть получены при недостаточном уровне подготовки персонала лаборатории. Технический персонал должен быть хорошо обучен технике проведения данных исследований.

Чувствительность Capture-R индикаторных эритроцитов снижается после истечения срока годности. Запрещается проводить исследование с гемолизированными образцами.

Характеристики реагентов

Перед выпуском в продажу все партии реагента проверяются во всех методиках на приборе Galileo. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону +49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com



Реагент Specimen Diluent

Раствор для проведения реакций гемагглютинации на автоматических приборах Immucor

• IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

•  Temperature Limitation

•  Disposed if markedly Lab. d



Consult Instructions for Use
Harmful, Preservative: 0.1%
Sodium Azide



Назначение: Готовый для применения изотонический раствор для разведения эритроцитов и приготовления суспензии для автоматических приборов Immucor.

Общая информация

Эритроциты, разведенные в реагенте Specimen Diluent, пригодны для проведения исследований на автоматических приборах Immucor.

Принцип

Реагент Specimen Diluent является изотоническим раствором, облегчающим ресуспензирование эритроцитов и интерпретацию результатов реакций гемагглютинации.

В некоторых исследованиях на автоматических приборах Immucor прибор вводит в лунки перед центрифугированием типизирующую сыворотку, исследуемые образцы эритроцитов и реагент Specimen Diluent. Далее прибор центрифугирует и встряхивает микропланшету для ресуспензирования эритроцитов.

Реагент

Реагент Specimen Diluent представляет собой изотонический раствор, содержащий метилцеллюлозу и азид натрия 0,1% в качестве консерванта.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидов натрия с водопроводными трубами.

Флаконы с реагентом Specimen Diluent, находящиеся в непрерывном использовании в течение 72 часов (3 дня) должны быть заменены на свежие. Флаконы, вынутые из прибора, должны храниться при температуре 1-10°C и могут использоваться в течение всего срока годности.

Хранить вскрытые флаконы при температуре 1-10°C до момента использования.

Не использовать после истечения срока годности. Не использовать флаконы с нарушенной герметичностью. Не использовать немаркированные флаконы.

Не использовать реагент в случае помутнения или изменения окраски.

Внимание: В состав упаковки входит груша из натуральной резины.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Возьмите образец крови для исследования путем стандартной венопункции. Требования к образцу крови для исследования см. в инструкциях для оператора прибора. Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки.

Не используйте для проведения исследования образцов крови, взятых в пробирки с разделительным гелем. Это может привести к получению ложноположительных результатов.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент Specimen Diluent, во флаконах с пипетками.

Дополнительные материалы

Для всех мануальных методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Фосфатно-солевой изотонический буфер (примерно 15 мМоль), pH 6,5-7,5
3. Автоматический прибор Immucor.
4. Микропланшеты для проведения исследований на автоматическом приборе.
5. Сыворотка Galileo в зависимости от вида предполагаемого исследования.

* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в архиве лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.

Проведение исследования

Для проведения исследований с микропланшетами на автоматическом оборудовании см. соответствующие инструкции для операторов.

Стабильность реакции

Для проведения исследований с микропланшетами на автоматическом оборудовании см. соответствующие инструкции для операторов.

Контроль качества

Для проведения исследований с микропланшетами на автоматическом оборудовании см. соответствующие инструкции для операторов.

Интерпретация результатов

См. инструкции к использованию сывороток, использованных в исследовании.

Примечание: Автоматические приборы Immucor производят интерпретацию результатов автоматически.

Ограничения

1. Неправильные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации реагента, при нарушении условий хранения реагента или образца крови, а также в случае, если реагент забыли добавить в состав реакционной смеси.
2. Неправильные результаты могут быть получены при нарушении техники исследования.
3. Образцы крови, взятые в пробирки с разделительным гелем, могут давать ложноположительные результаты. Пробирки с разделительным гелем не предназначены для использования их в банках крови.

Характеристики реагентов

Характеристики реагента зависят от выполнения правил его применения, изложенных в настоящей инструкции. За дополнительной информацией обращайтесь в Техническую службу Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Kolberg J, Nordhagen R. An evaluation of some factors affecting the detection of blood group antibodies by automated methods. Transfusion 1975; 15:334-339.
2. Austin EB, McIntosh Y. Anti-D quantification by flow cytometry: a comparison of five methods. Transfusion 2000; 40:77-83
3. Marsh WL, Nihcols M, Jenkins WJ. Automated detection of blood group antibodies. J Med Lab Technol 1968; 25:335-42



Реагент Capture-P

Твердофазная система для определения антител IgG против антигенов тромбоцитов

- IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
- Consult Instructions for Use
- Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
- Temperature Limitation
- Discard if markedly Left of



Назначение: Твердофазная система Capture-P® предназначена для определения антител к антигенам тромбоцитов.

Общая информация

Иммунное разрушение тромбоцитов может иметь место у пациентов с некоторыми гематологическими заболеваниями (лейкемия, СКВ и другие коллагенозы), а также как результат иммунизации после предшествующих трансфузий или беременности (1-3). Определение антител in vitro выполняется с целью их обнаружения в сыворотке пациента или донора. С этой целью исследуемая сыворотка инкубируется с подобранными тромбоцитами при оптимальных условиях для взаимодействия антител с антигенами (4).

Твердофазная система Capture-P® предназначена для выявления антител к антигенам тромбоцитов у пациентов и доноров.

Принцип

Твердофазная система выявления антител Capture-P® отличается от процедуры, описанной Rachel et al (4), Juji et al (5) и Shibata et al (6). Вначале к поверхности лунок полистироновых планшетов фиксируются тромбоциты донора (формируется подложка). Они используются для связывания антител, присутствующих в исследуемой сыворотке. После добавления в лунки сыворотки пациента производится инкубация для улучшения взаимодействия антител с антигенами. После этого несвязанные иммуноглобулины удаляются путем отмывания и в лунки добавляются индикаторные эритроциты, на которых фиксированы антитела анти-IgG. При центрифугировании эти антитела связываются с иммуноглобулинами, присоединившимися к фиксированным на поверхности лунок тромбоцитам. В случае положительного результата индикаторные эритроциты не могут мигрировать на дно лунок, поскольку они присоединены к фиксированным тромбоцитам мостиками антиген-антитело. Поэтому индикаторные эритроциты будут равномерно распределены по поверхности лунок микропланшеты. Наоборот, при отсутствии реакции индикаторные эритроциты при центрифугировании беспрепятственно перемещаются на дно лунок и образуют компактный осадок в виде «пуговицы». Возможно использование тромбоцитов, которые были заготовлены и отмывы предварительно. Для приготовления пробы можно использовать тромбоциты, отмывые от плазменных белков и клеточного детрита с помощью раствора Platelet Wash and Storage Solution.

Реагент

Реагент Capture-P®: Стрипы 1x8 с U-образной формой лунок, имеющие специальное покрытие для связывания тромбоцитов. В каждом стрипе можно провести 8 отдельных тестов. Стрипы упакованы в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности. Хранить при температуре 1-10°C. Стрип не должен использоваться, если индикатор показывает наличие чрезмерной влажности (цвет изменился с голубого на розовый). Стрипы могут использоваться как по отдельности, так и все одновременно. Неиспользованные стрипы должны быть незамедлительно вновь завернуты в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности, поскольку избыточная влажность может повредить покрытие лунок. Если при повторном открытии упаковки индикатор показывает наличие влажности, стрип использовать не должен. После вскрытия упаковки стрип должен быть использован в течение 30 минут.

Дополнительные реагенты для проведения исследования:
(поставляются отдельно)

Capture LISS: Раствор низкой ионной силы, содержит глицин, бромкрезол розовый и азид натрия 0,1% в качестве консерванта*. Хранить при температуре 1-10°C.

Capture-P готовые индикаторные эритроциты: суспензия эритроцитов, покрытых IgG кролика против антигенов человека. Реагент суспензирован в буферном растворе, содержащем в качестве консервантов хлорамфеникол (0,25 мг/мл), неомицина сульфат (0,1 мг/мл) и гентамицина сульфат (0,05 мг/мл). Хранить при 1-10°C.

Capture-P положительная контрольная сыворотка (слабая): содержит антитела к антигенам тромбоцитов. Консервант - азид натрия (0,1%)*. Хранить при 1-10°C.

Capture-P отрицательная контрольная сыворотка: не содержит антител к антигенам тромбоцитов. Консервант - азид натрия (0,1%)*. Хранить при 1-10°C.

Дополнительные реагенты могут использоваться до окончания срока годности с любой серией реагента Capture-P®.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидата натрия с водопроводными трубами.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Не использовать стрип, если индикатор влажности поменял цвет с голубого на розовый.

Взятие образцов для исследования

Источник тромбоцитов: Образцы могут быть взяты от доноров тромбоцитов на консерванты ЭДТА, ACD, CPD или CPDA-1. Образцы со сгустками брать в исследование нельзя. Плазма, богатая тромбоцитами, должна быть отделена от эритроцитов и храниться в полипропиленовых или полиэтиленовых пробирках при температуре 20-25°C. Исследование должно быть выполнено в течение 48 часов. Образцы из сегментов магистрали контейнера с тромбоконцентратом должны быть исследованы в течение 24 часов. Тромбоциты, взятые непосредственно из контейнера для заготовки тромбоконцентрата, могут быть взяты в исследование в течение всего срока их годности. (В отношении ограничений касательно исследования тромбоконцентрата см. раздел Ограничения).

Плазма или сыворотка пациентов: Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции.

Для мануальных методик можно брать кровь в пробирки, содержащие ЭДТА, ACD, CPD, CPDA-1 или в сухие пробирки без антикоагулянта. Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов рекомендуется проводить исследование как можно быстрее после заготовки.

Образцы, не предназначенные для немедленного исследования, должны храниться при температуре 1-10°C или замораживаться. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура исследования

Состав упаковки

Стрипы Capture-P® в упаковке из фольги

Дополнительные реагенты

1. Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками
2. Реагент Capture-P индикаторные эритроциты
3. Реагент Capture-P положительная контрольная сыворотка (слабая)
4. Capture-P отрицательная контрольная сыворотка

Дополнительные материалы

1. Образец тромбоцитов донора
2. Плазма или сыворотка реципиента трансфузии
3. Пластиковые пипетки
4. Полиэтиленовые или полипропиленовые пробирки 10x75 мм (стеклянные или полистереновые пробирки использоваться не должны)
5. Центрифуга с ротором для микропланшет, планшет для микротитрования или стрипов.
6. Инкубатор 37°C или нагревательный блок
7. Фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5-7,5
8. Пипетки или распыляющие системы для микропланшет
9. Таймер
10. Поверхность с подсветкой
11. Маркер
12. Центрифуга с ротором для пробирок 10x75 мм*.

Проведение исследования

Примечание: Используемые в процедуре тромбоциты должны быть совместимы с сывороткой /плазмой по системе ABO. Если тромбоциты несовместимы по ABO или группа крови не определена, тромбоциты не следует брать в исследование.

1. К моменту начала исследования все реагенты и материалы должны иметь температуру 18-30°C.
2. Приготовить образец тромбоцитов для исследования следующим образом:

а) Цельная кровь, заготовленная на антикоагулянт ЭДТА или другие: Центрифугировать 10 минут при 200G. Перенести пипеткой плазму, богатую тромбоцитами в отдельную пластиковую пробирку. (Примечание: пробирка должна быть полипропиленовая или полиэтиленовая).

б) Тромбоконцентрат, заготовленный на ACD или другой антикоагулянт: отсоединить малый контейнер, в которой содержится образец тромбоконцентрата для исследований, от основного контейнера тромбоконцентрата и перелить содержимое в пробирку (полипропиленовую или полиэтиленовую). Это может служить эквивалентом плазме, богатой тромбоцитами.

в) Тромбоциты, приготовленные и хранящиеся в растворе Platelet Wash and Storage Solution (PWSS) могут быть использованы согласно инструкции производителя. Примечание: Тромбоциты хранятся в PWSS при температуре 1-10°C, поэтому перед началом исследования им необходимо дать время согреться. При низкой температуре тромбоциты не зафиксируются должным образом на стенках лунок. Образцы тромбоцитов, хранящиеся в PWSS и имеющие признаки контаминации, подлежат утилизации.

3. Вынуть из упаковки необходимое для исследования количество стрипов. Проверить состояние индикатора влажности. Если индикатор показывает повышенную влажность, не использовать стрип.

4. Пластиковой пипеткой внести по 1-2 капли (50-100 мкл) образца тромбоцитов в пять первых лунок первого стрипа (см. рис.1). Из них одна лунка будет использована для положительного контроля (слабого), одна – для отрицательного контроля. Из оставшихся трех лунок две будут служить для определения антител (рекомендуется дублировать исследование) и последняя – для аутоконтроля тромбоцитов донора.

Примечание: Для приготовления подложки в контрольной лунке можно использовать пул тромбоцитов, совместимых по ABO. Использование таких пулов сводит риск получения отрицательной реакции со слабоположительным контролем к минимуму. Этот риск существует в том случае, если используются тромбоциты одного донора и на них необходимый антиген может отсутствовать.

5. Добавить 1-2 капли (50-100 мкл) образца тромбоцитов следующего донора в следующие три лунки. Аналогичным образом добавить в остальные стрипы остальные образцы тромбоцитов, взятые в исследование.

Рис. 1. Стрипы Capture-P

Лунки	СТРИПЫ					
	1	2	3	4	5	6
A	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○

D	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○

6. Центрифугировать планшету в течение 5 минут при 45-65G.
7. Для удаления несвязанных тромбоцитов вылить из лунок содержимое, затем промыть лунки 6 раз изотоническим раствором. Для заполнения лунок жидкостью можно использовать многоканальный дозатор, пипетку для работы с микропланшетами или полуавтоматическое устройство (например, Immiscor CSW 100), предназначенное для технологии Capture-P. В мануальном исполнении опорожнить лунки можно перевернув планшету над раковиной или контейнером для отходов и несколькими резкими движениями стряхнув из нее остатки жидкости. При опорожнении лунок не выкачивайте планшету о твердую поверхность. При использовании отмывателя CSW 100 следует иметь в виду следующее. Прибор создан для внесения жидкости в лунки и последующей аспирации жидкости. Вначале нужно выбрать необходимое количество стрипов для последующего исследования. Затем выбрать одну из приведенных в списке прибора программ отмыывания. Нажать клавишу Старт. После завершения отмыывания вынуть планшету из прибора. При отмыывании переворачивать планшету не нужно. После 6 отмыываний проверьте состояние лунок для определения их пригодности для последующего исследования. Правильно иммобилизованные тромбоциты дают картину равномерной дымчатости без потеков. Наличие потеков говорит о том, что из лунок удалены не все несвязанные тромбоциты. В этом случае отмыывание следует продолжить. **Предупреждение:** Чрезмерно интенсивное или грубое отмыывание может нарушить иммобилизацию тромбоцитов и привести к образованию «дыр» в подложке.
8. Незамедлительно добавить 2 капли (100±10 мкл) реагента Capture LISS в каждую лунку, содержащую тромбоциты. **Примечание:** Если в лунки после удаления жидкости не добавить раствор в течение 1 минуты, они начинают высыхать. Это может привести к повреждению подложки.
9. Добавить 1 каплю (50±5 мкл) реагента Capture-P положительная контрольная сыворотка (слабая) в первую лунку первого стрипа. Добавить 1 каплю (50±5 мкл) реагента Capture-P отрицательная контрольная сыворотка во вторую лунку.
10. Добавить по одной капле (50±5 мкл) сыворотки или плазмы пациента в лунки C и D стрипа 1 и других стрипов, содержащих иммобилизованные тромбоциты доноров.
11. Добавить по 1 капле (50±5 мкл) сыворотки или плазмы донора в последнюю лунку, содержащую тромбоциты данного донора (рекомендуемый аутоконтроль донора)
12. Перемешать содержимое лунок осторожным постукиванием по краям планшеты. **Примечание:** розовый цвет реагента Capture LISS в присутствии плазмы или сыворотки должен измениться на синий или бирюзовый. Если изменения цвета не произошло, это может говорить о том, что сыворотку или плазму забыли добавить в лунку.
13. Инкубировать планшету при температуре 36-38°C в течение 30-60 минут. Не инкубировать более 60 минут. Если используется сухой инкубатор, добавить ко времени инкубации 5 минут.
14. Промыть лунки 6-8 раз, обращая внимание на то, чтобы после каждого отмыывания жидкость из лунок полностью удалялась. **Предупреждение:** Чрезмерно интенсивное или грубое отмыывание может нарушить иммобилизацию тромбоцитов и привести к образованию «дыр» в подложке.
15. Незамедлительно добавить во все лунки по 1 капле (50±5 мкл) Capture-P индикаторных эритроцитов.
16. Центрифугировать планшету в течение 1 минуты при 700-900G.
17. Поместить планшету на поверхность с подсветкой и оценить наличие адгезии индикаторных эритроцитов в лунках планшеты. Положительная реакция характеризуется наличием адгезии индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки. При отрицательной реакции адгезия отсутствует и индикаторные эритроциты образуют на дне лунки компактный осадок в виде «пуговицы». Зафиксировать результаты.

18. Сравнить результат в каждой лунке с результатами положительного и отрицательного контроля и с аутоконтролем донора. В случае, если имеет место сомнительный результат (неоднородный неконцентрический осадок со стертыми границами) или наблюдается неправильный результат в контроле исследование следует повторить. Тест считается отрицательным в том случае, если в обеих реакционных лунках и в лунке аутоконтроля донора получен отрицательный результат. Тест считается положительным, если в обеих реакционных лунках получен положительный результат при отрицательном аутоконтроле донора. Если результат исследования в обеих реакционных лунках неодинаков, исследование необходимо повторить. В случае положительного аутоконтроля донора результат исследования недостоверен, поскольку в этом случае тромбоциты донора могут быть покрыты антителами *in vivo*.
19. Скорость центрифугирования приведена ориентировочно. Точные параметры центрифугирования должны быть установлены применительно к конкретной центрифуге.

Стабильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную визуальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Активность системы Capture-P оценивается при каждом исследовании путем включения в исследование положительного и отрицательного контролей. Если в каком-либо исследовании положительный контроль не дает положительный результат и/или отрицательный контроль не дает отрицательный результат, исследование необходимо повторить. Повторное получение неправильных результатов говорит о том, что како-либо из реагентов испорчен, или имеет место системная ошибка при проведении исследования.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: Адгезия индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки или по части поверхности.

Отрицательная реакция: Адгезия индикаторных эритроцитов отсутствует, эритроциты образуют компактный осадок на дне лунки.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов.

Необходимо обращать внимание на то, чтобы для исследования бралось достаточное количество тромбоцитов и они могли покрыть всю поверхность лунки. Плохое покрытие лунки тромбоцитами может привести к получению ложноположительных результатов. Недостаточное покрытие тромбоцитами может случиться при неправильном режиме центрифугирования во время приготовления подложки. Кроме того, чрезмерное или грубое отмывание может оторвать иммобилизованные тромбоциты от поверхности лунок.

Реакция антиген-антитело может быть ослаблена, если для отмывания лунок перед добавлением индикаторных эритроцитов в конечной части исследования используется незабуференный кислый раствор. Наилучшие результаты получаются при использовании для отмывания раствора с pH 6,5-7,5 (7).

При использовании образцов, содержащих большое количество тромбоцитарных агрегатов может иметь место неоднородная адгезия тромбоцитов к стенкам лунки, поскольку наряду с агрегатами адгезируются также неагрегированные тромбоциты. Агрегаты тромбоцитов могут мешать адгезии индикаторных эритроцитов при центрифугировании.

Чрезмерно интенсивное центрифугирование после добавления индикаторных эритроцитов может приводить к ложноотрицательным или сомнительным результатам вследствие повреждения подложки. Получение неправильного результата с положительным контролем (слабым) может говорить о том, что подложка повреждена.

Ложноположительный результат может иметь место в том случае, если используемые тромбоциты были покрыты антителами *in vivo* (были

положительны в прямом антиглобулиновом тесте). Такие тромбоциты дают положительный результат также в аутоконтроле. Нежелательные результаты могут быть получены также в том случае, если тромбоциты и плазма (сыворотка) не совместимы по ABO.

Добавление индикаторных эритроцитов в чрезмерных количествах может привести к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов.

На результат могут также влиять параметры торможения центрифуги. Если торможение слабое и остановка центрифуги происходит слишком долго, результат может быть ложноотрицательным. Если торможение, напротив, чересчур сильное, это также может привести к искажению результатов.

Образцы сыворотки, которая не полностью свернулась перед началом исследования, могут давать неправильные результаты. Такая сыворотка может образовывать сгустки уже после того, как она была внесена в лунки планшеты. Результатом будет образование сгустка, покрывающего подложку, что приведет к невозможности присоединения к ней индикаторных эритроцитов, невозможности интерпретации результата. После центрифугирования осадок индикаторных эритроцитов будет располагаться на сгустке, не достигая дна лунки. При покачивании планшеты сгусток также будет менять свое положение.

Результат исследования может также зависеть от концентрации тромбоцитов в образце. Если суспензия тромбоцитов имеет концентрацию ниже 10.000/мм³, подложка получится недостаточной, что приведет к получению ложноположительных результатов. При концентрации выше 350.000/мм³ могут иметь место ложноположительные результаты. Тромбоциты склонны к агрегации. Если концентрация их в суспензии высока, они образуют агрегаты при центрифугировании, которое проводится для формирования подложки. При первом отмывании тромбоциты второго слоя (то есть присоединенные не к стенке лунки, а к иммобилизованным тромбоцитам) не удаляются. Однако связь между тромбоцитами слабее, чем связь тромбоцитов со стенками лунки. Поэтому при втором отмывании, следующем за инкубацией, тромбоциты второго слоя могут оторваться от подложки вместе с антителами, которые к ним присоединились.

Суспензия тромбоцитов, имеющая концентрацию 200.000/мм³, обеспечивает достаточное количество тромбоцитов для формирования подложки. Такая суспензия выглядит немного мутной. Эта концентрация может быть определена невооруженным глазом по аналогии с тем, как опытный лаборант определяет 2-4% концентрацию эритроцитов. Суспензию тромбоцитов, имеющую концентрацию выше 350.000/мм³, перед исследованием следует развести (например, раствором PWSS).

Если индикаторные эритроциты были плохо перемешаны перед добавлением или гемолизированы, это может привести к получению ложноположительных результатов. Индикаторные эритроциты, имеющие температуру ниже 18°C, также могут дать ложноположительный результат.

Отсутствие положительного результата в положительном контроле является признаком нейтрализации индикаторных эритроцитов.

В настоящее время не существует метода, который был способен выявить все антитела против антигенов тромбоцитов.

Характеристики реагентов

В трех независимых лабораториях были проведены исследования с целью установить способность твердофазной системы Capture-P выявлять антитела против антигенов тромбоцитов в образцах сыворотки или плазмы. В каждой лаборатории использовались образцы, которые были до начала исследования верифицированы в референтных методиках (ELISA, иммунофлюоресценция или лимфоцитотоксический тест). Было показано, что в тесте Capture-P выявляются как анти-HLA-A и анти-HLA-B, так и антитела против специфических антигенов тромбоцитов (например, PI^{A1}).

Некоторые образцы сывороток пациентов, отрицательные в иммунофлюоресцентном тесте, оказались положительными в тесте Capture-P (6). Эти образцы были также протестированы в ELISA и также найдены положительными. Специфичность антител в этих образцах не определялась.

Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Перед выпуском в продажу все партии реагента проверяются с сыворотками, содержащими известные антитела анти-HLA-A и анти-HLA-B, или антитела к специфическим антигенам тромбоцитов, а

также с сыворотками, антиген не содержащими. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службы Иммунор по телефону 800-492-BLUD(2853) или 770-441-2051.

Библиография

1. Howard JE, Perkins HA. The natural history of alloimmunisation to platelets. *Transfusion* 1978;18:496
2. Ducher JP, Shiffer CA, Aisner J, Wiemik PH. Alloimmunisation following platelet transfusion: the absence of dose-response relationship. *Blood* 1981;57:395
3. Shiffer CA. Clinical importance of antiplatelet antibody testing for the blood bank. In: A seminar of antigens on blood cells and body fluids. Washington, DC: American Association of Blood Banks, 1980;189-208
4. Rachel JM, Sinor LT, Tawfic OW, Summers TC, Beck ML, Bayer WL, Plapp FV. A solid phase red cell adherence test for platelet cross-matching. *Med Lab Sci* 1985;42:194
5. Juji T, Kano K, Mitgrom F. Mixed agglutination with platelets. *Int Archs Allergy appl Immunol* 1972;42:474
6. Shibata Y, Juji T, Nishizama Y, Sakamoto H, Ozawa N. Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang* 1981;41:25
7. Rollh S, Thomas R, Fisher F, Talbot J. Antibody detection errors due to acid or unbuffered saline. *Immunohematology* 1993;9:15
8. Von dem Borne, AEG Kr, Verheugt FWA, Oosterhof F, et al. A simple immunofluorescence test to the detection of platelet antibodies. *Brit J Haematol* 1978;39:195

Реагент Capture-P Ready-Screen

Твердофазная система для определения антител IgG против антигенов тромбоцитов

- IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
- Consult Instructions for Use
- Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
- Temperature Limitation
- Discard if markedly turbid



Назначение: Реагент Capture-P® Ready-Screen предназначен для определения антител к антигенам тромбоцитов.

Общая информация

Иммунное разрушение тромбоцитов может иметь место у пациентов с некоторыми гематологическими заболеваниями (лейкемия, СКВ и другие коллагенозы), а также как результат иммунизации после предшествующих трансфузий или беременности (1-3). Скрининговое определение антител in vitro выполняется с целью их обнаружения в сыворотке пациента или донора. Реагенты для скрининговых исследований должны включать большое количество тромбоцитов для облегчения выявления наиболее часто встречающихся анти-HLA и специфических антитромбоцитарных антител. Такие антитела, особенно против HLA-антигенов, встречаются в титрах с частотой до 30%. Реагент Capture-P® Ready-Screen содержит сухие иммобилизованные мембраны тромбоцитов тринадцати доноров группы крови O. Твердофазная система выявления антител Capture-P® Ready-Screen является модификацией процедуры, описанной Rachel et al (4), Juji et al (5) и Shibata et al (6). К каждой серии реагента прилагается лист антигенов, содержащихся на мембранах тромбоцитов, для последующего анализа специфичности выявленных антител. Тест Capture-P® Ready-Screen не предназначен для того, чтобы являться единственным тестом для определения специфичности антител.

Принцип

Сыворотка донора или пациента инкубируется в лунках микропланшеты, на поверхности которых фиксированы тромбоциты для того, чтобы антитела, имеющиеся в сыворотке, фиксировались на подложке. После этого несвязанные иммуноглобулины удаляются путем отмывания и в лунки добавляются индикаторные эритроциты, на которых фиксированы антитела анти-IgG. При центрифугировании эти антитела связываются с иммуноглобулинами, присоединившимися к фиксированным на поверхности лунок тромбоцитам. В случае положительного результата индикаторные эритроциты не могут мигрировать на дно лунок, поскольку они присоединены к фиксированным тромбоцитам мостиками антиген-антитело. Поэтому индикаторные эритроциты будут равномерно распределены по поверхности лунок микропланшеты. Наоборот, при отсутствии реакции индикаторные эритроциты при центрифугировании беспрепятственно перемещаются на дно лунок и образуют компактный осадок в виде «пуговицы».

Реагент

Реагент Capture-P® Ready-Screen: Стрипы 2x8 с U-образной формой лунок, на стенках которых иммобилизованы высушенные тромбоциты. В каждом стрипе 2x8 можно провести отдельный тест выявления антител. Для покрытия 13 лунок использованы тромбоциты 13 доноров. Две дополнительные лунки содержат иммобилизованные пулы тромбоцитов нескольких доноров, эти лунки предназначены для использования с контрольными сыворотками. Стрипы упакованы в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности. Хранить при температуре 1-10°C. Стрип не должен использоваться, если индикатор показывает наличие чрезмерной влажности (цвет изменился с голубого на розовый). Стрипы могут использоваться как по отдельности, так и все одновременно. Неиспользованные стрипы должны быть незамедлительно вновь завернуты в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности, поскольку избыточная влажность может повредить покрытие лунок. Если при повторном открытии упаковки индикатор показывает наличие влажности, стрип использоваться не должен. После вскрытия упаковки стрип должен быть использован в течение 1 часа.

Лист антигенов Capture-P® Ready-Screen: Содержит фенотип всех тромбоцитов, использованных в реагенте, включая антигены HLA и специфические тромбоцитарные антигены.

Дополнительные реагенты для проведения исследования: (поставляются отдельно)

Capture LISS: Раствор низкой ионной силы, содержит глицин, бромкрезол розовый и азид натрия 0,1% в качестве консерванта*. Хранить при температуре 1-10°C.

Capture-P готовые индикаторные эритроциты: суспензия эритроцитов, покрытых IgG кролика против антигенов человека. Реагент суспензирован в буферном растворе, содержащем в качестве консервантов хлорамфеникол (0,25 мг/мл), неомицина сульфат (0,1 мг/мл) и гентамицина сульфат (0,05 мг/мл). Хранить при 1-10°C.

Capture-P положительная контрольная сыворотка (слабая): содержит антитела к антигенам тромбоцитов. Консервант - азид натрия (0,1%)*. Хранить при 1-10°C.

Capture-P отрицательная контрольная сыворотка: не содержит антител к антигенам тромбоцитов. Консервант - азид натрия (0,1%)*. Хранить при 1-10°C.

Дополнительные реагенты могут использоваться в любой комбинации до окончания срока годности с любой серией реагента Capture-P® Ready-Screen.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Не использовать стрип, если индикатор влажности поменял цвет с голубого на розовый. Тромбоциты для изготовления реагента подобраны по количеству и фенотипам таким образом, чтобы обеспечить оптимальное выявление анти-HLA и специфических антитромбоцитарных антител.

Обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Плазма или сыворотка доноров или пациентов: Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции. Образцы можно брать кровь в пробирки, содержащие ЭДТА, АСД, CPD, CPDA-1 или в сухие пробирки без антикоагулянта. Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов рекомендуется проводить исследование как можно быстрее после заготовки. Образцы, не предназначенные для немедленного исследования, должны храниться при температуре 1-10°C или замораживаться. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура исследования

Состав упаковки

1. Стрипы Capture-P® Ready-Screen в упаковке из фольги
2. Лист антигенов Capture-P® Ready-Screen.

Дополнительные реагенты

1. Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками
2. Реагент Capture-P индикаторные эритроциты
3. Реагент Capture-P положительная контрольная сыворотка (слабая)
4. Capture-P отрицательная контрольная сыворотка

Дополнительные материалы

1. Исследуемая плазма или сыворотка
2. Пластиковые пипетки
3. Пробирки
4. Центрифуга с ротором для 96-луночных микропланшет или стрипов 2x8.
5. Инкубатор 37°C или нагревательный блок
6. Фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH6,5-7,5
7. Пипетки или распыляющие системы для микропланшет
8. Таймер
9. Поверхность с подсветкой
10. Маркер

Дополнительное оборудование

Реагент Capture-P® Ready-Screen создан таким образом, чтобы для исключения мануальных этапов отмывание можно было производить с помощью автоматических отмывателей, например, Immucor CSW 100*. Это снижает риск, связанный с манипуляциями образцами сыворотки пациентов.

*Ответственность за валидацию дополнительного оборудования (перечисленного выше или другого) лежит на пользователе. Результаты исследований по валидации должны храниться в лаборатории и быть доступными для проверки соответствующими инстанциями.

Проведение исследования

1. К моменту начала исследования все реагенты и материалы должны иметь температуру 18-30°C.
2. Вынуть из упаковки необходимое для исследования количество стрипов 2x8. Проверить состояние индикатора влажности. Если индикатор показывает повышенную влажность, не использовать стрип.

Тромбоциты 1	○	○	Тромбоциты 9
Тромбоциты 2	○	○	Тромбоциты 10
Тромбоциты 3	○	○	Тромбоциты 11
Тромбоциты 4	○	○	Тромбоциты 12
Тромбоциты 5	○	○	Тромбоциты 13
Тромбоциты 6	○	○	Пустая лунка
Тромбоциты 7	○	○	Положительная контрольная сыворотка (слабая)
Тромбоциты 8	○	○	Отрицательная контрольная сыворотка

3. Внести по 2 капли (100±10 мкл) реагента Capture LISS во все лунки, предназначенные для исследования (кроме пустой лунки).
4. Прилагаемой пипеткой внести 1 каплю (50±5 мкл) реагента Capture-P положительная контрольная сыворотка (слабая) в соответствующую лунку (см. рис.1). Также внести 1 каплю (50±5 мкл) реагента отрицательная контрольная сыворотка в соответствующую лунку. Обе лунки содержат пул тромбоцитов.
5. Добавить по 1 капле (50±5 мкл) образца исследуемой плазмы или сыворотки в тестовые лунки (лунки 1-13 на рис. 1).
6. Перемешать содержимое лунок осторожным постукиванием по краям планшеты. **Примечание:** розовый цвет реагента Capture LISS в присутствии плазмы или сыворотки должен измениться на синий или бирюзовый. Если изменения цвета не произошло, это может говорить о том, что сыворотку или плазму забыли добавить в лунку.
7. Инкубировать планшету при температуре 36-38°C в течение 30-60 минут. Не инкубировать более 60 минут. Если используется сухой инкубатор, добавить ко времени инкубации 5 минут.
8. Отмыть лунки 6-8 раз для удаления иммуноглобулинов.

а. Мануальная методика отмывания

Предупреждение: При проведении мануальной методики отмывания микропланшет образуется аэрозоль. Все манипуляции с продуктами крови, при которых происходит образование аэрозоля должны производиться в соответствии со вторым режим биологической

безопасности, установленным Центром по Контролю Заболеваний департамента безопасности труда и распоряжениями администрации по здравоохранению.

- Заполните лунки стрипов изотоническим раствором при помощи многоканального диспенсера или коллатора для промывания стрипов. Можно также разлить раствор непосредственно из флакона. Раствор должен наливать в лунки без усилия.
- Опорожнить лунки, перевернув планшету над раковиной или контейнером для отходов и несколькими резкими движениями стряхнув из нее остатки жидкости. Промокните поверхность стрипа абсорбирующей бумагой. **Внимание:** Чрезмерно интенсивное или грубое отмывание может нарушить иммобилизацию тромбоцитов и привести к образованию «дыр» в подложке. В результате это приведет к получению ложноположительного результата.

б. Автоматическая методика отмывания

Предупреждение: При отмывании стрипов на автоматических приборах рамка, в которую вставлены стрипы, должна быть заполнена тестовыми или пустыми стрипами.

- Заправить прибор и магистрали изотоническим раствором для отмывания в соответствии с инструкцией изготовителя.
- Промыть каждую лунку минимум 6 раз, заполняя ее не менее чем 300 мл раствора с последующей его аспирацией вакуумным отсосом. При использовании автоматического отмывателя рекомендуется проводить два цикла по три или четыре отмывания. После первого цикла отмывания рамку рекомендуется разворачивать на 180°. Благодаря этому, если какая-либо из магистралей прибора забьется, все лунки стрипов будут адекватно отмывы.

Для отмывания лунок может быть использован прибор Immucor CSW 100. Этот отмыватель подает раствор в лунки и в дальнейшем его аспирирует. Выбрать количество отмываемых стрипов. Выбрать из списка программу для отмывания. Нажать клавишу Старт. По окончании цикла отмывания вынуть планшету из отмывателя. При работе с этим прибором разворачивать планшету нет необходимости.

Примечание: Автоматический отмыватель должен быть отрегулирован таким образом, чтобы после аспирации в лунках оставалось примерно 4-8 мкл раствора. Лунки не должны осушаться полностью.

9. Незамедлительно добавить во все лунки по 1 капле (50±5 мкл) Capture-P индикаторных эритроцитов в каждую лунку, кроме пустой.
10. Незамедлительно центрифугировать планшету в течение 1 минуты при 700-900G. Скорость и время центрифугирования приведены ориентировочно с целью достижения необходимой степени адгезии. Точные параметры центрифугирования должны быть установлены применительно к конкретной центрифуге.
11. Поместить планшету на поверхность с подсветкой и оценить наличие адгезии индикаторных эритроцитов в лунках планшеты. Для признания результата достоверным должны иметь место следующие результаты с контрольными сыворотками:

С положительной контрольной сывороткой (слабой) - наличие адгезии индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки, в зоне адгезии может наблюдаться «пуговица».

С отрицательной контрольной сывороткой - адгезия отсутствует и индикаторные эритроциты образуют на дне лунки компактный осадок в виде «пуговицы».

Если с контрольными сыворотками не получены правильные результаты, исследование необходимо повторить.

Стабильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную визуальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Активность системы Capture-P Ready-Screen оценивается при каждом исследовании путем включения в исследование положительного и

отрицательного контролей. Контрольные сыворотки должны использоваться в каждом стрипе для контроля качества реагентов и правильности выполнения методики. Повторное получение неправильных результатов говорит о том, что како-либо из реагентов испорчен, или имеет место системная ошибка при проведении исследования.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: Адгезия индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки или по части поверхности.

Отрицательная реакция: Адгезия индикаторных эритроцитов отсутствует, эритроциты образуют компактный осадок на дне лунки.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов.

Добавление индикаторных эритроцитов в чрезмерных количествах может привести к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов. Добавление их в недостаточном количестве может привести к ложноположительному результату.

Реагент Capture-P Ready-Screen предназначен для определения иммуноглобулинов IgG. Реагент не предназначен для определения IgM, IgA или компонентов комплемента.

Ла результат могут также влиять параметры торможения центрифуги. Если торможение слабое и остановка центрифуги происходит слишком долго, результат может быть ложноотрицательным. Если торможение, напротив, слишком сильное, это также может привести к искажению результатов.

Чрезмерно интенсивное центрифугирование после добавления индикаторных эритроцитов может приводить к ложноотрицательным или сомнительным результатам вследствие повреждения подложки. Получение неправильного результата с положительным контролем (слабым) может говорить о том, что проведенное центрифугирование было слишком долгим или слишком интенсивным.

Образцы сыворотки, которая не полностью свернулась перед началом исследования, могут давать неправильные результаты. Такая сыворотка может образовывать сгустки уже после того, как она была внесена в лунки планшеты. Результатом будет образование сгустка, покрывающего подложку, что приведет к невозможности присоединения к ней индикаторных эритроцитов невозможности интерпретации результата. После центрифугирования осадок индикаторных эритроцитов будет располагаться на сгустке, не достигая дна лунки. При покачивании планшеты сгусток также будет менять свое положение.

Реакция антиген-антитело может быть ослаблена, если для отмывания лунок перед добавлением индикаторных эритроцитов в конечной части исследования используется незабуференный кислый раствор. Наилучшие результаты получаются при использовании для отмывания раствора с pH 6,5-7,5 (7).

Реагент Capture-P Ready-Screen предназначен для проведения скрининговых исследований. Изолированное исследование с данным реагентом не дает возможности для окончательного заключения о специфичности антитромбоцитарных антител. Типирующие реагенты, использованные для фенотипирования тромбоцитов реагента Capture-P Ready-Screen и перечисленные в сопроводительном листе, могли содержать в дополнение к отмеченным антителам также и другие антитела. Специфичность этих реагентов устанавливалась в независимых лабораториях с использованием методик иных, чем твердофазная адгезия. В частности, специфичность анти-HLA реагентов устанавливалась с помощью лимфоцитотоксического теста, в котором могут быть выявлены цитотоксические антитела анти-HLA, но не сенсibilизация антителами анти-HLA или антитела к специфическим антигенам тромбоцитов. Дополнительные антитела в таких реагентах часто выявляются в твердофазном исследовании.

Характеристики реагентов

Перед выпуском в продажу каждая серия реагента Capture-P Ready-Screen тестируется с сыворотками, содержащими известные антитела анти-HLA, содержащими специфические антитромбоцитарные антитела и не содержащими антител.

Активность и специфичность реагента определяется в параллельных тестах, проводимых с использованием реагента для определения антител к

антигенам тромбоцитов Capture-P Solid Phase Red Cell Adherence Assay. Реагент Capture-P Ready-Screen показывает аналогичную чувствительность и специфичность, что и параллельный реагент. Эффективность методики в значительной степени зависит от точности соблюдения правил ее выполнения, изложенных в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукоп по телефону 800-492-BLUD(2853) или 770-441-2051.

Библиография

1. Howard JE, Perkins HA. The natural history of alloimmunisation to platelets. *Transfusion* 1978;18:496
2. Ducher JP, Shiffer CA, Aisner J, Wiemik PH. Alloimmunisation following platelet transfusion: the absence of dose-response relationship. *Blood* 1981;57:395
3. Shiffer CA. Clinical importance of antiplatelet antibody testing for the blood bank. In: A seminar of antigens on blood cells and body fluids. Washington, DC: American Association of Blood Banks, 1980;189-208
4. Rachel JM, Sinor LT, Tawfic OW, Summers TC, Beck ML, Bayer WL, Plapp FV. A solid phase red cell adherence test for platelet cross-matching. *Med Lab Sci* 1985;42:194
5. Juji T, Kano K, Milgrom F. Mixed agglutination with platelets. *Int Archs Allergy appl Immunol* 1972;42:474
6. Shibata Y, Juji T, Nishizama Y, Sakamoto H, Ozawa N. Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang* 1981;41:25
7. Rolih S, Thomas R, Fisher F, Talbot J. Antibody detection errors due to acid or unbuffered saline. *Immunohematology* 1993;9:15



Реагент Планшеты СМТ

Микропланшеты с покрытием для проведения реакций
геммагглютинации Immucor

• IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

• $2-8^{\circ}\text{C}$
Temperature Limitation
• Discard if markedly turbid

• Consult Instructions for Use
• Harmful, Preservative: 0.1%
Sodium Azide



Назначение: Планшеты СМТ предназначены для проведения реакций геммагглютинации Immucor.

Общая информация

Пластиковые микропланшеты используются в различных исследованиях, основанных на геммагглютинации, в качестве емкости для проведения реакций или поверхности, на которую фиксируются реагенты или исследуемые образцы.

Принцип

Исследования антигенов эритроцитов, такие как определение группы крови АВО или Rh были перенесены из пробирок в микропланшеты в начале 1970-х годов (1). Геммагглютинация – это склеивание эритроцитов, имеющих специфические антигены, соответствующими антителами. Суспензия неагглютинированных эритроцитов представляет собой однородную красную жидкость, не содержащую видимых частиц. Агглютинированная суспензия представляет собой сгустки эритроцитов в слабо окрашенной или бесцветной жидкости. При применении новых неиспользованных микропланшет при проведении теста могут возникнуть трудности. Стенки лунок могут неспецифически сорбировать эритроциты и сывороточные протеины. Отчасти это может быть обусловлено наличием электростатического заряда на поверхности лунок планшеты. Неспецифическая абсорбция может приводить к получению неправильных результатов. Для устранения этого эффекта микропланшеты покрывают свиным желатином, снимающим поверхностный заряд. Это позволяет облегчить ресуспензирование эритроцитов после центрифугирования и тем самым облегчить интерпретацию результата исследования (2-4).

Реагент

Планшеты СМТ представляют собой микропланшеты, покрытые свиным желатином с целью профилактики неспецифической абсорбции эритроцитов и сывороточных протеинов к стенкам лунок. Планшеты СМТ поставляются в формате микропланшет. Каждая планшета имеет 12 стрипов в рамке, каждый стрип имеет 8 лунок. Стрипы могут использоваться по отдельности или все сразу. Каждая планшета или стрип готовы к использованию. Стрипы планшет СМТ предназначены только для однократного использования. Хранить при температуре $1-30^{\circ}\text{C}$.

Планшеты СМТ упакованы во влагонепроницаемую фольгу с осушителем. После того, как из упаковки взяли необходимое количество стрипов, неиспользованные стрипы необходимо сразу завернуть в упаковку вместе с осушителем и индикатором влажности, поскольку влажность может повредить покрытие лунок стрипов. Повторно упакованные стрипы могут быть использованы в течение 2 месяцев (но не позднее истечения срока годности). Стрипы, вынутые из упаковки, должны быть использованы в течение 72 часов.

В нижней части метки, нанесенной на каждый стрип, нанесен 2-диапазонный штрих-код. Номер серии продукта нанесен в верхней части метки.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.

Хранить при температуре $1-30^{\circ}\text{C}$ до момента использования.

Не использовать после истечения срока годности.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Требования к процедуре взятия образцов для исследования см. в инструкциях, прилагаемых к стандартным эритроцитам и типизирующим сывороткам для иммуногематологических исследований.

Процедура исследования

Состав упаковки

Планшеты СМТ, готовые для использования.

Дополнительные материалы

Автоматическая методика

Для проведения исследований с микропланшетами на автоматическом оборудовании см. соответствующие инструкции для операторов.

Стабильность реакции

Автоматические приборы производят считывание и интерпретацию результатов автоматически.

Контроль качества

Для проведения исследований с микропланшетами на автоматическом оборудовании см. соответствующие инструкции для операторов.

Интерпретация результатов

См. инструкции к использованию стандартных эритроцитов или сывороток, используемых в исследовании.

Примечание: Автоматические приборы Immucor производят интерпретацию результатов автоматически.

Ограничения

Неправильные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации реагента, при нарушении условий хранения реагента.

Стрипы Планшет СМТ предназначены только для однократного использования. Повторное использование стрипов запрещено.

Характеристики реагентов

Перед выпуском в продажу все серии Планшет СМТ тестируются на автоматическом оборудовании с использованием стандартных эритроцитов и типизирующих сывороток и образцов сывороток и эритроцитов пациентов для проверки положительных и отрицательных реакций. Только после получения правильных результатов при этих исследованиях стрипы выпускаются в продажу. Характеристики реагента зависят от выполнения правил его применения, изложенных в настоящей инструкции. За дополнительной информацией обращайтесь в Техническую службу Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Crawford MN, Gottman CA. Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion 1970; 10:258
2. Roback JD, ed. Technical manual. 16-th ed. Bethesda MD: AABB, 2008
3. Dixon MS. Microplate: a flexible system for serologic testing, in: Myers M, Reynolds A, eds. Micromethods in blood group serology. Arlington VA: American Association of Blood Banks, 1984:37-55
4. Mallory DM, ed. Immunohematology procedures and methods. Rockville MD: American Red Cross, 1993:103-1



Реагенты для определения антигена C^W

immuClone® Anti-C^W, IgM

Для определения антигена C^W на плоскости, в пробирке или в микропланшете

immuClone® Anti-C^W Galileo, IgM

Для определения антигена C^W с помощью прибора Galileo

- IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
- Consult Instructions for Use
- Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
- C^W Temperature Limitation
- Discard if markedly turbid



Назначение: immuClone® Anti-C^W, IgM является реагентом для определения антигена C^W (RH8) на плоскости, в пробирке или в микропланшете.

immuClone® Anti-C^W Galileo, IgM является реагентом для определения антигена C^W (RH8) с помощью автоматического прибора Galileo.

Реагенты предназначены для профессионального применения, диагностики in vitro.

Общая информация

Антиген C^W является частью системы Rh, включающей более 40 антигенов и антигенных комплексов. Частота встречаемости антигена C^W сильно варьирует в разных популяциях. Среди африканской или азиатской популяций этот антиген встречается очень редко. В европеоидной популяции антиген C^W встречается в среднем в 2,6%, хотя в отдельных европейских регионах частота его встречаемости составляет до 8%. В большинстве случаев, если клетки имеют одну аллель C^W, то в качестве второй аллели присутствует C. Однако, в редких случаях в качестве второй аллели может выступать c.

Антитела анти-C^W могут вызывать посттрансфузионные осложнения и гемолитическую болезнь новорожденных.

Принцип

Реагент предназначен для проведения исследований, основанных на геммагглютинации. Если на исследуемых эритроцитах присутствует антиген C^W, то при их инкубации с антителами, входящих в состав реагента, происходит агглютинация. Отсутствие агглютинации означает отсутствие антигена C^W (RH8) (с учетом соответствующих ограничений).

Реагенты

immuClone® Anti-C^W, IgM выделен из клеточной линии человека MS-110.

Данный реагент предназначен для использования без дополнительного разведения.

Раствор, в котором содержатся антитела, включает в себя хлорид натрия, БСА, буфер и другие вещества для повышения активности реагента. БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (губчатого энцефалита). В качестве консерванта используется азид натрия (в конечной концентрации 0,1%).

Продукт стерилизован путем фильтрации через фильтр 0,22мкм.

Предупреждения

Реагент предназначен только для профессионального применения, диагностики in vitro.



Данный реагент содержит 0,1% азид натрия и классифицируется как опасный (Xn). Опасен при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Перед началом работы реагент должен согреться до комнатной температуры (18-25°C).

Во время использования реагента не допускать его контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагента на протяжении его срока годности. Помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированный реагент. Не использовать реагент с явлениями преципитации либо инородными включениями во флаконах. Не использовать реагент из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагент из немаркированных флаконов.

Не использовать реагент после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Все материалы, использованные для производства реагентов, тестировались на отсутствие инфекций HIV, HCV, HBs. Тем не менее, ни один из существующих в настоящее время тестов не дает полной гарантии инфекционной безопасности.

Внимание:

Не раскапывать реагент при помощи рта.

При производстве реагента не проводились исследования на отсутствие всех возможных возбудителей инфекционных заболеваний.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции.

Для мануальных методик можно брать кровь в пробирки, содержащие гепарин, ЭДТА, ACD, CPD, CPDA-1, CP2D или в сухие пробирки без антикоагулянта.

Для автоматических или полуавтоматических методик может потребоваться кровь, заготовленная на антикоагулянте (см. инструкции к используемым аппаратам).

Если исследование проводится на аппарате Galileo, в качестве антикоагулянта можно использовать только ЭДТА. Образцы крови, взятые в сухие пробирки использоваться не должны во избежание блокирования магистралей аппарата.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней; образцы, взятые в сухие пробирки – до 21 дня. Образцы, взятые на гепарин, ACD, CPD, CPD-A, CP2D могут быть исследованы в сроки, указанные для соответствующих антикоагулянтов.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент immuClone® Anti-C^W, IgM во флаконе, готовый для использования (с пипеткой для мануальных методик).

Дополнительные материалы

Для всех мануальных методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Метод исследования в пробирках

1. Пипетки
2. Пробирки 10x75мм или 12x75мм, штатив для пробирок
3. Центрифуга*
4. Таймер

Метод исследования на микропланшетах (мануальный)

1. Пипетки или распыляющие системы (например, ABS Precis, Hamilton Microlab AT, Packard Multiprobe 104/204)
2. Микропланшеты
3. Микропланшетная центрифуга (например, Sorvall T6000, IEC Centra-8, Jouan C422, Hettich 30F, Heraeus Labofuge 400)
4. Механический микропланшетный шейкер (например, Titramax 31D1)
5. Микропланшетный ридер (например, I-STAR)

Метод исследования на плоскости

1. Стеклопластиковая планшета
2. Маркер
3. Аппликаторные палочки (для стеклянной поверхности)
4. Таймер
5. Пипетки

Метод с применением аппарата Galileo

1. Аппарат Galileo
2. Микропланшеты для аппарата Galileo
3. Разводящий раствор Galileo

Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Проведение исследования

А. Метод исследования в пробирках

1. Промаркировать по одной пробирке для каждого используемого в исследовании реагента
2. Внести по 1 капле (примерно 50мкл) реагента immuClone® Anti-C^w, IgM в соответствующие пробирки
3. Добавить по 1 капле (примерно 50мкл) 3-5% суспензии исследуемых эритроцитов, суспензированных в физиологическом растворе. (Перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть).
4. Содержимое пробирок перемешать, затем центрифугировать.*
5. Осторожно встряхнуть пробирки, чтобы ресуспендировать осадок. Оценить наличие агглютинации.
6. Фиксировать результаты исследования.

* Рекомендуемый режим центрифугирования: 15-30 секунд при 900-1000G или режим, рекомендованный для данной центрифуги, обеспечивающий наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющий возможность легкого ресуспендирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать. Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Отрицательные и слабоположительные результаты необходимо подтверждать. Для этого реакционную смесь инкубировать в течение 5 минут при 37°C, затем повторить этапы 4 и 5. Эта методика усилит реакцию в случае, если имеется редкий фенотип антигена.

В. Метод исследования на микропланшетах

1. Промаркировать микропланшеты.
2. Внести по 1 капле реагента в соответствующие промаркированные лунки микропланшет.

3. Приготовить 2-4% суспензию исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе (перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть). Эритроциты можно брать для разведения при помощи аппликаторной палочки.
4. Добавить по 1 капле суспензии исследуемых эритроцитов (примерно 50мкл) в каждую лунку микропланшет.
5. Тщательно перемешать реакционную смесь либо покачивая микропланшеты вручную, либо используя шейкер.*
6. Инкубировать планшеты в течение 15-20 минут при комнатной температуре (18-30°C).
7. Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, обеспечивающем оптимальную реакцию.**
8. Встряхнуть микропланшеты для ресуспендирования неагглютинированных эритроцитов вручную, либо с помощью микропланшетного встряхивателя. Оценить агглютинацию в каждой лунке. Для этой цели может быть также использовано зеркало или микропланшетный ридер.
9. Фиксировать результаты.

* Предполагаемое время работы для механического шейкера: 1) Перемешивание: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности. 2) Ресуспендирование: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности или время и скорость, рекомендованное для данного прибора производителем. Режим должен обеспечивать полное ресуспендирование, но не разрушать агглютинаты эритроцитов.

** При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать. Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

С. Метод исследования на плоскости

1. Промаркировать планшеты, на которых будет проводиться исследование
2. Поместить на планшеты по одной капле (примерно 50мкл) реагента. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.
3. Добавить по одной капле исследуемой цельной крови (или 35-45% суспензии эритроцитов в физиологическом растворе или совместимой сыворотке или плазме) при помощи пипетки или аппликаторной палочки.
4. Отдельными палочками перемешать реагенты и образцы крови с тем, чтобы получились овальные капли примерно 20x40 мм. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя.
5. Наблюдать появление макроскопически регистрируемой агглютинации. На стеклянной поверхности при медленной ротации агглютинация появляется в течение 2 минут. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя. Не путать высыхание краев капли и нити фибрина с агглютинацией.
6. Фиксировать результаты.

Метод с применением аппарата Galileo

Перед тем, как поместить реагенты в аппарат, все колпачки с флаконов должны быть сняты. При этом рекомендуется выбрасывать пипетку. Это легко сделать путем надавливания на пипетку со стороны гриппа.

При помещении реагентов в аппарат и проведении исследования руководствоваться инструкцией к аппарату.

После окончания работы вынуть из аппарата и флаконы с реагентами вновь закрыть. Во избежание кроссконтаминации и получения некорректных результатов не путать крышки флаконов.

Стабильность реакции

Все результаты должны фиксироваться тотчас после окончания исследования. В дальнейшем может иметь место диссоциация комплексов антиген-антитело, что приведет к получению ложноотрицательных (или, как минимум, ложных «слабых») результатов. Результаты исследования на плоскости также должны оцениваться незамедлительно во избежание высыхания планшет и ошибочной интерпретации таких результатов, как

положительных. Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после встряхивания планшеты после центрифугирования. В противном случае возможна ошибочная интерпретация результатов как вследствие диссоциации агглютинатов, так и вследствие повторного оседания эритроцитов.

Контроль качества

Для контроля активности реагента immuClone® Anti-C^w рекомендуется в каждый день использования реагента проверять его активность с антиген-положительными и антиген-отрицательными эритроцитами. Если реагент удовлетворительно реагирует с антиген-положительными эритроцитами и не реагирует с антиген-отрицательными, он считается пригодным для работы.

Интерпретация результатов

Положительная реакция:

С учетом возможных ограничений (см.) считается, что появление агглютинации в реакции с реагентом immuClone® Anti-C^w означает наличие антигена C^w (RH8) на исследуемых эритроцитах.

Отрицательная реакция:

Если реакция исследуемых эритроцитов с реагентом immuClone® Anti-C^w не приводит к появлению агглютинации считается, что антиген C^w (RH8) на этих эритроцитах отсутствует (с учетом возможных ограничений – см.)

Примечание: Если параллельно с исследованием проводится отрицательный контроль, например, с реагентом immuClone® Rh-Hr control, и при этом в контроле получен положительный результат, определение антигена считается недостоверным.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов. Многие человеческие моноклональные IgM против антигенов системы Rh имеют также холодовую анти-I/i активность, особенно с образцами пуповинной крови или эритроцитами, обработанными протеолитическими ферментами. Эта активность может проявляться, если исследование проводится при температуре, ниже рекомендованной.

Эритроциты, положительные в прямом антиглобулиновом тесте, могут давать ложноположительные результаты. Для исключения подобных ошибок рекомендуется использовать реагент immuClone® Rh-Hr Control.

При использовании микропланшетного метода новые, не бывшие в употреблении пластиковые планшеты могут пассивно сорбировать на свою поверхность клетки и сывороточные протеины. Эта неспецифическая абсорбция может приводить к искажению результатов.⁵ Каждая получаемая партия микропланшет должна валидироваться пользователем на предмет пригодности для использования. При необходимости микропланшеты можно обрабатывать до использования для предотвращения неспецифической абсорбции. В качестве блокирующих реагентов могут применяться БСА (1-2%) или 1% желатин. Раствор следует инкубировать в лунках в течение 10 минут при 18-30°C, затем промыть лунки дистиллированной или деионизированной водой. После промывания максимально удалить воду из лунок и дать микропланшетам полностью высохнуть перед использованием.

Недостаточное или избыточное центрифугирование могут также приводить к ложноотрицательным и ложноположительным результатам.

Аутоантитела, активные при комнатной температуре, могут приводить к ошибкам при определении фенотипа эритроцитов. Предсказать существование этих антител до проведения теста невозможно. Они могут вызывать неспецифическую агглютинацию аутоэритроцитов, если определение фенотипа проводится без предварительного отмывания эритроцитов или ресуспензирование эритроцитов после отмывания проводилось в плазме или сыворотке. Для исключения подобных ошибок рекомендуется использовать реагент immuClone® Rh-Hr Control.

Для определения антигена C^w не рекомендуется использовать гемолизированные образцы, а также образцы с бактериальной контаминацией.

Характеристики реагентов

Перед выпуском в продажу каждый лот реагента immuClone® Anti-C^w, IgM проходит контроль активности. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
2. Issitt P.D and Anstee D.J. Applied Blood Group Serology 4-th Edition, Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1998, Chapter 12
3. Daniels, G. Human Blood Groups, Blackwell Science Ltd, 1995, Chapter 5
4. Guidelines for Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 5-th Edition 2001. The Stationary Box
5. Crawford MN, Gottman FE, Gottman CA. Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion 1970;10:258



Реагент ПАГТ-Положительные Контрольные Эритроциты

Предназначен для использования с автоматическими приборами Иммукор



Назначение: ПАГТ-Положительные Контрольные Эритроциты предназначены для использования только с автоматическими приборами Иммукор. Эритроциты sensibilized IgG, благодаря чему являются положительными в прямом антиглобулиновом тесте (ПАГТ). Они используются в качестве положительного контроля в исследованиях, использующих прямой антиглобулиновый тест на автоматических приборах Иммукор.

Общая информация

Для использования в качестве положительного контроля в прямом антиглобулиновом тесте в твердофазных методиках эритроциты покрывают IgG. Если из-за недостаточного отмывания IgG человека даже в небольших количествах попадает к Capture-R индикаторным эритроцитам, антиглобулиновый реагент на индикаторных эритроцитах может быть инактивирован, что приведет к получению ложноотрицательного результата.

Прямой антиглобулиновый тест предназначен для определения IgG, фиксированных на поверхности эритроцитов донора или пациента (1-3). При проведении исследования важно включать в него контроли для проверки работы реагента. Для валидации отрицательных результатов теста предназначены ПАГТ-положительные эритроциты, представляющие собой пул эритроцитов группы O, sensibilized IgG.

Принцип

Антиглобулиновый тест используется для выявления IgG на поверхности эритроцитов. Если у пациента имеет место гемолиз, с помощью антиглобулинового теста можно установить, имеет ли этот гемолиз иммунную природу. Наиболее часто положительный прямой антиглобулиновый тест наблюдается при наличии тепловых аутоантител. Также IgG могут наблюдаться на эритроцитах после несовместимых трансфузий. Поэтому ПАГТ рутинно применяется при исследовании всех трансфузионных реакций.

IgG, покрывающие контрольные или исследуемые эритроциты, могут быть обнаружены при помощи индикаторных эритроцитов, покрытых анти-IgG. После добавления индикаторных эритроцитов планшета центрифугируется. Фиксация индикаторных эритроцитов на поверхность лунок является положительным результатом. В случае отрицательного результата индикаторные эритроциты образуют компактный осадок на дне лунок в виде «пуговицы». Ложноотрицательный результат имеет место при инактивации антиглобулинового компонента индикаторных эритроцитов вследствие:

1. Контаминации флакона с эритроцитами плазменными белками
2. Недостаточного отмывания лунок от плазменных белков.

Положительный результат с реагентом ПАГТ-Положительные Контрольные Эритроциты означает, что индикаторные эритроциты не инактивированы и результатам исследования можно доверять. Отрицательный результат с данным реагентом означает инактивацию индикаторных эритроцитов до или во время использования.

Реагент

ПАГТ-Положительные Контрольные Эритроциты: один флакон пулированных эритроцитов группы O в виде 4-6% суспензии в буферном консервирующем растворе, содержащем аденозин и аденин для предотвращения гемолиза в течение срока годности.

В качестве консервантов используются хлорамфеникол (0,25 мг/мл), неомицин сульфат (0,1 мг/мл) и гентамицина сульфат (0,05 мг/мл).

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.

Перед использованием эритроциты следует ресуспензировать, осторожно перевернув флакон несколько раз.

Хранить при температуре при 1-10°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

Избегайте контаминации реагентов. Контаминация отрицательно сказывается на чувствительности реагентов и сроке их годности. Не используйте контаминированных реагентов. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности. Не используйте реагенты из негерметичных флаконов. Не используйте реагенты из немаркированных флаконов.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Упаковка включает грушу из натуральной резины.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Процедура проведения исследования

A. Состав упаковки

ПАГТ-Положительные Контрольные Эритроциты во флаконе в пипеткой, готовые к использованию.

Дополнительные материалы

См. инструкции для оператора прибора.

Проведение исследования

Автоматический метод исследования

Для проведения исследований на автоматическом приборе см. соответствующую инструкцию для оператора.

Стабильность реакции

Автоматические приборы Иммукор производят считывание результатов непосредственно после его окончания. Результат не может быть прочитан вне прибора.

Автоматические приборы Иммукор сохраняют информацию после считывания результата и хранят ее для формирования отчета об исследовании.

Интерпретация результатов

С реагентом ПАГТ-Положительные Контрольные Эритроциты всегда должен получаться положительный результат. Положительный результат означает, что IgG, покрывающие индикаторные эритроциты, не инактивированы и активны. Отрицательный результат говорит о том, что иммуноглобулиновое покрытие индикаторных эритроцитов повреждено или инактивировано.

Если результат исследования с ПАГТ-Положительными Контрольными Эритроцитами отрицательный или сопутствующий положительный контроль положителен, исследование не может быть признано достоверным.

Примечание: автоматические приборы Иммукор проводят интерпретацию результатов автоматически.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов или неадекватном режиме хранения реагента. ПАГТ-Положительные эритроциты предназначены для контроля активности и специфичности реагентов в антиглобулиновых тестах. Использование ежедневного контроля качества не гарантирует от контаминации и инактивации реагентов в ходе работы.

Реагент ПАГТ-Положительные Контрольные Эритроциты предназначен только для контрольных исследований *in vitro*. Он не должен использоваться для диагностических исследований с образцами донора или пациента.

Некоторые дополнительные ограничения, связанные с использованием автоматических приборов, описаны в инструкциях для операторов приборов.

Характеристики реагентов

Перед выпуском продукта в продажу он тестируется в соответствии с методом, для которого он создан, для подтверждения его пригодности для использования в автоматических приборах Иммукор.

Характеристики продукта соответствуют целям его применения. За дополнительной информацией обращайтесь в Техническую службу 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Срок годности реагента ПАГТ-Положительные Контрольные Эритроциты составляет 67 дней со дня производства; день заготовки крови совпадает с днем производства.

Библиография

1. Boral LI, Henry JB. The type and screen: a safe alternative and supplement in selected surgical procedures. *Transfusion* 1977;17:163
2. Giplett ER. Blood group alloantibodies: an assessment of laboratory practices. *Transfusion* 1977;17:299
3. Rqualt CL. Appropriate pretransfusion testing, in: Pretransfusion testing for the "80"s. Washington DC: American Assotiation of Blood Banks, 1980:125.
4. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
5. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. *Am J Clin Pathol* 1984;82:719
6. Juji T, Kano K, Milgrom F. Mixed agglutination with platelets. *Int Arch Allergy* 1972;42:474
7. Beck ML, Rahel JM, Sinor LT et al. Semiautomated solid phase adherence assays for pretransfusion testing. *Med Lab Sci* 1984;41:374
8. Rolih SD, Eisinger RW, Moheng NC et al. Solid phase adherence assays: alternatives for conventional blood bank tests. *Lab Med* 1985;16:766
9. Rolih S, Thomas R, Fisher F et al. Antibody detection errors due to acidic or unbuffered saline. *Immunohematolgy* 1993;9:15

CE
0088

Реагент для определения антигена D NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG

Для определения антигена D (Rh1) на плоскости, в пробирке, в микропланшете или в непрямом антиглобулиновом тесте

- IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
- Consult Instructions for Use
- Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
- Temperature Limitation
- Do not use if markedly discolored



Назначение: NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG является реагентом для определения антигена D (Rh1) на плоскости, в пробирке, в микропланшете или в непрямом антиглобулиновом тесте.

Общая информация

Антиген Rh₀(D) был открыт в 1939 году. После этого было открыто более 50 других антигенов, относящихся к этой же системе антигенов.

Большинство антигенов системы Rh иммуногенны и способны вызывать выработку антител при беременности или гемотрансфузии. Антиген D среди них наиболее иммуногенен и по различным данным вызывает выработку анти-D антител у D-отрицательных индивидов после экспозиции антигена в 50-85% случаев. Анти-D антитела являются клинически важными антителами, поскольку они способны вызывать тяжелую гемолитическую болезнь новорожденных (ГБН) и посттрансфузионные реакции. Наличие антигена D, а также его слабых форм, ранее называвшихся D^U, необходимо учитывать при подборе крови для трансфузии. Определение слабых форм антигена D может требовать проведения непрямого антиглобулинового теста.

Традиционно используемые термины Rh-положительный и Rh-отрицательный относятся к наличию или отсутствию антигена D. Частота встречаемости Rh-положительных людей в европеоидной популяции составляет 85%. Более детальную информацию о системе Rh, вариантах ее наследования и номенклатуре можно получить из литературы, приведенной в библиографии.

Принцип

Реагент предназначен для проведения исследований, основанных на эритроагглютинации. Если на исследуемых эритроцитах присутствует антиген D, то при их инкубации со смесью антител, входящих в состав реагента, происходит агглютинация. Визуально агглютинация может наблюдаться после центрифугирования. Отсутствие агглютинации означает отсутствие антигена D (Rh1) (с учетом соответствующих ограничений).

Компонент IgM анти-D, входящий в состав реагента, вызывает прямую агглютинацию эритроцитов, имеющих нормальный антиген D и большинства образцов, имеющих слабые варианты антигена D. Компонент IgG агглютинирует эритроциты, в том числе имеющие наиболее слабые варианты антигена D в непрямом антиглобулиновом тесте.

Реагенты

Реагент NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG является смесью человеческих моноклональных антител IgM анти-D (клон D175) и человеческих моноклональных IgG анти-D (клон D415). Реагент NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG предназначен для проведения качественных исследований на плоскости, в пробирке или на микропланшете для определения антигена D на эритроцитах человека. Раствор, в котором содержатся антитела, включает в себя хлорид натрия, БСА, буфер и другие реагенты для повышения активности реагента. В качестве антимиicrobialного агента раствор содержит азид натрия в концентрации 0,1%.

Данный реагент предназначен для использования без дополнительного разведения.

БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск

трансмиссии TSE (губчатого энцефалита). В качестве консерванта используется азид натрия (в конечной концентрации 0,1%).

Предупреждения

Реагент предназначен только для профессионального применения, диагностики in vitro.



Данный реагент содержит 0,1% азид натрия и классифицируется как опасный (Xn). Опасен при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Перед началом работы реагент должен согреться до комнатной температуры (18-25°C).

Во время использования реагента не допускать его контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагента на протяжении его срока годности. Помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированный реагент. Не использовать реагент с явлениями преципитации либо инородными включениями во флаконах. Не использовать реагент из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагент из немаркированных флаконов.

С реагентом следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом, поскольку ни один из существующих в настоящее время тестов не дает полной гарантии инфекционной безопасности.

Внимание:

Не раскапывать реагент при помощи рта.

При производстве реагента не проводились исследования на отсутствие всех возможных возбудителей инфекционных заболеваний.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Не использовать реагент после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции.

Для мануальных методик можно брать кровь в пробирки, содержащие гепарин, ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D или в сухие пробирки без антикоагулянта.

Для автоматических или полуавтоматических методик может потребоваться кровь, заготовленная на антикоагулянте. Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней; образцы, взятые в сухие пробирки – до 21 дня. Образцы, взятые на гепарин, ACD, CPD, CPD-A, CP2D могут быть исследованы в сроки, указанные для соответствующих антикоагулянтов.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG во флаконе, готовый для использования (с пипеткой для мануальных методик).

Дополнительные материалы

Для всех мануальных методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Метод исследования в пробирках

1. Пипетки
2. Пробирки 10x75мм или 12x75мм, штатив для пробирок
3. Центрифуга
4. Таймер

Метод определения слабого варианта антигена D

1. Пипетки
2. Пробирки 10x75мм или 12x75мм, штатив для пробирок
3. Центрифуга
4. Таймер
5. Инкубатор 37°C
6. Антиглобулиновый реагент
7. Эритроциты, сенсibilизированные IgG (для контроля теста Кумбса)

Метод исследования на микропланшетах (мануальный)

1. Пипетки или распыляющие системы (например, ABS PreciS, Hamilton Microlab AT, Packard Multiprobe 104/204)
2. Микропланшеты
3. Микропланшетная центрифуга (например, Sorvall T6000, IEC Centra-8, Jouan C422, Hettich 30F, Heraeus Labofuge 400)
4. Механический микропланшетный шейкер (например, Titramax 3101)
5. Микропланшетный ридер (например, I-STAR)

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Метод исследования на плоскости

1. Стеклоянная или пластиковая планшета
2. Маркер
3. Аппликаторные палочки (для стекляннoй поверхности)
4. Таймер
3. Пипетки

Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Проведение исследования

A. Метод исследования в пробирках

1. Промаркировать по одной пробирке для каждого используемого в исследовании реагента
2. Внести по 1 капле (примерно 50мкл) реагента NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG в соответствующие пробирки
3. Добавить по 1 капле (примерно 50мкл) 2-4% суспензии исследуемых эритроцитов, разведенных в физиологическом растворе. (Перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть для снижения риска аномальных реакций). Содержимое пробирок перемешать, затем центрифугировать.*
4. Осторожно встряхнуть пробирки, чтобы ресуспендировать осадок. Оценить наличие агглютинации.
5. Фиксировать результаты исследования.

* Рекомендуемый режим центрифугирования: 15-30 секунд при 900-1000G. При центрифугирования должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать. Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых слабых фенотипов антигена D может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентом в течение

15 минут при температуре 37°C с последующим центрифугированием (см. пункты 4-5). Слабая реакция с реагентом NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG может быть также усилена имкубации в течение 5 минут при комнатной температуре (18-25°C) с последующим центрифугированием (см. пункты 4-5).

B. Непрямой антиглобулиновый тест для выявления слабых вариантов антигена D

1. Приготовить 2-4% суспензию исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе. Перед приготовлением суспензии эритроциты должны быть отмыты как минимум однократно.*
2. Внести 1 каплю (примерно 50мкл) реагента NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG в предварительно промаркированную пробирку.
3. Добавить 1 каплю (примерно 50мкл) суспензии исследуемых эритроцитов.
4. Перемешать и инкубировать 15 минут при 37°C.
5. Отмыть эритроциты физиологическим раствором 1 раз, тщательно удалить супернатант. Поскольку реагент NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG имеет низкое содержание протеина, однократного отмывания достаточно.
6. Добавить две капли антиглобулинового реагента, осторожно перемешать и центрифугировать.**
7. Осторожно встряхнуть пробирку. Оценить наличие агглютинации макроскопически. Не исследовать содержимое пробирки под микроскопом.
8. Фиксировать результаты.
9. Для контроля отрицательного результата необходимо проводить параллельное исследование с эритроцитами, сенсibilизированными IgG (клетки для контроля теста Кумбса). Если в контрольном исследовании получен также отрицательный результат, исследование считать недостоверным.

* Предполагается, что перед проведением антиглобулинового теста исследуемые эритроциты как минимум однократно отмываются в физиологическом растворе с последующим ресуспендированием в физиологическом растворе до 2-4% концентрации. В тесте не должны использоваться эритроциты неомытые, либо ресуспендированные в плазме или сыворотке.

** Рекомендуемый режим центрифугирования: 15-30 секунд при 900-1000G. При центрифугирования должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать. Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

C. Метод исследования на микропланшетах

1. Промаркировать микропланшеты.
2. Внести по 1 капле реагента (примерно 50мкл) в соответствующие промаркированные лунки микропланшет.
3. Приготовить 2-4% суспензию исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе (перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть).
4. Добавить по 1 капле суспензии исследуемых эритроцитов (примерно 50мкл) в каждую лунку микропланшет.
5. Тщательно перемешать реакционную смесь либо покачивая микропланшеты вручную, либо используя шейкер.*
6. Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, обеспечивающем оптимальную реакцию.**
7. Встряхнуть микропланшеты для ресуспендирования неагглютинированных эритроцитов вручную, либо с помощью микропланшетного встряхивателя. Оценить агглютинацию в каждой лунке. Для этой цели может быть также использовано зеркало или микропланшетный ридер.
8. Фиксировать результаты.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых редких фенотипов антигенов может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5-60 минут при температуре 18-30°C.

* Предполагаемое время работы для механического шейкера: 1) Перемешивание: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности. 2) Ресуспензирование: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности или время и скорость, рекомендованное для данного прибора производителем. Режим должен обеспечивать полное ресуспензирование, но не разрушать агглютинаты эритроцитов.

** Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, рекомендованном для данной центрифуги, обеспечивающем наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющем возможность легкого ресуспензирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговка» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспензировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

D. Метод исследования на плоскости

1. Промаркировать планшеты, на которых будет проводиться исследование
2. Поместить на отдельные планшеты по одной капле (примерно 50 мкл) реагента. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.
3. Добавить по одной капле исследуемой цельной крови (или 35-45% суспензии эритроцитов в физиологическом растворе или совместимой сыворотке или плазме) к каждому реагенту.
4. Отдельными палочками перемешать реагенты и образцы крови с тем, чтобы получились овальные капли примерно 20x40 мм. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя.
5. Наблюдать появление макроскопически регистрируемой агглютинации. На стеклянной поверхности при медленной ротации агглютинация появляется в течение 2 минут. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.
6. Фиксировать результаты.

Стабильность реакции

Все результаты должны фиксироваться тотчас после окончания исследования. В дальнейшем может иметь место диссоциация комплексов антиген-антитело, что приведет к получению ложноотрицательных (или, как минимум, ложных «слабых») результатов. Результаты исследования на плоскости также должны оцениваться незамедлительно во избежание высыхания планшет и ошибочной интерпретации таких результатов, как положительные. Результаты исследования в микропланшетах должны фиксироваться тотчас после встряхивания планшеты после центрифугирования. В противном случае возможна ошибочная интерпретация результатов как вследствие диссоциации агглютинатов, так и вследствие повторного оседания эритроцитов.

Контроль качества

Для контроля активности реагента NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG рекомендуется ежедневно проверять реагент с антиген-положительными и антиген-отрицательными эритроцитами, например, Immucor corQC. Если реагент удовлетворительно реагирует с антиген-положительными эритроцитами и не реагирует с антиген-отрицательными, он считается пригодным для работы.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Интерпретация результатов

Положительная реакция (на плоскости, в пробирке или в микропланшете):

С учетом возможных ограничений (см.) считается, что появление агглютинации в реакции с реагентом NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG означает наличие антигена D на исследуемых эритроцитах.

Очень слабая агглютинация может означать наличие слабой или вариантной формы антигена (см. Ограничения ниже).

Положительная реакция (в непрямом антиглобулиновом тесте):

Появление положительной реакции только в непрямом антиглобулиновом тесте с реагентом NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG говорит о наличии слабого фенотипа антигена D.

Примечание: Если контрольная реакция с клетками для контроля теста Кумбса отрицательна, результаты исследования считаются недостоверными.

Отрицательная реакция:

Если реакция исследуемых эритроцитов с реагентом NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG не приводит к появлению агглютинации считается, что антиген D на этих эритроцитах отсутствует (с учетом возможных ограничений – см.)

Если исследуемые эритроциты положительны в прямом антиглобулиновом тесте, положительная реакция в непрямом антиглобулиновом тесте не может говорить о наличии слабого варианта антигена D (см. Ограничения ниже).

Примечание: если исследуемые эритроциты дают положительный контроль, исследование считается недостоверным.

Ограничения

В редких случаях эритроциты, покрытые *in vivo* иммуноглобулинами, могут давать агглютинацию в некоторых реакционных растворах. Обычно это явление возникает при использовании реагентов, имеющих высокое содержание протеинов и высокомолекулярных веществ. Реагент NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG имеет низкое содержание протеинов и потому как правило не вызывает спонтанной агглютинации. В очень редких случаях, однако, если эритроциты имеют на поверхности большое количество иммуноглобулинов, может наблюдаться их спонтанная агглютинация также в растворах, имеющих низкое содержание протеинов. В этих случаях аналогичное явление будет отмечаться также в тестах для определения группы крови ABO. Поэтому параллельно с подобными исследованиями целесообразно проводить контрольный тест с реагентом immuClone® Rh-Hr Control или 6-8% BCA. Если реакция с контрольным реагентом оказывается положительной, интерпретация определения антигенов невозможна.

Использование в исследовании неотмытых эритроцитов может приводить к ложноположительным реакциям, связанных с формированием монетных столбиков или наличием аутоантител. Рутинное использование отмытых и ресуспензированных в физиологическом растворе эритроцитов позволит снизить риск получения ложноположительных результатов.

Неотмытые эритроциты или эритроциты, ресуспензированные в аутоплазме или сыворотке нельзя использовать при проведении непрямого антиглобулинового теста для определения слабых вариантов антигена D. Это может привести к нейтрализации антиглобулинового реагента и, как следствие, к получению ложноотрицательных результатов. Если в исследование взяты неотмытые эритроциты, то перед добавлением антиглобулинового реагента их надо отмыть 3-4 раза для удаления остаточных сывороточных IgG.

В качестве отрицательного контроля непрямого антиглобулинового теста должен ставиться либо прямой антиглобулиновый тест либо непрямым антиглобулиновым тест с контрольным (отрицательным) реагентом (например, 6-8% BCA).

Некоторые образцы эритроцитов, имеющие слабую или вариантную форму антигена D (Rh1), могут давать более слабую реакцию с реагентом анти-D. Кроме того, настоящий реагент может давать слабopоложительные реакции с некоторыми образцами D_{weak} и вариантными формами антигена D, (например, R₀^{low}, фенотип Craftword, и т.д.), которые были при исследовании с другими реагентами ранее документированы, как D-отрицательные.

Ложноотрицательные результаты, а также ослабленные реакции можно наблюдать в тех случаях, когда интерпретация результатов производилась не сразу после окончания исследования, а спустя некоторое время, или если ресуспензирование эритроцитов после центрифугирования производилось излишне энергично.

Реагент NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG не должен использоваться для проведения исследования с эритроцитами, обработанными протеолитическими ферментами. Кроме того, для того, чтобы свести к минимуму возможность неспецифических реакций, исследование не следует проводить в холодных условиях. Перед началом исследования

необходимо убедиться, что реагенты и материалы имеют комнатную температуру (18-25°C).

* Ложноотрицательные или ослабленные реакции могут иметь место в случаях, когда эритроциты до проведения исследования хранились слишком долго или при неадекватных условиях.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты также могут иметь место при нарушении техники исследования, нарушении условий центрифугирования и инкубации, нарушениях при обработке многофазовых материалов, изменениях pH растворов или контаминации материалов.

* Недостаточное или избыточное центрифугирование могут также привести к ложноотрицательным и ложноположительным результатам.

При использовании микропланшетного метода новые, не бывшие в употреблении пластиковые планшеты могут пассивно сорбировать на свою поверхность клетки и сывороточные белки. Эта неспецифическая абсорбция может приводить к искажению результатов.⁵ Каждая получаемая партия микропланшетов должна валидироваться пользователем на предмет пригодности для использования. При необходимости микропланшеты можно обрабатывать до использования для предотвращения неспецифической абсорбции. В качестве блокирующих реагентов могут применяться БСА (1-2%) или 1% желатин. Раствор следует инкубировать в лунках в течение 10 минут при 18-30°C, затем промыть лунки дистиллированной или деионизированной водой. После промывания максимально удалить воду из лунок и дать микропланшетам полностью высохнуть перед использованием.

* Соблюдение настоящих правил может приводить к снижению активности реагентов. Исследование на плоскости может быть недостаточно чувствительным для достоверного определения антигенов со сниженной экспрессией. Модификации, вносимые пользователем в методики, требуют дополнительной валидации.

Характеристики реагентов

Реагент NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG отвечает требованиям, изложенным в Технической Спецификации для реагентов, содержащейся в Приложении II, Лист А директивы 98/79EC, касающейся изделий для диагностики in vitro. Данный реагент имеет характеристики эквивалентные или лучшие, чем необходимо в соответствии с указанной директивой.

Были проведены исследования, которые показали, что при соблюдении настоящих инструкций реагент NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG вызывает специфическую агглютинацию эритроцитов, на которых присутствует антиген D. Активность каждой серии реагента проверяется в реакции с панелью стандартных эритроцитов. Реагент способен взаимодействовать с антигеном D многих образцов эритроцитов, которые, будучи обследованы с помощью других реагентов, ранее считались D-отрицательными. Эти образцы включают в себя также ряд редких разновидностей D_{PARTIAL}.

Моноклональный компонент IgM Anti-D выделяют из клеточной линии D175-2. Эти антитела не взаимодействуют с вариантной формой D^{VI}. Моноклональный компонент IgG Anti-D выделяют из клеточной линии D415 1E4. Эти антитела способны взаимодействовать в непрямом антиглобулиновом тесте со слабыми вариантами антигена D и рядом вариантных форм, включая форму D^{VI}. Специфичность каждой серии реагента определяется в тестах в пробирках и на микропланшетах с панелью стандартных эритроцитов, отрицательных по антигену D и имеющей ряд антигенов, частота встречаемости которых в североамериканской популяции не ниже 1%. Каждая серия также тестируется в тех же методиках как минимум с тремя образцами, положительными по антигену Bg^A. При наличии соответствующих образцов эритроцитов в рутинное тестирование также входит определение антител к редким антигенам C^w, Yt^b, M^G и V^w. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Levine P, Stetson RE. Unusual Case of Intragroup agglutination. J Amer Med Assoc. 1939; 113:126-127

2. Issitt P.D and Anstee D.J. Applied Blood Group Serology 4-th Edition, Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1998
3. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 6-th Edition, Blackwell Science, Oxford, 1999
4. Technical Manual. American Association of Blood Banks. Bethesda, 13-th Edition, 1999
5. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6-th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1975:9-56
6. Cartron JP. Defining the Rh Blood Group Antigens. Blood Reviews 1994; 8:199-212
7. Garratty G et al. Spontaneous Agglutination of Red Cells with a Positiva Direct Antiglobulin Test in Various Media. Transfusion 1970; 10:258
8. Crawford MN, Gottman FE, Gottman CA. Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion 1970;10:258
9. Thorpe SJ, Boulton CE, Stevenson FK et al. Cold Agglutination Activity is Common among Human Monoclonal IgM Rh System Antibodies Using the V4-34 Heavy Chain Variable Gene Segment. Transfusion 1997; 37:1111-1115
10. Westhoff CM, Sipherd BD, Tolson ID. Red cell antigen stability in K₃ EDTA. Immunohematol 1993;9:109-111

REF	Описание
0086196; 0086199	NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG
0066036; 0066037	NOVACLONE™ Anti-D Galileo IgM+IgG

CE
0088

Тест Определения Фетальной Крови

Для определения D-положительных эритроцитов в кровотоке D-отрицательной матери после родов

- **IVD** In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature limitation
Discard if markedly left of
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Тест предназначен для определения D-положительных эритроцитов в кровотоке D-отрицательной матери.

Общая информация: При отделении плаценты от стенки матки в кровоток матери забрасывается некоторое количество крови плода, что приводит к Rh-иммунизации. Это выражается в выработке аллоантител против антигенов, присутствующих на эритроцитах плода, но отсутствующих у матери. В большинстве случаев выработка аллоантител у D-отрицательных матерей, родивших D-положительного ребенка, может быть предотвращена путем назначения Rh-иммуноглобулина в течение 72 часов после родов. Массивные забросы крови плода могут быть причиной неудачи такой профилактики. Pollack с соавторами показали, что стандартная используемая для профилактики доза 300 μ g Rh-иммуноглобулина способна предотвратить иммунизацию только в том случае, если количество попавших в кровоток матери фетальных эритроцитов не превышает 15 мл (или 30 мл цельной крови) (1). Несколько лабораторий разрабатывали методики, позволяющие осуществить определение количества фетальных эритроцитов в кровотоке матери с целью выявить случаи, когда необходимо усилить профилактику иммунизации. Тест, определяющий количество фетальных эритроцитов большее, чем покрывает стандартная доза 300 μ g, соответствует стандартам AABB (2).

Методы, основанные на методике Kleinhauer, Braun и Betke, используют резистентность фетального гемоглобина (гемоглобин F) к элиции в кислом буфере при невозможности распознать фетальные эритроциты микроскопически (3). Для преодоления недостатков этого метода в качестве более объективного средства количественного определения малых количеств D-положительных эритроцитов в D-отрицательной крови было предложено две серологические методики, основанные на иммуноферментном анализе (ELISA) (4,5).

Для того, чтобы свести к минимуму потребность количественного определения фетальных эритроцитов во всех случаях, Sebring и Polesky предложили чувствительный серологический скрининговый тест, основанный на иммунном розеткообразовании (6,7).

Принцип

Вначале производится инкубация суспензии эритроцитов D-негативной матери с антителами анти-D, затем производится отмывание всех несвязанных антител. Добавляется слабая суспензия D-положительных эритроцитов, обработанных фицином. Смесь центрифугируется и изучается микроскопически на предмет агглютинации смешанного поля. Если в исследуемом образце присутствуют D-положительные эритроциты, покрытые во время инкубации антителами анти-D, индикаторные эритроциты, обработанные фицином, образуют агглютинаты вокруг D-положительных и эритроцитов, которые могут быть определены микроскопически. В большинстве случаев количество фетальных эритроцитов, попавших в кровоток матери, недостаточно для положительной реакции, но в случае значительного заброса тест будет положительный, что будет говорить о необходимости количественной оценки объема эритроцитов плода для проведения профилактики иммунизации большей дозой Rh-иммуноглобулина.

Реагенты

- **Сыворотка анти-D (химически модифицированная):** Сыворотка, содержащая редуцированные и алкилированные IgG anti-D, в растворе, содержащем буфер Трис (гидроксимети)-аминометани БСА для поддержания должного уровня активности теста. Использованный при приготовлении продукта

БСА получен от животных. Выращенных в США и протестированных и сертифицированных ветеринарной службой на предмет отсутствия заболеваний. Данный продукт имеет низкий риск передачи TSE (трансмиссивного губчатого энцефалита). Содержит азид натрия 0,1% в качестве консерванта.

- **Индикаторные эритроциты:** Примерно 0,5% суспензия эритроцитов, обработанных фицином, полученными от донора фенотипа DcE (R2R2).
- **Положительный контроль:** 2-4% суспензия эритроцитов, состоящая из примерно 99,4% D-отрицательных эритроцитов группы O и 0,6% D-положительных эритроцитов группы O, полученных от доноров, гетерозиготных по антигену D.
- **Отрицательный контроль:** 2-4% суспензия D-отрицательных эритроцитов группы O.

Все эритроциты отмыты от групповых антител и суспензированы в буферном растворе, содержащем в качестве консервантов неомидия сульфат (0,1 мг/мл), хлорамфеникол (0,25 мг/мл) и гентамицина сульфат (90,05 мг/мл). Компоненты набора могут быть использованы по отдельности с компонентами наборов других серий.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro. Хранить при температуре 1-10°C. Не разводить. Стремиться избегать контаминации реагентов и испарения раствора. Не использовать при появлении гемолиза или потемнении эритроцитов. Не замораживать. Не использовать после истечения срока годности. Перед использованием осторожно ресуспензировать эритроциты. Индикаторные эритроциты перед использованием должны быть хорошо перемешаны.

Сыворотка анти-D (химически модифицированная) не должна использоваться для типирования эритроцитов. Не использовать при выраженном помутнении.



Концентрированный раствор для отмывания содержит 0,1% азид натрия и классифицируется как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылился в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Утилизировать реагенты, как потенциально инфицированный материал.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Специальной подготовки пациентов перед взятием образца не требуется. Взять образец крови у матери после окончания родов. Предпочтительно после родов подождать примерно час для равномерного распределения фетальных эритроцитов в циркуляторном русле матери, но можно быстрее (8).

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции, предпочтительно на ЭДТА. Если проведение исследования откладывается, образец можно хранить при температуре 1-8°C. Бактериальная контаминация образца может привести к получению неправильных результатов. Кровь, взятую на оксалат, ЭДТА или гепарин не следует хранить больше двух дней, но образец следует исследовать как можно быстрее для того, чтобы провести адекватную профилактику иммунизации в срок до 72 часов после родов.

Процедура исследования

Состав упаковки

Набор Тест определения фетальной крови.

Дополнительные материалы

1. Тестовые пробирки (рекомендуются 12x75 мм)

2. Пипетки
3. Предметные стекла
4. Изотонический раствор или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM) pH 6,5-7,5
5. Водяная баня 37°C или инкубатор
6. Таймер
7. Центрифуга
8. Микроскоп

Проведение исследования

Подготовка элюата

1. Приготовить 2-4% суспензию исследуемых эритроцитов матери в фосфатно-солевом буфере.
2. Внести 1 каплю суспензии эритроцитов матери в промаркированную пробирку.
3. Добавить 1 каплю сыворотки анти-D. *Примечание: этапы 2 и 3 можно производить и в обратном порядке.*
4. Хорошо перемешать и инкубировать 15 минут при 37°C ± 1°C.
5. Отмыть эритроциты фосфатно-солевым буфером четыре раза, обращая внимание на то, чтобы полностью удалять супернатант после каждого отмывания и тщательно ресуспензировать осадок после добавления новой порции буфера. *Примечание: при использовании пробирок, имеющих размер меньше рекомендованного, количество отмываний должно быть больше, чем четыре.*
6. После последнего отмывания полностью удалить супернатант.
7. Внести в пробирку 1 каплю индикаторных эритроцитов и перемешать, покачивая пробирку.
8. Тотчас центрифугировать пробирку:
- 15 секунд при 3.400 об/мин (900-1.000G) или
- режим, рекомендованный для данной центрифуги.

9. Полностью ресуспензировать осадок и исследовать под микроскопом 9 полей зрения при увеличении x100 на предмет наличия агглютинации смешанного поля.

Примечание: Микроскопирование может производиться как непосредственно в пробирке, так и на предметном стекле. Если в пробирке видны агглютинаты, содержимое пробирки следует перенести на предметное стекло и определить, сколько агглютинатов попадает в поле зрения.

Стабильность реакции

Оценка конечного результата должна проводиться незамедлительно после окончания исследования.

Контроль качества

Параллельно с каждой серией исследований (или с каждым отдельным исследованием, если они выполняются по одному) должны проводиться положительный и отрицательный контроли с помощью прилагаемых эритроцитов.

Получение положительного результата с эритроцитами, представляющими собой смесь D-положительных и D-отрицательных эритроцитов подтверждает работоспособность индикаторных эритроцитов и правильность выполнения теста. Положительный контроль должен давать положительную реакцию (три и более агглютината на 9 полей зрения). Отрицательный контроль проводится с целью подтвердить, что при отмывании были удалены все несвязанные иммуноглобулины анти-D. Наличие агглютинатов в отрицательном контроле говорит о том, что эритроциты были агглютинированы оставшимися анти-D и таким образом отмывание было недостаточным и необходимо проведение дополнительного отмывания. Для валидации результата исследования отрицательный контроль должен давать отрицательный результат (два и менее агглютината на 9 полей зрения).

Интерпретация результатов

Положительная реакция: Если после осмотра 9 полей зрения обнаружено более 3 агглютинатов (т.е. в среднем 1 агглютинат на 3 поля зрения), тест считается положительным, т.е. в кровотоке матери присутствует значительное количество фетальных эритроцитов.

Отрицательная реакция: Два и менее агглютината на 9 полей зрения (т.е. в среднем менее, чем 1 агглютинат на 3 поля зрения). Результат означает, что в кровотоке матери не присутствует значительного количества фетальных эритроцитов.

На выявляемое количество агглютинатов может влиять ряд факторов, поэтому их количество не может являться критерием определения массивности заброса фетальной крови. Положительный результат исследования говорит о том, что в кровотоке матери возможно наличие значительного количества фетальных эритроцитов. Для точного определения объема фетальных эритроцитов и расчета дозы Rh-иммуноглобулина для профилактики должны быть проведены количественные методы оценки. Mollison, Engelfriet и Contreras приводят данные о том, что примерно 0,3% родильниц получают заброс в кровоток 10мл или более фетальных эритроцитов, а примерно 1% - 3 мл или больше (9). Кесарево сечение и ручная отслойка плаценты приводят к забросу значительно больших объемов фетальных эритроцитов в кровоток матери.

Ограничения

Как и во всех серологических тестах, ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования и нарушении техники проведения исследования. Кроме того:

1. Для правильной интерпретации результатов для исследования должна браться кровь матери установленной Rh-отрицательной принадлежности, в указанный срок после родов Rh-положительным ребенком. Если новорожденный имеет вариант антигена D^{WEAK}, тест может не показать примесь фетальной крови объемом до 30 мл. Если мать D-положительная, то даже в случае D^{WEAK} сильная агглютинация не означает наличия фето-материнского кровотечения. Если новорожденный D-отрицательный, тест даст отрицательный результат вне зависимости от наличия фето-материнского кровотечения.
2. При наличии ABO-несовместимости между матерью и плодом материнские естественные антитела против антигенов ABO уничтожат фетальные эритроциты прежде, чем исследование будет произведено. Это имеет отношение к любому методу определения фетальных эритроцитов.
3. Недостаточное отмывание может привести к получению ложноположительных результатов вследствие наличия остатков свободных анти-D антител в тест-системе.
4. Ложноположительный результат может быть также получен в случае, когда эритроциты матери положительны в прямом антиглобулиновом тесте вследствие фиксации на них антител, которые могут взаимодействовать с индикаторными эритроцитами.
5. Положительный тест сам по себе не означает, что доза Rh-иммуноглобулина, используемая для профилактики, должна быть увеличена. Он только означает, что в кровоток матери попала доза фетальных эритроцитов больше обычной. В этом случае точное определение объема фето-материнского кровотечения должно быть произведено с помощью количественных методов.
6. Реактивность индикаторных эритроцитов может снижаться после истечения срока годности.

Характеристики реагентов

Тест определения фетальной крови при правильном проведении в соответствии с инструкцией выявляет наличие фето-материнского кровотечения объемом 30 мл и более ABO-совместимой D-положительной фетальной крови, попавшей в кровоток матери. Тест может быть также положительным и при меньшем объеме заброса крови, но он сделан таким образом, чтобы быть отрицательным при малых объемах заброса (2 мл и меньше). Все поставляемые клеточные суспензии отрицательны в прямом антиглобулиновом тесте. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. За дополнительной информацией обращайтесь в службу технической поддержки Иммукоп по телефону 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Библиография

1. Pollack W, Ascari WO, Kochesky RJ, O'Connor RR, Hoy TY, Tripodi D. Studies on Rh prophylaxis: Relationship between doses of anti-Rh and size of antigenic stimulus. Transfusion 1971; 11:333-359.
2. Standards for blood banks and transfusion services. 26-th ed. Bethesda 2009; AABB.
3. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalen Hamoglobin in den Erythrozyten eines blutstriches. Klin wscrh 1957; 35:637.
4. Riley JZ, Ness PM, Teddie SJ, Barasso C, Baldwin M. The detection and quantitation of fetal-maternal bleeding using an enzyme-linked

immunoabsorbent assay (ELISA). (Abstract.) Transfusion 1980;20:640.

5. Rappun T, McIlravy D, Sherman LK. Enzyme linked immunosorbent microtiter assay for red cell serology. (Abstract.) Transfusion 1980; 20:641.
6. Polesky HF, Sebring ES. Detection of fetal maternal hemorrhage: An evaluation of serological tests related to Rho(D) Immune Globulin. Transfusion 1971; 11:162-165.
7. Polesky HF, Sebring ES. Evaluation of methods for detection and quantitation of fetal cells and their effect on Rhlg usage. Am J Clin Path 1981; 76:525-529.
8. Judd WJ, Luben NLC, Ness PM, et al. Prenatal and perinatal immunohematology: recommendations for serologic management of the fetus, newborn infant, and obstetric patient. Transfusion 1990;30:175-183.
9. Mellissos PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 9th ed. Oxford; Blackwell Scientific Publications 1992:551-552.

CE
0088

Реагент Gamma PeG™

Полиэтиленгликоль для определения антител

Для диссоциации антител с эритроцитов

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature Limitation
Discard if markedly Late d
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Реагент Gamma PeG предназначен для добавления в реакционную среду для повышения чувствительности тестов на выявление антиэритроцитарных антител.

Общая информация: Несколькими группами исследователей было замечено, что добавление полиэтиленгликоля в реакционную среду приводит к повышению чувствительности прямого антиглобулинового теста для выявления антиэритроцитарных антител (1,2,3,4,5,6,7). Также хорошо известно, что снижение ионной силы реакционной среды приводит к снижению взаимодействия антигенов эритроцитов с соответствующими антителами (8,9,10,11,12). Эритроциты при присутствии в реакционной среде полиэтиленгликоля склонны к агглютинации, что создает трудности интерпретации на всех этапах проведения тестов прямой агглютинации. Как следствие, результат исследования основывается на антиглобулиновой фазе определения антител.

Полиэтиленгликоль может быть также использован в качестве добавки при тестировании элюатов. Combs и Telen отмечали значительное возрастание чувствительности методики после добавления ПЭГ, делавшего возможным невозможное до того выявление антител, производимого стандартными методами (13).

В изначальной версии методики полиэтиленгликоль добавлялся в реакционную среду в виде раствора в фосфатно-солевом буфере нормальной ионной силы. Это требовало добавления 4 капель реагента к смеси из двух капель сыворотки или плазмы и одной капли суспензии эритроцитов. Если использовать раствор ПЭГ в растворе низкой ионной силы, то для достижения эквивалентной чувствительности определения IgG достаточно добавлять только две капли раствора ПЭГ.

Принцип

Использование реагента Gamma PeG в качестве добавки при определении антиэритроцитарных антител повышает чувствительность тестов на выявление антител и создает среду низкой ионной силы, усиливающей взаимодействие антигенов и антител во время инкубации.

Реагент

Реагент Gamma PeG представляет собой раствор полиэтиленгликоля в растворе низкой ионной силы, содержащей глицин в изотонической концентрации. Содержит 0,1% азид натрия в качестве консерванта.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro. Хранить при комнатной температуре 1-10°C. Не замораживать. Не разводить. Не использовать после истечения срока годности. Стремиться избегать контаминации реагента. Не использовать при помутнении.



Концентрированный раствор для отмывания содержит 0,1% азид натрия и классифицируется как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылился в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Предупреждение: в состав упаковки входит груша из натуральной резины.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Специальной подготовки пациентов перед взятием образца не требуется. Взять образец крови из вены путем стандартной венопункции, исследовать максимально более свежий образец. Если проведение исследования откладывается, образец можно хранить при температуре 1-10°C в течение времени, определенного местными правилами.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент Gamma PeG.

Дополнительные материалы

Тестовые пробирки (12x75 мм или 10x75 мм), пипетки, изотонический раствор или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM) pH 6,5-7,5, инкубатор 37°C или водяная баня, таймер, центрифуга, оптическое приспособление – линза или микроскоп, антиглобулиновый реагент, содержащий анти-IgG, эритроциты, сенсibilизированные IgG.

Проведение исследования

В зависимости от разновидности проводимого исследования этапы 4-6 могут быть пропущены. Однако, эти этапы важны при проведении тестов на совместимость сыворотки или плазмы реципиента и эритроцитов донора для определения важных антител против антигенов системы ABO, поскольку методика с полиэтиленгликолем не предназначена для определения IgM.

1. Промаркировать необходимое количество пробирок в соответствии с количеством образцов для исследования.
2. Внести в каждую пробирку по 2 капли сыворотки или плазмы (или элюата).
3. Добавить по 1 капле соответствующей суспензии эритроцитов. Эритроциты должны быть предварительно отмыты и ресуспендированы в изотоническом растворе до 3-4% концентрации в отдельной пробирке (или в соответствии с инструкцией производителя). *Примечание: При необходимости пробирки могут быть инкубированы при комнатной температуре в течение 5-30 минут.*
4. Хорошо перемешать и центрифугировать:
 - 1 минуту при 1.000 об/мин (100-125 G) или
 - 15 секунд при 3.400 об/мин (900-1.000 G) или
 - режим, рекомендованный для банной центрифуги.
5. Оценить супернатант на предмет наличия гемолиза.
6. Ресуспендировать эритроциты, осторожно покачивая пробирку, затем оценить наличие агглютинации. Фиксировать результаты.
7. Добавить две капли реагента Gamma PeG и хорошо перемешать.
8. Инкубировать пробирки при 37°C в течение 10-15 минут. Инкубацию можно продлить до 30 минут. Продление инкубации может привести к увеличению чувствительности исследования.
9. Осмотреть пробирки на предмет гемолиза. *Примечание: После инкубации реакционную смесь нельзя оценивать на предмет наличия прямой агглютинации.*
10. Отмыть эритроциты минимум три раза, полностью заполняя пробирки изотоническим раствором, осторожно удаляя супернатант после центрифугирования и тщательно ресуспендируя осадок эритроцитов после добавления изотонического раствора. После последнего отмывания полностью удалить супернатант.
11. Добавить по 1-2 капли реагента Gamma-clone® антиглобулиновый реагент анти-IgG или следовать инструкции производителя. Добавление 2 капель антиглобулинового реагента может повысить чувствительность исследования. *Примечание: рекомендуется использовать антиглобулиновый реагент анти-IgG вместо полиспецифического антиглобулинового реагента анти-IgG, анти-C3d, поскольку полиспецифический реагент может давать неспецифические реакции.*
12. Хорошо перемешать и центрифугировать, как описано в пункте 4.
13. Ресуспендировать осадок эритроцитов осторожно покачивая пробирку и оценить на наличие агглютинации. Отрицательные результаты исследовать при помощи оптического приспособления. Фиксировать результаты.

Стабильность реакции

Фазы отмывания антиглобулинового теста должны проводиться без задержек. Интерпретация результата должна быть проведена незамедлительно после окончания исследования.

Контроль качества

1. Все отрицательные результаты должны быть подтверждены путем добавления в пробирку эритроцитов, сенсибилизированных IgG, например, Checkcell, и последующего центрифугирования и оценки результатов. Полученный при этом положительный результат подтвердит, что антиглобулиновый реагент, использованный в исследовании, был активен и полученный отрицательный результат достоверен.
2. Для того чтобы показать, что добавление ПЭГ увеличивает чувствительность методики, рекомендуется провести контрольное исследование со специально подобранными антителами (или серий разведений антител), например, corQC®.
3. При проведении тестов идентификации антител рекомендуется выполнять аутоконтроль пациента (сыворотка или плазма пациента + эритроциты пациента).

Интерпретация результатов

Агглютинация и/или гемолиз в спин-фазу проведения исследования или агглютинация после антиглобулиновой фазы является положительным результатом, показывающим, что в исследуемом образце присутствуют антитела против соответствующего антигена, имеющегося на эритроцитах. Отсутствие агглютинации и гемолиза на всех этапах исследования является отрицательным результатом и говорит об отсутствии антител к антигенам, присутствующим на эритроцитах. Положительный аутоконтроль говорит о наличии аутоантител. Необходимо проведение дополнительных исследований для того, чтобы убедиться в отсутствии аллоантител в исследуемом образце.

Ограничения

Как и во всех серологических тестах к ложноположительным результатам могут приводить такие факторы, как контаминация материалов, неправильные режимы центрифугирования и инкубации, а также несоблюдение методики проведения исследования. В дополнение к перечисленному:

1. Методика с использованием ПЭГ может не определять IgM.
2. При использовании данной методики для постановки проб на совместимость рекомендуется проводить спин-фазу исследования, чтобы не пропустить анти-A и анти-B IgM.
3. Полиэтиленгликоль имеет тенденцию вызывать преципитацию некоторых сывороточных глобулинов. Поэтому после каждого отмывания необходимо тщательно ресуспензировать осадок эритроцитов. Если исследуемые образцы содержат повышенное содержание глобулинов, трех отмываний может оказаться недостаточным для их полного удаления. Если в осадке эритроцитов содержатся также преципитированные глобулины, последние могут вызвать нейтрализацию антиглобулинового реагента и привести к ложноотрицательному результату. Если образцы имеют очень высокое содержание глобулинов (например, при миеломной болезни), добавление ПЭГ может вызвать гелеобразование. Для исследования таких образцов использовать ПЭГ не следует.
4. При исследовании образцов плазмы может наблюдаться преципитация фибриногена. В таких случаях (как и при повышенных уровнях глобулинов) также рекомендуется отмывать эритроциты более трех раз для полного удаления несвязанных протеинов.
5. В отличие от раствора низкой ионной силы и некоторых других потенциаторов реагент Gamma PeG не рекомендуется использовать в качестве среды для приготовления суспензии эритроцитов. Его следует добавлять к уже готовой реакционной смеси, как было описано в настоящей инструкции.
6. Использование сыворотки или плазмы, которые хранились длительное время, может привести к невозможности определения комплемент-зависимых антител. Использование антиглобулинового реагента анти-IgG может также привести к невозможности определения комплемент-зависимых антител.

Характеристики реагентов

При использовании в соответствии с приведенной инструкцией реагент Gamma PeG повышает чувствительность непрямого антиглобулинового теста для выявления антиэритроцитарных антител. Каждая серия реагента тестируется со специально подобранными антителами, а также с образцами инертных сывороток. Эффективность данного продукта зависит от

точности выполнения методики проведения исследования. За дополнительной информацией обращайтесь в службу технической поддержки Иммукоп по телефону 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Библиография

1. Nance S, Garratty G. A new technique to enhance antibody reactions using polyethylene glycol. (Abstract) Transfusion 1985; 25:475.
2. Nance S, Garratty G. Polyethylene glycol: A new potentiator of red blood cells antigen-antibody reactions. An J Clin Path 1987; 87:633-635.
3. Vengelen-Tyler V, Choy C. A comparative study of antibody enhancement techniques. (Abstract) Transfusion 1986; 26:570.
4. O'Shea K, Slate J, Loga D, Wojtyniak L. Polyethylene glycol: its use as a special technique for antibody investigation.
5. Wenz B, Apuzzo J. Polyethylene glycol improves the indirect antiglobulin test. Transfusion 1989; 29:218-220.
6. Slater JL, Griswold DJ, Wojtyniak LS, Reisling MJ. Evaluation of polyethylene glycol/indirect antiglobulin test. Transfusion 1989; 29:686-688.
7. Wenz B, Apuzzo J, Shah DP. Evaluation of polyethylene glycol-potentiator indirect antiglobulin test. Transfusion 1990; 30:318-321.
8. Low B, Messetr L. Antiglobulin test in low ionic strength solution for rapid antibody screening and crossmatching. Vox Sang 1974; 26:53-61.
9. Moore HC, Mollison PL. Use of low ionic strength medium in manual test for antibody detection. Transfusion 1976; 16:291-296.
10. Austin R. An evaluation of rapid Coombs technique. NZ J Med Lab Tech 1976; 30:51.
11. Wicker B, Wallas CH. A comparison of low ionic strength saline medium with routine methods for antibody identification. Transfusion 1976; 16:469-472.
12. Lincoln PJ, Dodd BE. The use of low ionic strength solution (LISS) in elution experiments and in combination with papain-treated cells for the titration of various antibodies, including eluted antibody. Vox Sang 1978; 34:221-226.
13. Coombs MR, Telen MJ. Testing eluates in polyethylene glycol (PEG): A sensitive technique for detecting early alloimmunisation. (Abstract) Transfusion 1989; Supplement 58S.



Реагент Capture-CMV® Индикаторные Эритроциты

Твердофазная система для определения антител IgG и IgM
против Цитомегаловируса (CMV)

- **IVD** In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature Limitation
-  Consult Instructions for Use
Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
- Discard if markedly turbid



Назначение: Capture-CMV индикаторные эритроциты покрыты антителами анти-IgM и анти-IgG. Предназначены для использования в методике твердофазной адгезии Capture-CMV.

Общая информация

Цитомегаловирус является часто встречающимся вирусом человека из семейства вирусов герпеса. Наличие антител против CMV является признаком перенесенной инфекции. В этих случаях возможна реактивация инфекции. Инфекция CMV обычно протекает бессимптомно и может существовать в качестве латентной или хронической инфекции (1). Передача вируса возможна при трансфузии крови или трансплантации органов от серопозитивных доноров (2).

Инфекция CMV может иметь значительно более серьезные проявления у пациентов с ослабленным иммунитетом, например, у недоношенных детей, реципиентов трансплантации органов или онкологических пациентов, являясь прямой или косвенной причиной повышения смертности у пациентов этих групп (2). При врожденной инфекции у новорожденных может иметь место тяжелая инклюзионная цитомегалия (CID) (3). Цитомегалия может вызывать тяжелые неврологические нарушения, такие как задержка развития, глухота, микроцефалия и дисфункция моторики. При трансфузии инфицированных продуктов крови или трансплантации органов от инфицированных доноров может возникать CMV-синдром мононуклеозного типа (1). Эта разновидность инфекции может также иметь место у новорожденных с недостаточным весом, получившим трансфузию CMV-инфицированного гемокомпонента.

Единственным способом профилактики инфекции CMV у иммунокомпроментированных серонегативных пациентов является отбор для трансфузии серонегативных гемокомпонентов, а также проведение трансплантаций от серонегативных доноров. Система Capture-CMV является твердофазной системой адгезии эритроцитов, основанной на методике Parr et al (4). Методика является модификацией теста смещения агглютинации для определения антигенов и антител Coombs et al и Hogman(6), в котором в качестве индикаторной системы используются иммуноглобулины анти-IgG и эритроциты, сенсибилизированные IgG. В исследованиях Capture для определения антител к антигенам эритроцитов или тромбоцитов в качестве индикатора используются эритроциты, покрытые IgG(7). В системе Capture-CMV индикаторные эритроциты покрыты IgG и IgM.

Принцип

Включенный в состав реагента антиген CMV получен из цепи AD-169, выращенной на фибробластах эпидермиса человека. Подложка лунок микропланшетов приготовлена из инактивированного вируса. Микропланшеты высушены и поставляются вместе с сопутствующими реагентами и контролями.

Исследование представляет собой двухступенчатую методику твердофазной адгезии эритроцитов, проводимую в лунках микропланшетов, покрытых инактивированным вирусом. В лунки добавляется исследуемая сыворотка или плазма. Образцы инкубируются пять минут, в ходе чего происходит связывание антител против протеинов CMV, находящихся в исследуемом образце, с иммобилизованными вирусными протеинами. Несвязанные иммуноглобулины отмываются из лунок, после чего в лунки добавляется суспензия индикаторных эритроцитов, покрытых IgG и IgM. При центрифугировании антитела, находящиеся на эритроцитах, соединяются с антителами против CMV, соединенными с иммобилизованными на стенках лунок антигенами. При положительном

результате индикаторные эритроциты, соединенные мостиками антиген-антитело с подложкой лунок не могут смещаться на дно лунок и равномерно распределяются по их поверхности. Напротив, при отрицательном результате индикаторные эритроциты образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы».

Реагент

Capture-CMV готовые индикаторные эритроциты: суспензия эритроцитов человека, покрытых IgG кролика и IgM козла против антигенов человека. Реагент суспензирован в буферном растворе, содержащем в качестве консервантов хлорамфеникол (0,25 мг/мл), неомицина сульфат (0,1 мг/мл) и гентамицина сульфат (0,05 мг/мл). Хранить при 1-10°C.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.

Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур. Не использовать после истечения срока годности. Не использовать гемолизированные эритроциты, также в случае потери эритроцитами окраски.

Реагент не должен использоваться, если эритроциты потемнели, приобретя коричневый цвет, если появился выраженный гемолиз, если эритроциты не дают четкой реакции в положительном и отрицательном контроле. По мере хранения реагента может появляться легкий гемолиз. Контаминация реагента сывороточными протеинами может привести к нейтрализации анти-IgG и анти-IgM компонентов, что в свою очередь приведет к получению ложноотрицательных результатов.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Реагент предназначен только для исследований в методике твердофазной адгезии Capture-CMV.

Обращаться с реагентами и материалами, как с инфицированным материалом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность. Упаковка включает грушу из натуральной резины.

К моменту начала исследования все реагенты и материалы должны иметь температуру 18-30°C. Использование холодного реагента Capture-CMV индикаторные эритроциты приведет к получению неправильных результатов.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции (8).

Взятие образцов для исследования следует производить в соответствии с инструкцией к тесту Capture-CMV.

Процедура исследования

Состав упаковки

Capture-CMV готовые индикаторные эритроциты во флаконе с пипеткой.

Дополнительные материалы

1. Микропланшеты Capture-CMV в упаковке с инструкцией
2. Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками
3. Фосфатно-солевой изотонический буфер (примерно 15 mM) pH 6,5-7,5
4. Образцы плазмы или сыворотки донора или пациента
5. Контрольные сыворотки Capture-CMV
6. Таймер
7. Центрифуга с ротором для микропланшет Capture и стрипов 1x8 или 2x8*
8. Пипетки или распыляющие устройства для микропланшет
9. Поверхность с подсветкой
10. Флакон для отмывания микропланшет или автоматический отмыватель

* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими инстанциями.

Проведение исследования

1. К моменту начала исследования все реагенты и материалы должны иметь комнатную температуру.
2. Подготовить сыворотку или плазму донора или пациента согласно инструкции, прилагаемой к планшетам Capture-CMV.
3. Приготовить микропланшету Capture-CMV согласно инструкции.
4. Провести исследование согласно прилагаемой к планшету инструкции.
5. После заключительного отмывания добавить во все лунки (тестовые и контрольные) по 1 капле (50 ± 5 мкл) индикаторных эритроцитов.
6. Центрифугировать микропланшету согласно прилагаемой инструкции.
7. По окончании исследования читать и фиксировать результаты.

Для проведения исследования на автоматическом оборудовании см. Соответствующие инструкции для оператора. После того, как в реагент Capture-CMV индикаторные эритроциты добавили магнитную мешалку, реагент должен быть использован в течение 24 часов. Более длительное использование может отрицательно сказаться на качестве получаемых результатов.

Стабильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре $1-10^{\circ}\text{C}$. При этих условиях можно производить повторную визуальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Активность системы Capture-CMV оценивается при каждом исследовании путем включения в исследование положительного и отрицательного контролей. Если в каком-либо исследовании положительный контроль не дает положительный результат и/или отрицательный контроль не дает отрицательный результат, исследование необходимо повторить. Повторное получение неправильных результатов говорит о том, что како-либо из реагентов испорчен, или имеет место системная ошибка при проведении исследования.

Для проведения исследования на автоматическом оборудовании см. Соответствующие инструкции для оператора.

Интерпретация результатов

Положительный результат: Адгезия индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки или по части поверхности.

Отрицательный результат: Адгезия индикаторных эритроцитов отсутствует, эритроциты образуют компактный осадок на дне лунки.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов.

Добавление индикаторных эритроцитов в чрезмерных количествах может привести к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов. Добавление индикаторных эритроцитов в недостаточном количестве (что может иметь место при недостаточном перемешивании или гемодиализе) может приводить к получению слабых ложноположительных результатов. Индикаторные эритроциты, взятые в исследование при температуре ниже 18°C , могут дать слабый ложноположительный результат.

Контаминация реагента сывороточными протеинами может привести к нейтрализации анти-IgG и анти-IgM компонентов, что в свою очередь приведет к получению ложноотрицательных результатов. Получение отрицательного результата с положительным контролем в мануальном или полуавтоматическом исследовании говорит о нейтрализации индикаторных эритроцитов.

Дополнительные ограничения см. в инструкции к микропланшетам Capture-CMV.

Характеристики реагентов

См. инструкцию к Capture-CMV

Характеристики продукта в значительной мере зависят от точности соблюдения инструкций по его применению. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукоп по телефону 800-492-BLUD(2853) или 770-441-2051.

Библиография

1. Ho M, ed. Characteristics of cytomegalovirus, In: Cytomegalovirus biology and infection. New York: Plenum Medical Book Co, 1982:9-32
2. Adler SP. Transfusion-associated cytomegalovirus infections. Rev Infect Dis 1983;5:977-993
3. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moor EG, Walton PD, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection. N Eng J Med 1982; 306:945
4. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. Am J Clin Pathol 1984;82:719
5. Coombs RRA, Marks J, Bedford D. Specific mixed agglutination: Mixed erythrocyte-platelet anti-globulin reactions for the detection of platelet antibodies. Br J Haematol 1956;2:84
6. Hogman C. The principle of mixed agglutination applied to tissue culture systems. Vox Sang 1959;4:12
7. Sinor LT. Advances in solid phase red cell adherence methods and transfusion serology. Transf Rev Med 1992;6:26
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Publication H 4-A: Standard procedures for the collection of diagnostic blood specimens by skin puncture. Villanova PA: NCCLS, 1982



Набор Gamma EGA® KIT

Набор ЭДТА-Глициновая кислота

Для диссоциации антител с эритроцитов

• IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

•  Temperature Limitation
• Discard if markedly Left d

•  Consult Instructions for Use
•  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Набор Gamma EGA KIT предназначен для диссоциации IgG с эритроцитов с целью их последующего фенотипирования и использования в других серологических методиках.

Общая информация: Эритроциты, покрытые иммуноглобулинами, как, например, бывает при аутоиммунной гемолитической анемии или гемолитической болезни новорожденных, положительно в прямом антиглобулиновом тесте. Они не могут быть использованы для проведения непрямого антиглобулинового теста или других исследований с потенциаторами агглютинации, поскольку покрывающие их иммуноглобулины вызовут в этих тестах спонтанную агглютинацию. Удаление иммуноглобулинов с поверхности эритроцитов без их разрушения дает хорошую возможность фенотипировать эритроциты с целью распознать одну или более специфичности аллоантител, присутствующих в сыворотке пациента с тепловыми аутоантителами (1,2,3).

Принцип

Эритроциты, покрытые антителами, вначале тщательно отмываются, затем на короткое время суспензируются в растворе, содержащем ЭДТА и глициновую кислоту для того, чтобы вызвать диссоциацию антител. Смесь немедленно приводится к нейтральному pH при помощи Трис-буфера, эритроциты сепарируются центрифугированием и трижды отмываются изотоническим раствором. Если прямой антиглобулиновый тест отрицателен, производится определение анти генов эритроцитов в непрямом антиглобулиновом тесте или в тесте с потенциаторами агглютинации. Такая обработка инактивирует антигены системы Келл (4), Er (5), Bg (6) и, возможно, другие. Данные реагенты не инактивируют антигены систем MNSs и Duffy. Метод обработки эритроцитов ЭДТА-Глициновой кислотой является методом выбора для типирования эритроцитов, покрытых тепловыми алло- или ауто-IgG (7).

Реагент

Набор Gamma EGA KIT включает три раствора в количестве, достаточном для проведения минимум двадцати процедур диссоциации антител.

- **Раствор EGA 1:** концентрированный раствор натриевой соли ЭДТА. Содержит 0,1% азид натрия в качестве консерванта.
- **Раствор EGA 2:** Глициновый раствор, имеющий низкое pH. Продукт не содержит консервантов.
- **Раствор EGA 3:** Трис-раствор (гидроксиметил)-аминометан. Содержит 0,1% азид натрия в качестве консерванта.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro. Хранить при комнатной температуре 15-30°C. Растворы стабильны при хранении в холодильнике, но раствор EGA 1 в холодильнике может дать кристаллизацию. Если это произошло, кристаллы вновь растворяются при комнатной температуре. Тем не менее, перед употреблением раствор всегда тщательно перемешивать. Стремиться избегать контаминации реагентов. Не использовать при выраженном помутнении. Не замораживать. Не использовать после истечения срока годности.



Концентрированный раствор для отмывания содержит 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Компоненты набора можно использовать с компонентами, взятыми из наборов других серий при условии, что их срок годности еще не истек.

Предупреждение: в состав упаковки входит груша из натуральной резины.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Специальной подготовки пациентов перед взятием образца не требуется. Взять образец крови из вены путем стандартной венопункции, исследовать максимально более свежий образец. Если проведение исследования откладывается, образец можно хранить при температуре 1-10°C в течение 72 часов. Эритроциты, хранившиеся более 72 часов при проведении методики могут давать повышенный гемолиз.

Для исследования эритроцитов, покрытых антителами in vivo, целесообразно брать образец крови на антикоагулянт, поскольку для исследования требуется значительный объем эритроцитов. Наилучшим антикоагулянтом является ЭДТА. Дефибринированные образцы также пригодны для исследования.

Процедура исследования

Состав упаковки

Набор Gamma EGA.

Дополнительные материалы

Тестовые пробирки, пипетки, изотонический раствор или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM) pH 6,5-7,5, таймер, центрифуга.

Проведение исследования

Примечание: Приведенная методика может быть также использована для разрушения антигенов системы Келл на эритроцитах, не покрытых иммуноглобулинами, в целях дифференциальной диагностики. В этом случае этап 9 процедуры проводить не следует.

1. Отмыть эритроциты, покрытые иммуноглобулинами, 3 раза изотоническим раствором и ресуспензировать до концентрации 3-5%.
2. Внести 30 капель суспензии отмытых эритроцитов в чистую пробирку.
3. Центрифугировать суспензию и осторожно удалить супернатант, не трогая осадок эритроцитов. Достаточно 1 минуты центрифугирования при 3.400 об/мин (900-1.000G).
4. В отдельной пробирке приготовить раствор ЭДТА-глициновой кислоты путем добавления 4 капель раствора 1 к 16 каплям раствора 2.
5. Немедленно добавить свежеприготовленный раствор ЭДТА-глициновой кислоты к осадку эритроцитов и осторожно перемешать.
6. Включить таймер на 2 минуты. Смесь должна находиться при комнатной температуре. Если при этом эритроциты значительно потемнеют и образуют агрегаты, инкубацию следует сокращать (с шагом в 15 секунд) до тех пор, пока потемнение и агрегация эритроцитов не прекратятся.
7. Немедленно добавить 4 капли раствора EGA 2, тщательно перемешать и центрифугировать 30 секунд при 3.400 об/мин (900-1.000G).
8. Удалить и утилизировать супернатант, затем ресуспензировать обработанные эритроциты в изотоническом растворе. Если на этом этапе обработки не отмечается выраженного потемнения и агглютинации эритроцитов (см. пункт 6), отмыть их 3 раза изотоническим раствором. *Примечание: Хотя супернатант может содержать элюированные антитела, концентрация их в нем мала. Поэтому не рекомендуется обращаться с супернатантом, как с элюатом (т.е. устанавливать специфичность находящихся в нем антител).*
9. Провести с обработанными и отмытыми эритроцитами прямой антиглобулиновый тест. Если прямой антиглобулиновый тест отрицателен, эритроциты можно использовать для фенотипирования в непрямом антиглобулиновом тесте согласно инструкции производителя реагентов. *Примечание: Обработка эритроцитов реагентами EGA приводит к повышенной склонности к гемолизу при хранении. Поэтому, если дальнейшие исследования будут проводиться не сразу после*

61
заключительного отмывания, может потребоваться дополнительное отмывание эритроцитов перед проведением дальнейших исследований.

Если после обработки эритроцитов прямой антиглобулиновый тест остается положительным, обработку следует повторить, но не более чем 1 раз. Следует помнить, что дальнейшая экспозиция кислоты может привести к необратимым повреждениям мембраны эритроцитов.

Контроль качества

Для того чтобы подтвердить, что антигены, которые предстоит определять, не были повреждены при обработке эритроцитов, рекомендуется проводить параллельную обработку эритроцитов с известным фенотипом и в дальнейшем параллельно проводить с ними определение антигенов. Если было подтверждено, что искомые антигены при обработке не разрушаются, этим контролем можно пренебречь.

Дополнительно рекомендуется проводить параллельный непрямой антиглобулиновый тест с инертным реагентом, например, 6% БСА, для того, чтобы показать, что все иммуноглобулины при обработке с поверхности эритроцитов были удалены.

Интерпретация результатов

Если после обработки эритроцитов прямой антиглобулиновый тест стал отрицательным, эритроциты можно фенотипировать (за исключением антигенов, уничтоженных при обработке) в непрямом антиглобулиновом тесте.

Ограничения

Факторы, способные повлиять на результаты, включают:

1. Сроки обработки эритроцитов должны ограничиваться рекомендованными инструкцией. Увеличение времени инкубации эритроцитов с ЭДТА-глициновой кислотой приведет к необратимому повреждению мембран эритроцитов. Видимые признаки такого повреждения включают темную окраску и образование агглютинатов.
2. Обработка эритроцитов по приведенной методике ведет к невозможности их фенотипирования по антигенам системы Келл. Это обстоятельство может быть полезным в случаях, если предполагается исследование смеси антител, включающей анти-Келл. В этом случае идентификацию антител можно параллельно проводить с фенотипированными эритроцитами, не прошедшими подобную обработку.
3. При данной обработке инактивируются также антигены E_r-a и B_g. Могут повреждаться и другие антигены. Достоверно установлено, что антигены M, N, S, s, D, C, E, c, e, Fy-a, Fy-b, Jk-a и Jk-b при данной обработке не страдают.
4. Обработка может не во всех случаях приводить к полному удалению иммуноглобулинов с поверхности эритроцитов. В некоторых случаях сила положительного прямого антиглобулинового теста значительно снижается, делая возможным проведение непрямого антиглобулинового теста. В других случаях сила положительного прямого антиглобулинового теста снижается не так значительно. В двух сообщениях указывалось, что в ряде случаев даже двукратная обработка эритроцитов ЭДТА-глициновой кислотой не давала возможности провести их фенотипирование (в 15% случаев и в 18% случаев соответственно).

Характеристики реагентов

Набор Gamma EGA KIT проверялся на способность вызывать диссоциацию антител с поверхности эритроцитов по приведенной методике, были показаны хорошие результаты. В большинстве случаев диссоциация была значительной и позволяла использовать эритроциты в непрямом антиглобулиновом тесте для определения антигенов (кроме уничтоженных при обработке). Эритроциты, не имеющие на своей поверхности иммуноглобулинов, также теряли при обработке антигены K и k. Эффективность данного продукта зависит от точности выполнения методики проведения исследования. За дополнительной информацией обращайтесь в службу технической поддержки Иммукор по телефону 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Библиография

1. Louie JE, Zaroulis CG. Preparation of intact antibody-free red blood cells in autoimmune hemolytic anemia. Transfusion 1986; 26:550 (abstract).
2. Kbsanke J, McDowell MA, Stocker I. Treatment of DAT positive red cells with EDTA-glycine acid for antigen typing. Transfusion 1989; 29:57S (abstract).

3. Pallas C, Wiler M, McGee B. Comparison of glycine acid-EDTA to chloroquine diphosphate for IgG removal. Transfusion 1991; 31:27S (abstract).
4. Julleis J, Sapp C, Kakaja R. Glucine-EDTA as a substitute for AET in the inactivation of Kell System antigens on red blood cells. Transfusion 1992; 32:14S (abstract).
5. Liew YW, Uchikawa M. Loss of E_r-a antigen in very low pH buffers. Transfusion 1987; 23:442-443 (letter to editor).
6. Champagne K, Spruell P, Chen J, Voll L, Shladser G. EDTA-glycine acid vs chloroquine diphosphate treatment to stripping Bg antigens from red blood cells. Transfusion 1996; 36:21S (abstract).
7. Burin des Rosiers N, Squalli S. Removing IgG antibodies from intact cells: comparison of acid and EDTA, heat and chloroquine elution methods. Transfusion 1997; 37:497-501.

CE
0088

Набор Gamma ELU-KIT® II

Для быстрой кислотной элюции антител с интактных эритроцитов

• IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

• 1-4 °C
Temperature Limitation
• Discard if markedly turbid

• Consult Instructions for Use
• Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Набор Gamma ELU-KIT II предназначен для проведения быстрой кислотной элюции антител с интактных эритроцитов.

Общая информация: Элюция представляет собой процедуру для освобождения антител с поверхности эритроцитов. Элюаты приготавливаются из эритроцитов, покрытых антителами in vivo или in vitro и используются для следующих целей:

1. Для идентификации антител, фиксированных на эритроцитах, положительных в прямом антиглобулиновом тесте.
2. Для выделения из сыворотки специфических антител из смеси антител путем абсорбции in vitro на специально подобранных эритроцитах.
3. Для определения наличия на эритроцитах слабых антигенов после предварительной инкубации со специально подобранной сывороткой.
4. Для очистки сыворотки от нежелательных антител. Элюаты могут быть исследованы на наличие специфических протеинов с помощью различных иммунохимических или биохимических методик.

Антитела могут быть элюированы как с интактных эритроцитов, так и со стромы, оставшейся после лизиса эритроцитов. Элюция может осуществляться путем нагревания (1), путем обработки различными растворителями (2,3) или путем изменения pH раствора (повышения или понижения, 4,5,6,7).

Принцип

Эритроциты, покрытые антителами, вначале тщательно отмываются от примеси несвязанных протеинов с использованием специального раствора для отмывания, укрепляющего связь антител с эритроцитами. Затем отмываемые эритроциты суспендируются в растворе глицина, имеющем низкое pH, в котором происходит диссоциация антител. После центрифугирования супернатант, содержащий антитела, отделяется от эритроцитов и для нейтрализации в него добавляется буферный раствор. После этого элюат готов для определения и идентификации антител.

Состав

Набор Gamma ELU-KIT включает три раствора в количестве, достаточном для проведения минимум десяти процедур элюции, описанных в настоящем руководстве.

- **Концентрированный раствор для отмывания:** концентрированный раствор, для приготовления Рабочего раствора необходимо развести 1:10 водой лабораторной степени очистки. Содержит 0,1% азид натрия в качестве консерванта. Рабочий раствор является изотоническим буфером, имеющим ионную силу достаточную для отмывания эритроцитов от несвязанных антител.
- **Раствор для элюции:** Глициновый буфер, имеющий низкое pH, предназначенный для диссоциации антител с отмываемых эритроцитов. Продукт не содержит консервантов.
- **Буферный раствор:** Трис-буфер (гидроксиметил)-метан, содержащий БСА используется для нейтрализации кислоты Раствора для элюции после диссоциации связанных антител. БСА, использованный при производстве продукта, получен от животных, выращенных в США, проверенных и сертифицированных ветеринарной службой на предмет отсутствия заболеваний. Продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (трансмиссивного губчатого энцефалита). Содержит 0,1% азид натрия в качестве консерванта. С целью

определения оптимального pH в реагент добавлен голубой индикатор.

Компоненты набора могут быть использованы по отдельности с компонентами наборов других серий.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro. Хранить при комнатной температуре 15-30°C. Рабочий раствор хранить при температуре 1-10°C. Стремиться избежать контаминации реагентов. Не использовать при выраженном помутнении. Не замораживать. Не использовать после истечения срока годности. Не использовать буферный раствор, если он не имеет голубой цвет перед добавлением в элюат.



Концентрированный раствор для отмывания содержит 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидов натрия с водопроводными трубами.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Специальной подготовки пациентов перед взятием образца не требуется. Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции, исследовать максимально более свежий образец. Если проведение исследования откладывается, образец можно хранить при температуре 1-10°C в течение 72 часов.

Примечание: При хранении образца в течение времени, превышающего 72 часа, в нем может накапливаться свободный гемоглобин, затрудняющий получение оптимального pH при тестировании элюата.

Для исследования эритроцитов, покрытых антителами in vivo, целесообразно брать образец крови на антикоагулянт, поскольку для исследования требуется значительный объем эритроцитов. Наилучшим антикоагулянтом является ЭДТА. Дефибринированные образцы также пригодны для исследования.

Процедура исследования

Состав упаковки

Набор Gamma ELU-KIT II

Дополнительные материалы

Тестовые пробирки (12x75 для элюции, 10x75 или 12x75 для исследования элюата), пипетки, вода лабораторной степени очистки, водяная баня 37°C или инкубатор, изотонический раствор или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM) pH 6,5-7,5, таймер, центрифуга. Антиглобулиновый реагент, содержащий анти-IgG эритроциты, сенсibilизированные IgG и оптическое приспособление (лупа или микроскоп) для оценки элюата. Опционально можно использовать Gamma ReTM.

Проведение исследования

Подготовка элюата

Взять эритроциты, покрытые in vivo антителами или отобранные эритроциты, предварительно покрытые антителами при инкубации с сывороткой in vitro.

Примечание: Целью использования Раствора для отмывания является минимизация потерь антител с эритроцитов при диссоциации на этапе отмывания. Было отмечено, однако, что этот раствор низкой ионной силы может способствовать неспецифической фиксации на интактных эритроцитах антител, особенно если активность этих антител высока (8).

Перед приготовлением элюата для отмывания может быть использован также изотонический раствор. Это будет препятствовать неспецифической сорбции антител на эритроциты, но может привести к диссоциации и потерям искомым низкоаффинных антител при отмывании. Результатом будет низкая активность элюата или снижение содержания в нем антител. Если принято решение не использовать Рабочий раствор для отмывания, этап 1 проводить не следует.

1. Приготовить Рабочий раствор для отмывания путем добавления 1 объема концентрированного раствора для отмывания к 9 частям воды лабораторного качества очистки. Перед использованием тщательно перемешать. *Примечание: При разведении Концентрированного раствора концентрация в нем*

азид натрия падает настолько, что он перестает выполнять роль консерванта. Поэтому Рабочий раствор необходимо хранить при температуре 1-10°C и можно использовать только при отсутствии помутнения и в случае, если он не вызывает гемолиза эритроцитов.

2. Центрифугировать образец, предназначенный для исследования и удалить максимально возможное количество плазмы.
3. Однократно отмыть эритроциты изотоническим раствором. К концу отмывания остаток осадка эритроцитов должен составлять не менее 1 мл (20 больших капель).
4. Отмыть эритроциты еще 4 раза Рабочим раствором для отмывания оставшихся несвязанных антител. В случае неспецифической сорбции антител вместо Рабочего раствора для отмывания можно использовать изотонический раствор. Адекватное отмывание 1 мл осадка эритроцитов можно провести в пробирках 12x75 мм. После последнего отмывания оставьте небольшое количество супернатанта для контроля.
5. Внесите 1 мл (20 больших капель) осадка эритроцитов в чистую пробирку 12x75 мм и добавьте 1 мл (20 больших капель) Раствора для элюции и осторожно перемешать, перевернув пробирку 4 раза. Если после отмывания эритроцитов осталось меньше, чем 1 мл, для приготовления элюата взять соответственно меньше количество раствора для элюции, эквивалентное объему эритроцитов.
6. Немедленно центрифугировать 45-60 секунд при 3.400 об/мин (900-1000G). Более длительная экспозиция приведет к гемолизу. Присходящее при гемолизе высвобождение в раствор свободного гемоглобина приведет к изменению pH, которое потребует для коррекции добавление дополнительного количества буферного раствора.
7. Перенести супернатант в чистую пробирку. Оставшиеся эритроциты подлежат утилизации, поскольку они более непригодны для дальнейших исследований.
8. Добавить к супернатанту буферный раствор в количестве, необходимом для приведения pH в необходимые границы (6,4-7,6). Наличие в буферном растворе голубого красителя служит критерием адекватности добавления буфера в элюат. Не используйте буферный раствор, если перед добавлением в элюат он не имеет голубой цвет. Цвет раствора можно оценить после того, как раствор взят в пипетку. При контакте с кислым элюатом раствор пожелтеет. При достижении оптимального pH раствор вновь станет голубым и цвет раствора не изменится при перемешивании. Объем добавляемого буферного раствора может варьировать от исследования к исследованию в зависимости от ряда факторов, среди которых наиболее значима степень возникающего гемолиза и количество высвобождаемого гемоглобина. Кроме задержек на этапе элюции степень гемолиза может зависеть от возраста пациента и осмотической резистентности эритроцитов. Следует также иметь в виду, что дозирование раствора в каплях не является строгим. Наличие индикатора в буферном растворе является необходимым для определения pH получаемого раствора. Если цвет раствора остается желтым после добавления 20 капель (примерно 1 мл) буферного раствора, продолжайте по капле добавлять буферный раствор до получения голубого цвета раствора, устойчивого при перемешивании.
9. Хорошо перемешать содержимое пробирки, затем центрифугировать для удаления преципитата и клеточного детрита, затем перенести элюат в чистую промаркированную пробирку.

Теперь элюат готов для определения или идентификации антител. Если проведение дальнейших исследований откладывается, элюат может храниться при температуре 1-10°C в течение 7 дней, если не появится помутнение. Помутнение элюата может означать бактериальную контаминацию, которая может привести к получению неправильных результатов. Элюат можно хранить при данной температуре и более длительное время, если он был стерилизован путем мембранной фильтрации и если исследование проводится с контролем эритроцитов, дающих положительную и отрицательную реакцию со свежеприготовленным элюатом. Голубое окрашивание раствора при хранении может исчезать.

Исследование элюата

Элюаты могут быть исследованы при помощи стандартных методик определения антител, альтернативных методик, с помощью которых

пользователь может валидировать получаемые результаты для подтверждения их стабильности или при помощи последующей постановки модифицированного непрямого антиглобулинового теста. Применения потенциаторов таких, как БСА или раствор низкой ионной силы обычно не требуется, поскольку элюат уже сам по себе представляет раствор низкой ионной силы. Если в качестве потенциатора для увеличения чувствительности теста используется полиэтиленгликоль (Gamma PeG™), проводить модифицированный не прямой антиглобулиновый тест нельзя. При проведении непрямого антиглобулинового теста эритроциты после инкубации с элюатом необходимо отмыть минимум 3 раза изотоническим раствором, поскольку перед добавлением антиглобулинового реагента необходимо удалить все примеси потенциатора.

Примечание: Модифицированный не прямой антиглобулиновый тест не требует повторного отмывания эритроцитов после инкубации с элюатом, но зависит от качества отмывания эритроцитов от плазменных белков перед инкубацией с элюатом. Коммерческие эритроциты достаточно отмыты при приготовлении и могут быть использованы непосредственно из флакона, но эритроциты донора или пациента необходимо отмыть в изотоническом растворе минимум дважды, полностью удаляя супернатант после каждого отмывания и тщательно ресуспендируя эритроциты после добавления новой порции раствора. После второго отмывания необходимо полностью удалить супернатант и добавить изотонический раствор, чтобы довести суспензию до концентрации 3-4%.

1. Внести 1 каплю суспензии отмытых эритроцитов в промаркированную пробирку. Добавить небольшое количество (5-10 капель) изотонического раствора. Центрифугировать 30 секунд при 3.400 об/мин (900-1.000G), полностью удалить супернатант.
2. Добавить 2 капли элюата к осадку эритроцитов.
3. Хорошо перемешать содержимое пробирки и инкубировать 10 минут при 37°C. Инкубацию можно продлить до 30 минут. Продление инкубации может повысить чувствительность метода.
4. После инкубации добавить в пробирку 5-10 капель Рабочего раствора для отмывания и хорошо перемешать. Добавление 10 капель Рабочего раствора для отмывания может повысить эффективность отмывания.
5. Центрифугировать 30 секунд при 3.400 об/мин (900-1.000G).
6. Полностью удалить супернатант.
7. Добавить в пробирку 1-2 капли реагента Gamma-clone® Антиглобулиновый реагент или в соответствии с рекомендацией производителя. Добавление 2 капель реагента может повысить чувствительность метода.
8. Хорошо перемешать и центрифугировать:
 - 1 минуту при 1.000 об/мин (100-125 G), или
 - 15 секунд при 3.400 об/мин (900-1.000G), или
 - в соответствии с установленным для данной центрифуг. режимом.
9. Ресуспензировать эритроциты осторожным покачиванием пробирки и оценить наличие агглютинации. Отрицательный результат можно оценить с помощью оптического устройства. Фиксировать результаты.

Стабильность реакции

При проведении антиглобулинового теста этапы отмывания должны проводиться без задержек и оценка конечного результата также должна проводиться незамедлительно после окончания исследования.

Контроль качества

1. Все отрицательные результаты должны подтверждаться добавлением эритроцитов, сенсibilизированными IgG, например, Checkcell®, с последующим повторным центрифугированием и оценкой результата. Полученный при этом положительный результат подтвердит, что полученный ранее отрицательный результат не был обусловлен потерей активности антиглобулиновым реагентом.
2. Образец супернатанта, оставленный при последнем отмывании, должен тестироваться параллельно с элюатом. Целью этого исследования является показать, что антитела, присутствующие в элюате, были действительно получены с поверхности эритроцитов, а не явились следствием недостаточного отмывания. Если в контрольном супернатанте выявлены антитела, элюцию следует повторить после более тщательного

отмывания. Следует, однако, иметь в виду, что присутствие антител в элюате может быть связано также с диссоциацией антител при отмывании. Для проверки этой версии отмывание можно провести с использованием рабочего раствора для отмывания, взятого при температуре 1-10°C для того, чтобы диссоциацию антител свести к минимуму.

Интерпретация результатов

Если при тестировании элюата с эритроцитами соответствующих фенотипов наблюдается агглютинация, это говорит о том, что на исходных эритроцитах были фиксированы антитела (при получении правильных результатов в контрольных тестах). Если исследование проводится в целях поиска антител к лекарственным препаратам, до того, как сделать заключение об отсутствии антител в элюате последний должен быть исследован с эритроцитами, на которых фиксирован соответствующий препарат (например, пенициллин).

Отсутствие агглютинации при исследовании элюата с соответствующими эритроцитами говорит об отсутствии антител в элюате.

Ограничения

Выявление антител, фиксированных на эритроцитах, в методике элюции зависит от следующих факторов:

1. Количество антител, фиксированных на эритроцитах. Когда производится элюция с эритроцитов, которые были подвергнуты инкубации с сывороткой или плазмой *in vitro*, результат зависит от соотношения количеств плазмы и эритроцитов, средней величины связывания данного антитела, количества, типа и доступности антигенных детерминант, а также насколько условия инкубации соответствовали равновесным условиям реакции.
2. Степень диссоциации антител при отмывании. Она может быть минимизирована, если отмывание производить Рабочим раствором, охлажденным до 1-10°C. В большинстве случаев удовлетворительный результат достигается при отмывании раствором, имеющим комнатную температуру.
3. Степень рекомбинации антител, происходящей до отделения элюата от клеток. При кислотной элюции эта степень минимальна, поскольку pH среды в данном случае неблагоприятно для связывания антител.
4. Степень денатурации иммуноглобулинов, происходящей при низком pH. При соблюдении правил проведения исследования она минимальна.

Также имеют значение и другие факторы:

5. Если положительный прямой антиглобулиновый тест обусловлен только компонентами комплемента, в элюате не будет выявлено антител.
6. Неправильное формирование pH элюата может привести не только к гемолизу, но и к последующей ингибции антител.
7. Элюат, полученный от клеток, которые хранились более 72 часов может обладать меньшей активностью, чем элюат, полученный от свежих эритроцитов. Для проведения элюции с эритроцитов, которые хранились длительное время, целесообразно использовать другие методики.
8. При проведении непрямого антиглобулинового теста с элюатом возможно получение ложноотрицательных результатов в случаях, когда эритроциты, взятые для исследования, были недостаточно хорошо отмыты от плазменных белков или в любом другом случае попадания в тест-систему протеинов иных, чем антитела, содержащиеся в элюате. О такой ошибке может говорить получение отрицательного результата с эритроцитами, сенсibilизированными IgG.
9. Использование раствора низкой ионной силы, как было показано (8), может усиливать возможность неспецифического связывания сильных антител антиген-негативными эритроцитами, приводя к получению ложноположительных результатов.
10. Если при добавлении в элюат буферного раствора не удастся получить голубое окрашивание раствора, это может говорить о деградации буфера. В этом случае элюат подлежит утилизации. При повторном исследовании убедиться, что буферный раствор имеет голубой цвет.

Характеристики реагентов

Набор Gamma ELU-KIT обеспечивает получение удовлетворительных результатов при соблюдении правил, изложенных в настоящей инструкции, и дает возможность определения большого количества иммуноглобулинов, фиксированных на эритроцитах. Эффективность данного продукта зависит от точности выполнения методики проведения

исследования. За дополнительной информацией обращайтесь в службу технической поддержки Иммукоп по телефону 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Библиография

1. Landsteiner K, Miller CP. Serological Studies on the blood of primates. II The blood groups of anthropoid apes. J Exp med 1925; 42:853-862/
2. Rubin H. Antibody elution from red cells. J Clin Path 1963; 16:70-73.
3. Chan-Shu SA, Blair O. A new method of antibody elution from red blood cells. Transfusion 1979; 19:182-185.
4. Kidd P. Elution of incomplete type of antibodies from erythrocytes in acquired haemolytic anaemia. J Clin Path 1949; 2:103.
5. Rekvig DP, Hannestad K. Acid elution of blood group antibodies from erythrocytes. Vox Sang 1977; 33:280-285.
6. Melvin JR, Sanfillipo JC, Dobra KW, Chronhoim LS, Maldonado. An improved method of acid elution and its application in obstetric and immunohematology. Am J Obstet Gynecol 1981; 141:25.
7. van Oss CJ, Beckers D, Engelfriet CP, Absolom DR, Neumann AW. Elution of blood group antibodies from red cells. Vox Sang 1981; 40:367-371.
8. Leger RM, Amdt PA, Ciesielski DJ, Garratty G. Fals-positive eluate reactivity due to low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. Transfusion 1998; 38:565-572.



Реагент GammaZyme-F™

Стабилизированный Раствор Фицина

Для иммуногематологических исследований

- **IVD** In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature Limitation
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Реагент предназначен для проведения ферментного теста (с эритроцитами, предварительно прошедшими обработку ферментом) для определения антител к антигенам эритроцитов.

Общая информация: Протеолитические ферменты (в число которых входит фицин) способны изменять поверхность эритроцитов таким образом, что становится возможной прямая агглютинация их при помощи IgG в солевой среде. Этот эффект обуславливается удалением с поверхности эритроцитов сиаловой кислоты, что приводит к снижению поверхностного заряда эритроцитов и тем самым к уменьшению отталкивания между антигенами и антителами (1). Кроме того, происходит обрезание или укорочение пептидных цепей, препятствующих пространственному сближению эритроцитов, а также дополнительное открытие антигенных детерминант, приводящее к усилению фиксации антител (2).

Активность некоторых антигенов эритроцитов (M, N, Fy-a, Fy-b, Xg-a) при обработке эритроцитов ферментами значительно снижается, но активность других – Rh, P, Lewis, Kidd напротив, значительно возрастает, особенно в реакции прямой агглютинации после инкубации. Такое усиление активности не всегда наблюдается в присутствии антиглобулинового реагента, но для определения некоторых антител антиглобулиновый тест с эритроцитами, обработанными ферментами, является наиболее чувствительным методом исследования. Если в тест-системе присутствует также компонент, некоторые антитела (анти-Le-a, анти-Jk-a, анти-Vel, анти-P, анти-PP1, а также анти-A и анти-B) могут вызвать гемолиз антиген-положительных эритроцитов. Эта тенденция значительно усиливается в случае использования эритроцитов, обработанных ферментами, и поэтому наблюдается значительно чаще в ферментных тест-системах.

Принцип

Обработка эритроцитов фицином повышает реактивность некоторых антигенов эритроцитов и тем самым улучшает выявление соответствующих антител. В то же время обработка фицином снижает активность ряда антигенов, снижая взаимодействие их с соответствующими антителами. Эта особенность ферментного теста может быть использована с одной стороны для выявления некоторых слабых антител, с другой стороны – для дифференциальной диагностики антител в случае наличия у пациента антител нескольких специфичностей.

Реагент

Реагент GammaZyme-F™ представляет собой стабилизированный раствор фицина, включающий буфер. Содержит 0,1% азид натрия в качестве консерванта.

Предупреждения:

Реагент предназначен только для диагностики in vitro. Хранить при температуре 1-10°C. Не замораживать, не оставлять надолго при комнатной температуре, поскольку при этом может иметь место снижение активности реагента. Не разводить. Не использовать после истечения срока годности. На протяжении срока годности реагента может наблюдаться некоторое изменение его окраски, но снижение окрашенности раствора вплоть до соломенно-желтого или помутнение раствора может быть признаком того, что реагент испорчен. Следует избегать контаминации реагента.

Внимание: упаковка включает в себя грушу из натуральной резины.



Концентрированный раствор для отмывания содержит 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Специальной подготовки пациентов перед взятием образца не требуется. Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции, исследовать максимально более свежий образец. Если проведение исследования откладывается, образец можно хранить при температуре 1-10°C. Если эритроциты предполагается использовать для аутоабсорбции, образец крови следует брать на антикоагулянт с целью получения достаточного количества эритроцитов. Эритроциты, предназначенные для обработки фицином, могут быть заготовлены на антикоагулянт (ЭДТА, гепарин или оксалат) и храниться не дольше 48 часов при температуре 1-10°C, могут быть взяты из контейнера с кровью донора, могут быть взяты также коммерческие эритроциты (на протяжении их срока годности) или эритроциты из коагулированной крови не более 21 дня хранения. Сыворотка или плазма, предназначенная для проведения исследования, должна быть отсепарирована как можно быстрее после заготовки образца. В случае предполагаемой гемотрансфузии образец должен храниться так долго, как это требуется в соответствии с местными правилами.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент GammaZyme-F™

Дополнительные материалы

Тестовые пробирки (12x75 для элюции, 10x75 или 12x75 для исследования элюата), пипетки, водяная баня 37°C или инкубатор, изотонический раствор pH 6,5-7,5, таймер, центрифуга, оптическое приспособление (лупа или микроскоп), антиглобулиновый реагент, содержащий анти-IgG, эритроциты, сенсibilизированные IgG.

Проведение исследования

Обработка эритроцитов фицином

1. Предназначенные для обработки фицином эритроциты трижды отмыть изотоническим раствором. После последнего отмывания ресуспензировать эритроциты в изотоническом растворе, приготовить суспензию 3-4% концентрации. Если используются коммерческие эритроциты, их достаточно отмыть 1 раз и затем ресуспензировать в изотоническом растворе.
2. Внести 1 каплю отмытых эритроцитов в промаркированную пробирку. *Примечание: приведенная методика ориентирована на получение 1 капли эритроцитов, прошедших обработку, что достаточно для проведения 1 теста. Если необходимо получить больше эритроцитов (например, для того, чтобы провести с ними больше исследований или для использования для параллельного контроля качества), все объемы следует пропорционально увеличить.*
3. добавить 1 каплю реагента GammaZyme-F™ и хорошо перемешать.
4. Инкубировать 10 минут при 37°C ± 1°C.
5. Дважды отмыть эритроциты изотоническим раствором, затем ресуспензировать осадок в 1 капле изотонического раствора (или в объеме, эквивалентном объему суспензии, взятой в обработку). *Примечание: Эритроциты, обработанные протеолитическими ферментами, не рекомендуется ресуспензировать в растворе низкой ионной силы.*

Приготовленные таким образом эритроциты могут храниться до 48 часов при температуре 1-10°C без опасности гемолиза.

Скрининг антител

Варианты проведения методик обнаружения антител сильно варьируют между различными лабораториями. При этом используются различные соотношения объемов сыворотки и эритроцитов, длительность инкубации и приоритетность различных фаз исследования. Ниже приведен наиболее распространенный метод проведения исследования с эритроцитами, обработанными ферментом. Он может быть модифицирован в соответствии с принятыми документами, подтверждающими эффективность модификации.

1. Если была приготовлена 1 капля суспензии эритроцитов, добавить к ней 2-3 капли сыворотки или плазмы. Если было приготовлено большее количество эритроцитов, внести в чистую

промаркированную пробирку 2-3 капли сыворотки или плазмы и добавить 1 каплю приготовленной суспензии эритроцитов.

2. Хорошо перемешать и, если не предполагается поведение спин-исследования, перейти к этапу 6.
3. Если проводится спин-исследование, центрифугировать пробирки:
 - 1 минуту при 1.000 об/мин (100 -125 G) или
 - 15 секунд при 3.400 об/мин (900-1.000 G) или
 - Режим, рекомендованный для данной центрифуги.

4. Проверить на наличие гемолиза и зафиксировать результат. *Примечание: В отсутствие бактериальной контаминации гемолиз может означать наличие реакции антиген-антитела.*

5. Ресуспензировать осадок эритроцитов осторожным покачиванием пробирки, оценить наличие агглютинации и зафиксировать результат.

6. Инкубировать при температуре 37°C в течение 15 минут, затем центрифугировать снова, как указано в пункте 3. *Примечание: Время инкубации может быть увеличено до 60 минут.*

7. Повторить этапы 4 и 5.

8. Отмыть эритроциты минимум 3 раза, заполняя пробирку изотоническим раствором, осторожно удаляя супернатант после центрифугирования и ресуспензируя осадок в новой порции раствора. После последнего отмывания полностью удалить супернатант.

9. Добавить 1-2 капли реагента Gamma-clone антиглобулиновый реагент к «сухому» осадку эритроцитов или следовать инструкциям производителя реагента. Добавление 2 капель реагента может повысить чувствительность теста. *Примечание: Было показано, что некоторые антиглобулиновые реагенты могут давать неспецифические реакции с эритроцитами, обработанными ферментами (3); однако коммерческие реагенты перед выдачей в продажу тестируются с эритроцитами, обработанными ферментами и таких реакций не дают.*

10. Центрифугировать пробирку снова, как указано в пункте 3.

11. Ресуспензировать осадок эритроцитов и оценить наличие агглютинации. При этом можно использовать оптическое устройство. Фиксировать результаты.

12. Подтвердить отрицательный результат, добавив эритроциты, сенсibilизированные IgG, например, Checkcell, с последующим центрифугированием. Фиксировать результаты. Полученный на этом этапе положительный результат будет означать, что активность антиглобулинового реагента сохранена и что отрицательный результат исследования был достоверен.

Аутоабсорбция

1. Отмыть достаточное количество эритроцитов пациента изотоническим раствором 3 раза, после последнего отмывания удалить супернатант и оставить в пробирке концентрат эритроцитов. Для проведения абсорбции с 1 мл плазмы или сыворотки требуется обычно 1 мл концентрата эритроцитов. Такой объем эритроцитов можно адекватно отмыть в пробирке 13x100 мм.
2. Добавить к эритроцитам равный объем реагента GammaZyme-F.
3. Хорошо перемешать и инкубировать при температуре 37°C±1°C в течение 30 минут.
4. Дважды отмыть эритроциты изотоническим раствором и после второго отмывания полностью удалить супернатант, оставив эритроциты в пробирке.
5. Добавить сыворотку или плазму, подлежащую сорбции, хорошо перемешать и инкубировать в соответствии с нужной методикой (т.е. при 4°C для абсорбции холодовых антител и 37°C±1°C для абсорбции тепловых антител). Инкубация в течение 30 минут обычно не уступает по эффективности связывания антител более длительной инкубации.
6. Отделить сыворотку от эритроцитов центрифугированием и протестировать ее с эритроцитами на предмет адекватности проведенной аутоабсорбции. *Примечание: в ряде случаев приходится повторять аутоабсорбцию один и более раз для того, чтобы достигнуть удаления аутоантител достаточного для исследования на аллоантитела. В тех случаях, когда в наличии имеется ограниченное количество эритроцитов пациента, особенно при наличии холодовых аутоантител, повторную абсорбцию можно проводить с теми же эритроцитами, что и в первый раз. Для этого эритроциты*

после первой абсорбции нужно отмыть теплым изотоническим раствором для удаления с них сорбированных аутоантител. Повторная обработка фицином не требуется.

7. С сывороткой, освобожденной от аутоантител, провести скрининг аллоантител, используя необходимые методики. При этом иметь в виду, что, если пациент недавно получил гемотрансфузию, среди эритроцитов, использованных для аутоабсорбции, могли находиться также донорские эритроциты, которые могли сорбировать аллоантитела.

Контроль качества

При проведении лабораторных методик очень важен соответствующий контроль. При исследовании сыворотки или плазмы в методике с применением фицина очень важен аутоконтроль для выявления аутоантител, которые часто более активно взаимодействуют с эритроцитами, обработанными фицином.

Для рутинного контроля качества обработки эритроцитов фицином рекомендуется использовать слабые (или разведенные) антитела, реакцию с которыми надо ставить после приготовления каждой новой серии эритроцитов, обработанных фицином для подтверждения активности фицина. При этом следует выбирать такие антитела, про которые известно, что они более активно взаимодействуют с эритроцитами, прошедшими обработку протеолитическими ферментами.

Также в схему контроля качества следует включать свежую серологически инертную сыворотку для того, чтобы убедиться в том, что обработка ферментом не привела к повреждениям мембран эритроцитов, которые вызовут их агглютинацию нормальными сыворотками.

Интерпретация результатов

Агглютинация или гемолиз тест-эритроцитов означает наличие реакции антиген-антитело. Отсутствие агглютинации или гемолиза означает отсутствие антител, соответствующих антигенам, имеющимся на эритроцитах, прошедших обработку ферментом. Если имеет место агглютинация с необработанными эритроцитами, но в то же время с теми же эритроцитами, обработанными ферментом, агглютинация отсутствует, это говорит о том, что антитела направлены против антигенов, разрушаемых при обработке ферментом.

Ограничения

Как и во всех серологических процедурах, такие факторы, как контаминация материалов, нарушение режимов инкубации и центрифугирования, неправильная оценка агглютинации, а также отклонение от рекомендованной методики проведения исследования может привести к получению неправильных результатов. Методики с применением протеолитических ферментов особенно могут давать спорные результаты. Их повышенная чувствительность не ограничивается определением только клинически значимых антител, но имеет отношение также к аутоантителам (как тепловым, так и холодовым), которые могут не выявляться при проведении обычных методов исследования. Упомянутая аутореактивность против эритроцитов, обработанных фицином, может иметь диагностическое значение для распознавания аутоантител.

В дополнение к этому:

1. Следует иметь в виду, что некоторые антитела более активно вызывают гемолиз эритроцитов, обработанных фицином, и не забывать, что гемолиз означает положительный результат исследования.
2. При обработке ферментами часть антигенов эритроцитов уничтожается, поэтому ферментный тест не следует применять в качестве единственного метода скрининга антител. В то же время какая-то часть антигенов может сохраняться и давать положительную реакцию с антителами, которая, однако, будет слабее, чем реакция с интактными эритроцитами. Некоторые образцы антител анти-S могут взаимодействовать с эритроцитами, обработанными ферментами, и имеющими фенотип S-s+, но не S-s-.
3. Если аутоабсорбция проводится с эритроцитами пациента, который недавно получил гемотрансфузию, это может привести к удалению из сыворотки не только ауто- но и алло антител.
4. Неправильное хранение продукта может приводить к потере активности до истечения срока годности.

Характеристики реагентов

Все серии реагента GammaZyme-F стандартизованы при помощи антител, которыми в рекомендованной методике контролируется степень обработки эритроцитов. Каждая серия продукта вызывает потерю активности антигенов, чувствительных к воздействию протеаз, что проверяется постановкой реакций с соответствующими антителами. За дополнительной информацией обращайтесь в службу технической поддержки Иммукор по телефону 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Библиография

1. Pollack W, Hager HJ, Reckel R, Toren DA, Singer DA. A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. *Transfusion* 1965; 5:158-163/
2. Stratton F, Rawlison VI, Gunson HH, Phillip PK. The role of zeta potential in Rh agglutination. *Vox Sang* 1973; 24:273-279.
3. Beck ML, Hicklin B, Pierce SR. Unexpected limitations in the use of commercial antiglobulin reagents. *Transfusion* 1976; 71-75.



Реагент Capture-CMV® Положительная Контрольная Сыворотка (слабая)

Реагент Capture-CMV® Отрицательная Контрольная Сыворотка

Твердофазная система для определения антител IgG и IgM
против Цитомегаловируса (CMV)

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature Limitation
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Реагенты Immucor Capture-CMV Положительная Контрольная Сыворотка (слабая) и Immucor Capture-CMV Отрицательная Контрольная Сыворотка предназначены для использования в качестве контролей при проведении исследований Capture-CMV.

Общая информация

Тест Capture-CMV представляет собой методику, основанную на процедуре, описанной Plapp et al (1). В методике производится определение антител IgG и IgM с помощью твердофазной адгезии эритроцитов. Методика является непрямым антиглобулиновым тестом, в котором используются индикаторные эритроциты, покрытые антителами анти-IgG и анти-IgM (1,2). Получение достоверных результатов исследования зависит от следующих факторов:

1. Анти-IgM и анти-IgG активности реагента
2. Качества отмывания лунок микропланшеты перед добавлением индикаторных эритроцитов
3. Длительности и скорости центрифугирования
4. Длительности и температуры инкубации

Если во флакон с индикаторными эритроцитами попадет незначительное количество сывороточных протеинов, они могут нейтрализовать анти-IgG и анти-IgM антитела, находящиеся на поверхности индикаторных эритроцитов. Аналогично нейтрализация может произойти при недостаточном отмывании лунок перед внесением в них индикаторных эритроцитов. Реагент Capture-CMV Положительная Контрольная Сыворотка (слабая) предназначен для подтверждения активности индикаторных эритроцитов. Если с этим реагентом получена слабая или отрицательная реакция, это говорит о нейтрализации индикаторных эритроцитов.

Реагент Capture-CMV Положительная Контрольная Сыворотка (слабая) также показывает нарушения режимов инкубации и центрифугирования. Инкубация при температуре 18-30°C способствует взаимодействию антител против CMV с антигеном. Центрифугирование предназначено для того, чтобы облегчить адгезию индикаторных эритроцитов и тем самым показать результат реакции. Изменения режима инкубации по ходу использования прибора (изменение температуры инкубации или уменьшение времени инкубации) может привести к получению ложноотрицательного результата с реагентом Capture-CMV Положительная Контрольная Сыворотка (слабая). К тем же результатам может привести и увеличение интенсивности центрифугирования.

Реагент Capture-CMV Отрицательная Контрольная Сыворотка предназначен для контроля ситуаций, приводящих к ложноположительным результатам – снижение интенсивности центрифугирования и повышение температуры инкубации.

Принцип

Реагенты Immucor Capture-CMV Положительная Контрольная Сыворотка (слабая) и Immucor Capture-CMV Отрицательная Контрольная Сыворотка используются для постановки контролей в каждой серии исследований Capture-CMV. Результат с реагентом Capture-CMV Положительная

Контрольная Сыворотка (слабая) должен быть всегда положительным, с реагентом Capture-CMV Отрицательная Контрольная Сыворотка – всегда отрицательным. При получении иных результатов все результаты данной серии признаются недостоверными и исследование необходимо повторить.

Реагент

Capture-CMV Положительная Контрольная Сыворотка (слабая): Сыворотка крови человека, содержащая антитела IgG против CMV. Сыворотка откалибрована таким образом, чтобы ее активность соответствовала активности сыворотки слабopоложительного донора. Слабopоложительные доноры имеют титр антител не выше 1:2, такие доноры встречаются менее чем в 2% популяции доноров. Консервант - азид натрия (0,1%)*. Хранить при 1-10°C. По мере старения реагента может наблюдаться его легкое помутнение. Готов к использованию.

Capture-CMV отрицательная контрольная сыворотка: не содержит антител к антигену CMV. Консервант - азид натрия (0,1%)*. Хранить при 1-10°C. По мере старения реагента может наблюдаться его легкое помутнение. Готов к использованию.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур. Не использовать реагент с истекшим сроком годности. Значительное помутнение может означать микробную контаминацию. Не использовать контаминированные реагенты.

Реагенты предназначены только для проведения контрольных исследований в тестах Capture-CMV.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидата натрия с водопроводными трубами.

Обращаться с реагентами, как с инфицированным материалом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Взятие образцов для исследования следует производить в соответствии с инструкцией к тесту Capture-CMV.

Процедура исследования

Состав упаковки

Capture-CMV Положительная Контрольная Сыворотка (слабая) во флаконах с пипетками
Capture-CMV Отрицательная Контрольная Сыворотка во флаконах с пипетками

Дополнительные материалы

1. Реагент Capture-CMV индикаторные эритроциты в флаконах с пипетками
2. Микропланшеты Capture-CMV
3. Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками
4. Фосфатно-солевой изотонический буфер (примерно 15 mM) pH 6,5-7,5
5. Образцы плазмы или сыворотки донора или пациента
6. Центрифуга с ротором для микропланшет и их холдеров*
7. Автоматический или полуавтоматический отмыватель микропланшет или устройство для подачи раствора в микропланшеты.
8. Пипетки или распыляющие устройства для микропланшет
9. Таймер
10. Поверхность с подсветкой

11. Маркер
12. Пустые стрипы для балансировки

2. Sinor LT. Advances in solid phase red cell adherence methods and transfusion serology. Transf Rev Med 1992;6:26



* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими инстанциями.

Проведение исследования

1. К моменту начала исследования все реагенты и материалы должны иметь комнатную температуру.
2. Подготовить сыворотку или плазму донора или пациента согласно инструкции, прилагаемой к планшетам Capture-CMV.
3. Приготовить микропланшету Capture-CMV и внести в нее Capture LISS и исследуемые образцы в соответствии с инструкцией, прилагаемой к планшетам Capture-CMV.
4. Добавить по 1 капле (50±5 мкл) контрольных реагентов Capture в соответствующие лунки. Выполнять по одному контрольному исследованию на серию.
5. После инкубации промыть лунки микропланшеты используя автоматическое или полуавтоматическое оборудование согласно инструкции, прилагаемой к планшетам Capture-CMV.
6. По окончании исследования читать и фиксировать результаты.

При проведении исследований на автоматическом оборудовании руководствоваться соответствующей инструкцией для оператора.

Стабильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную визуальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Активность системы Capture-CMV оценивается при каждом исследовании путем включения в исследование положительного и отрицательного контролей. Использование контролей помогает выявить снижение активности реагентов и нарушения техники проведения исследований. Повторное получение неправильных результатов говорит о том, что индикаторные эритроциты или какой-либо иной реагент испорчен, или имеет место системная ошибка при проведении исследования.

Интерпретация результатов

Положительный контроль (слабый): Адгезия индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки или по части поверхности.

Отрицательный контроль: Адгезия индикаторных эритроцитов отсутствует, эритроциты образуют компактный осадок на дне лунки.

Сила реакции с положительной контрольной сывороткой (слабой) должна быть не слабее умеренной положительной реакции. Более слабая реакция говорит о том, что какой-либо реагент или прибор работает неправильно или имеет место нарушение техники проведения исследования. В этом случае есть возможность получения неправильного результата, так как может быть пропущен слабopоложительный образец.

Ограничения

Контрольные сыворотки Capture-CMV предназначены для контроля качества реагентов и приборов, а также техники выполнения тестов Capture-CMV. Реагенты не предназначены для валидации отрицательных результатов других тестов. Реагенты не предназначены для использования с ABS2000.

Ограничения метода исследования см. инструкцию к Capture-CMV.

Характеристики реагентов

См. инструкцию к Capture-CMV

Перед выпуском в продажу все партии реагента проверяются на активность применительно к назначенной методике. Дополнительная информация и техническая поддержка может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукоп по телефону 800-492-BLUD(2853) или 770-441-2051.

Библиография

1. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. Am J Clin Pathol 1984;82:719-721

70

Реагент Gamma-Quin®

Раствор Хлорохина Дифосфата

Для удаления иммуноглобулинов, связанных с эритроцитами

• IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

• $2-8^{\circ}\text{C}$ Temperature Limitation

• Discard if markedly turbid



Consult Instructions for Use
Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: Реагент Gamma-Quin используется для удаления иммуноглобулинов, связанных с эритроцитами.

Общая информация: При исследовании эритроцитов, положительных в прямом антиглобулиновом тесте, возникает ряд проблем. Если протеин, находящийся на эритроцитах, является IgG, проведение исследований в непрямом антиглобулиновом тесте оказывается невозможным, возможно только проведение исследований в солевой среде с использованием IgM, или модифицированными IgG, или моноклональных реагентов для определения группы крови.

Эффект хлорохина на реакцию антиген-антитело (1) и, в частности, влияние его *in vivo* на взаимодействие антител с антигеном Rh(D) (2) изучали в 1964 году Domokos и Aszodi. Хлорохин является производным хинолина, обычно используемым при лечении малярии. Также хлорохин эмпирически применялся для лечения различных иммунных заболеваний. В 1976 году Mantel и Holtz показали, что с помощью хлорохина дифосфата можно получить пригодный для исследований элюат эритроцитов больных аутоиммунной гемолитической анемией (3). В большинстве случаев инкубация эритроцитов больных идиопатической аутоиммунной гемолитической анемией в растворе хлорохина дифосфата приводит к полному удалению аутоантител с эритроцитов и получению отрицательного прямого антиглобулинового теста. При обработке эритроцитов больных аутоиммунной гемолитической анемией с клиническими проявлениями были получены высокоактивные элюаты, но эритроциты оставались положительными в прямом антиглобулиновом тесте. Такая же картина была получена у двух здоровых доноров с антителами, покрывающими эритроциты и у двух пациентов, имеющих заболевания, не имеющие отношение к гемолизу. Edwards, Mould и Judd использовали методику обработки эритроцитов хлорохином для удаления антител с целью последующего определения групп крови в непрямом антиглобулиновом тесте (4). Хотя обработка хлорохином не во всех случаях приводит к полному удалению аутоантител с эритроцитов, положительных в прямом антиглобулиновом тесте, тем не менее она является вполне достаточной для того, чтобы эритроциты стали пригодными для последующего определения группы крови или абсорбции тепловых аутоантител.

Принцип

Эритроциты, положительные в прямом антиглобулиновом тесте, инкубируются в изотоническом растворе хлорохина дифосфата до двух часов при комнатной температуре, затем отмываются и ресуспендируются в изотоническом растворе. Изучение реактивности антигенов эритроцитов при помощи реагентов, соответствующих требованиям FDA, в высокопротеиновых тест-системах и непрямом антиглобулиновом тесте показало, что обработка эритроцитов хлорохином не влияет на активность антигенов. В случаях, когда эритроциты после обработки хлорохином становятся отрицательными в прямом антиглобулиновом тесте, их можно использовать в дальнейших исследованиях в высокопротеиновых тест-системах и непрямом антиглобулиновом тесте. После обработки эритроцитов хлорохином не рекомендуется использовать их для исследований с реагентами IgM, модифицированными IgG (т.е. реагентами для проведения реакции в солевой среде) или моноклональными реагентами для определения группы крови, поскольку с этими реагентами может наблюдаться ослабленная реакция. Спонтанная агглютинация эритроцитов, покрытых иммуноглобулинами, в тестах с низкопротеиновыми реагентами наблюдается довольно редко. Для типирования антигенов в солевой среде и с использованием моноклональных реагентов обработка хлорохином как правило не требуется. До проведения обработки хлорохином в таких случаях следует

провести контрольное исследование с реагентами, активными в солевой среде для выявления спонтанной аутоагглютинации (как рекомендовано производителем реагентов).

Эритроциты, обработанные хлорохином, могут быть использованы также для аутоабсорбции тепловых аутоантител в образцах сыворотки или плазмы перед определением аллоантител. Даже если обработка хлорохином не приводит к полному удалению иммуноглобулинов с эритроцитов, сила положительного прямого антиглобулинового теста может быть снижена настолько, что это позволит интерпретировать результаты определения группы крови и увеличить эффективность тепловой аутоабсорбции. Обработка хлорохином не удаляет с эритроцитов компоненты комплемента, однако это не влияет на результаты непрямого антиглобулинового теста с анти-IgG реагентами.

Реагент

Реагент Gama-Quin представляет собой примерно 16% раствор хлорохина в фосфатно-солевом буфере, pH 5,0±0,1. Не содержит консервантов.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики *in vitro*. Не разводить. Не замораживать. Не использовать при помутнении или изменении окраски. Избегать контаминации реагента. Не использовать после истечения срока годности.

Внимание: упаковка реагента содержит грушу из натуральной резины.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Специальной подготовки пациента перед взятием образца крови не требуется. Образец крови взять с соблюдением правил асептики предпочтительно на антикоагулянт. Образец следует исследовать как можно быстрее после взятия. Если проведение исследования откладывается, образец следует хранить при температуре 1-10°C. Бактериальная контаминация образца может привести к получению неправильных результатов. Образец, взятый на ЭДТА, нельзя хранить более 7 дней. Образцы, взятые на оксалат или гепарин, следует исследовать в течение 2 дней. Допустимо использовать образцы, взятые в сухие пробирки, но при этом могут возникнуть сложности с получением достаточного количества эритроцитов. Эритроциты, полученные из коагулированных образцов, или из образцов, взятых на ACD или CPD, могут быть использованы в течение 21 дня.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент Gama-Quin

Дополнительные материалы

Тестовые пробирки (рекомендуемый формат 12x75 мм), пипетки, изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5, центрифуга, таймер. Для соответствующих методик – антиглобулиновый реагент и реагенты для определения антигенов эритроцитов.

Проведение исследования

1. Приготовить образец эритроцитов для обработки, отмыв их минимум три раза в большом объеме изотонического раствора для удаления сыворотки или плазмы. Необходимо получить минимум 0,5 мл осадка эритроцитов. Если эритроциты нужны для аутоабсорбции, необходимо получить их в большем количестве, при этом количество реагента Gamma-Quin в пункте 3 необходимо скорректировать соответствующим образом. Соотношение объемов реагента и эритроцитов должно быть 4:1.
2. Внести 10 капель (примерно 0,5 мл) отмываемых эритроцитов в промаркированную пробирку.
3. Добавить 40 капель (примерно 2,0 мл) реагента Gama-Quin и тщательно перемешать.
4. Инкубировать 2 часа при комнатной температуре (23±3°C). Время, необходимое для диссоциации, может быть различным для различных пациентов. Минимальным возможным для диссоциации иммуноглобулинов временем следует считать 30 минут. При желании исследователя для мониторингирования диссоциации через каждые 30 минут можно проводить прямой антиглобулиновый тест. Не следует проводить инкубацию дольше 2 часов.
5. Отмыть эритроциты минимум 3 раза в большом количестве изотонического раствора для удаления хлорохина. При обработке отдельных образцов может наблюдаться небольшой гемолиз, обращать внимания на него не следует. Примечание:

при использовании пробирок, имеющие объем меньше, чем рекомендованный, отмывать эритроциты следует больше 3 раз.

6. Провести прямой антиглобулиновый тест для того, чтобы определить полноту диссоциации антител и пригодность эритроцитов для фенотипирования.
7. Реусуспензировать эритроциты до 3-4% концентрации для проведения последующих исследований. Если эритроциты предназначены для тепловой аутоабсорбции, их можно оставить в концентрате. Если нужно, перед проведением аутоабсорбции эритроциты можно также подвергнуть обработке ферментами.

Контроль качества

Единственный необходимый контроль заключается в проведении прямого антиглобулинового теста после обработки хлорохином, как рекомендовано в пункте 6. Прямой антиглобулиновый тест не станет отрицательным во всех случаях, но сила реакции в нем значительно уменьшится, что позволит достоверно определять группу крови, а также использовать эритроциты для тепловой аутоабсорбции.

В отдельных случаях обработка хлорохином может не приводить к удовлетворительному результату, но, если получение неудовлетворительных результатов станет регулярным, то это может говорить о том, что реагент испорчен. Для контроля эффективности процедуры можно сенсибилизировать D-положительные эритроциты антителами анти-D и далее подвергнуть обработке хлорохином. Антитела, фиксированные на эритроцитах *in vitro* как правило диссоциируют труднее, чем аутоантитела, но значительное ослабление реакции при проведении прямого антиглобулинового теста будет говорить о том, что активность реагента сохранена.

Интерпретация результатов

Отрицательный прямой антиглобулиновый тест говорит о том, что иммуноглобулины полностью удалены с поверхности эритроцитов и, следовательно, эритроциты могут быть использованы в методиках с применением непрямого антиглобулинового теста либо с применением каких-либо потенциаторов, которые могут вызвать спонтанную агглютинацию эритроцитов. Даже значительное снижение силу реакции в прямом антиглобулиновом тесте может облегчить дальнейшее проведение исследований с эритроцитами или сделать более эффективной тепловую аутоабсорбцию. Обработка хлорохином может снизить реактивность некоторых антигенов эритроцитов. Edward, Moulds и Judd (4) не отмечали снижения реактивности антигенов при проведении непрямого антиглобулинового теста с антителами установленной силы. Однако в последующих работах Sasseti и Nickolls были показаны ложноотрицательные результаты, полученные при определении антигенов Rh реагентами, содержащими химически модифицированные IgG. Поскольку обычно не является необходимым проводить обработку эритроцитов хлорохином перед исследованием с реагентами, активными в солевой среде (на основе IgM или химически модифицированных IgG), это наблюдение еще не означает, что обработка хлорохином приводит к повреждению поверхностных антигенных структур, которая может быть выявлена при рутинном тестировании. Позднее в ряде работ (6,7) было показано, что обработка хлорохином может приводить к получению ложноотрицательных результатов даже при определении антигенов эритроцитов в непрямом антиглобулиновом тесте. McShane и Cornwall предостерегали против использования низкоavidных антител в низком титре, полученных от одного донора для тестирования эритроцитов, обработанных хлорохином, и эта рекомендация должна учитываться при лицензировании реагентов, предназначенных для определения групп крови. Возможно также, что даже высокоактивные антитела могут давать ложноотрицательные результаты с эритроцитами, обработанными хлорохином в случаях, если антиген изначально присутствовал на эритроцитах в ослабленном виде. Таким образом, результаты определения антигенов на эритроцитах, прошедших обработку хлорохином, должны интерпретироваться с осторожностью.

Если после обработки хлорохином эритроциты дают положительную реакцию в прямом антиглобулиновом тесте с реагентами анти-IgG, C3d или полиспецифическим антиглобулиновым реагентом, это может говорить о том, что на эритроцитах присутствуют только компоненты комплемента. Для подтверждения этого предположения следует провести прямой антиглобулиновый тест с реагентом анти-IgG. Если результат окажется отрицательным, дальнейшие исследования следует также проводить с реагентом анти-IgG.

Если обработка хлорохином не приводит к значительному снижению силы реакции в прямом антиглобулиновом тесте с анти-IgG, это говорит о том, что данный метод обработки не приводит в данном случае к диссоциации антител.

Ограничения

Как и при проведении всех серологических тестов, такие факторы как контаминация материалов, неправильное время или температура инкубации, режим центрифугирования, оценка агглютинации и отклонения от рекомендованной методики проведения процедур могут приводить к получению неправильных результатов. В дополнение к этому:

1. Инкубация в течение 2 часов может не привести к полностью отрицательному прямому антиглобулиновому тесту. Увеличение времени инкубации или повторное проведение инкубации с реагентом может привести к снижению реактивности антигенов эритроцитов.
2. При обработке эритроцитов данным реагентом компоненты комплемента с эритроцитов не удаляются.
3. При обработке некоторых образцов может возникнуть небольшой гемолиз, на который не следует обращать внимания. Гемолиз может быть связан со сроком хранения заготовленных образцов, характером использованного для заготовки антикоагулянта или, в отдельных случаях, с повышенной ломкостью обработанных эритроцитов.
4. При типировании антигенов эритроцитов, прошедших обработку хлорохином следует с осторожностью интерпретировать результаты исследования, поскольку сила реакции может быть ниже ожидаемой от необработанных эритроцитов, даже при использовании непрямого антиглобулинового теста или протеиновых потенциаторов, соответствующих требованиям FDA. Для исследования эритроцитов, прошедших обработку, не следует использовать реагенты, предназначенные для реакции в солевой среде, т.е. реагенты, основанные на IgM или химически модифицированные IgG, а также моноклональные реагенты, поскольку в этих случаях возможно получение ослабленных реакций и возрастает возможность получения ложноотрицательных результатов.
5. Альтернативной целью применения методики обработки эритроцитов хлорохином является удаление антигена Bg с целью идентификации антиэритроцитарных антител (8). В основу этого метода положены данные о том, что с тромбоцитов и нейтрофилов при помощи обработки хлорохином могут быть удалены антигены HLA и этот метод может быть также успешно использован для снижения активности антигенов Bg на эритроцитах. Результаты скрининга антител с эритроцитами, прошедшими данную обработку, должны оцениваться с осторожностью, поскольку снижение реактивности антигенов эритроцитов при обработке хлорохином может приводить к получению отрицательных результатов со слабыми антителами и других специфичностей кроме анти-Bg.

Характеристики реагентов

Реагент Gamma-Quin (раствор хлорохина дифосфата) при соблюдении рекомендаций по применению способствует диссоциации IgG, фиксированных на эритроцитах человека. Достижимый эффект не сопровождается выраженным снижением реактивности основных наследуемых антигенов, определяющих группу крови, что подтверждается исследованиями с лицензированными реагентами для определения группы крови в непрямом антиглобулиновом тесте либо в высокопротеиновых тест-системах. Тестирования продукта на способность удалять с эритроцитов антиген Bg не проводилось. Сила экспрессии данного антигена может сильно варьировать и в связи с этим систематизация данных по обработке Bg+ эритроцитов затруднительна в силу их малочисленности. Характеристики продукта соответствуют требованиям, предъявляемых к методике его применения. За дополнительной информацией обращайтесь в службу технической поддержки Иммукоп по телефону 800-492-BLUD (2583) или 770-441-2051.

Библиография

1. Domokos V, Aszodi L. The effect of chloroquine on the isoantibody reaction of red blood cells. *Haemat Hung* 1964; 4:179-186.
2. Domokos V, Aszodi L. The in vivo influencing of Rh(D) antigen-antibody reaction by chloroquine. *Haemat Hung* 1964; 4:355-360.
3. Mantel W, Holtz G. Characterisation of autoantibodies to erythrocytes in autoimmune haemolytic anaemia by chloroquine. *Vox Sang* 1976; 30:453-463.
4. Edwards JM, Moulds JJ, Judd WJ. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes: a new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. *Transfusion* 1982; 22:59-61.
5. Sasseti R, Nicholls D. Decreased antigen reactivity caused by chloroquine. (Letter to the editor). *Transfusion* 1982; 22:537-538.

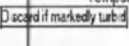
6. Mallory D, Reid M. Misleading effects of chloroquine. (Letter to the editor). Transfusion 1984; 24:412.
7. MaShane K, Cornwall S. Chloroquine reduces antigen strength. (Letter to the editor). Transfusion 1985; 25:83.
8. Swanson JL, Sastamoinen R. Chloroquine stripping of HLA A,B antigens from red cells. (Letter to the editor). Transfusion 1985; 25:439-440.



Реагенты для определения группы крови

immuClone® Anti-A IgM, immuClone® Anti-B IgM,
immuClone® Anti-A,B IgM

Для определения группы крови по системе ABO на плоскости, в пробирке или в микропланшете

- **IVD** In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature limitation
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
-  Discard if markedly turbid



Назначение: immuClone® Anti-A IgM, immuClone® Anti-B IgM, immuClone® Anti-A,B IgM являются реагентами для определения группы крови по системе ABO на плоскости, в пробирке или в микропланшете.

Общая информация

В 1900 году Ландштейнер заметил, что эритроциты одних людей агглютинируются сывороткой других.¹ На основании этих наблюдений он выделил три группы крови – A, B и O.² В 1902 году Декастелло и Штурли описали четвертую группу крови – AB.³

Группа крови системы ABO взрослого человека может быть определена при помощи реакции агглютинации эритроцитов анти-A и анти-B реагентами, полученными из человеческой сыворотки или моноклональными антителами. Моноклональные антитела, выделенные из гибридомных культур, являются основой для изготовления активных высокоспецифичных реагентов, эффективность которых для определения групп крови была показана многими исследователями.⁴⁻⁷

Взрослые люди, не имеющие антигенов A и/или B как правило имеют соответствующие им антитела. Антитела Анти-A и анти-B могут вызывать тяжелые посттрансфузионные реакции а также гемолитическую болезнь новорожденных (ГБН). В связи с возможностью посттрансфузионных осложнений необходимо максимально достоверно определять группы крови донора и реципиента и для гемотрансфузии должен подбираться донор, совместимый по ABO.

Определение у взрослого человека группы крови по системе ABO всегда должно включать в себя определение в сыворотке антител анти-A и анти-B при помощи реакции со стандартными эритроцитами. На эритроцитах новорожденных экспрессия антигенов A и B слабее, чем у взрослых, поэтому при определении группы крови может наблюдаться более слабая реакция. Более того, сыворотка новорожденных, имеющих группы крови A, B и O, не всегда содержит соответствующие анти-A и анти-B антитела. Кроме того, вследствие пассивного переноса в сыворотке новорожденных могут присутствовать антитела матери, что может приводить к получению парадоксальных результатов, поэтому проводить определение группы крови у новорожденных перекрестным методом не следует. Эритроциты, имеющие подгруппы антигенов A и B, дают при прямой агглютинации с реагентами анти-A, анти-B и анти-AB более слабую реакцию, вплоть до отрицательной. Определение подобных фенотипов может быть важно с целью предотвратить возможную гемотрансфузию от донора, имеющего подгруппу антигена A, пациенту, имеющему группу O. Использование реагента анти-A,B целесообразно для подтверждения результатов, полученных с реагентами анти-A и анти-B. В некоторых странах использование реагента анти-A,B является обязательным.

Принцип

Прямая агглютинация исследуемых эритроцитов реагентом означает наличие на эритроцитах соответствующего антигена. Отсутствие агглютинации как правило означает отсутствие соответствующего антигена (см. Ограничения). Заключение о групповой принадлежности эритроцитов делается на основании результатов, полученных со всеми используемыми реагентами (см. Результаты). Если результаты прямой и перекрестной реакции не совпадают, заключение о групповой принадлежности не может быть сделано до разрешения противоречия.

Варианты подобных расхождений описаны в библиографических источниках 8 и 9.

Реагенты

immuClone® Anti-A, Anti-B, Anti-A,B моноклональные IgM морской свинки. Реагенты для определения группы крови, готовые для применения без дополнительного разведения или добавок.

Реагент Anti-A изготовлен из клона Birma-1 и окрашен в голубой цвет.

Реагент Anti-B изготовлен из клона LB-2 и окрашен в желтый цвет.

Реагент Anti-A,B представляет собой смесь антител клонов Birma-1, ES4 и ES15 и не содержит красителей.

Антитела содержатся в буферном растворе, включающем БСА (без стабилизаторов), ЭДТА, а также ингредиенты, способствующие облегчению ресуспендирования эритроцитов после центрифугирования. БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (губчатого энцефалита). В качестве консерванта используется азид натрия (в конечной концентрации 0,1%). pH реагентов 7,0.

Данные реагенты предназначены для использования без дополнительного разведения и добавок.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагентов не допускать их контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагентов на протяжении их срока годности. Помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагенты из немаркированных флаконов.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

Внимание:

Не раскрывать реагенты при помощи рта. Реагент не тестировался на отсутствие вирусов морских свинок.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Не использовать реагент после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции.

Для мануальных методик можно брать кровь в пробирки, содержащие гепарин, ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D или в сухие пробирки без антикоагулянта.

Для автоматических или полуавтоматических методик может потребоваться кровь, заготовленная на антикоагулянте. Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется

исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней; образцы, взятые в сухие пробирки – до 21 дня. Образцы, взятые на гепарин, ACD, CPD, CPD- γ , CP2D могут быть исследованы в сроки, указанные для соответствующих антикоагулянтов.

Процедура исследования

Состав упаковки

immuClone® Anti-A IgM, immuClone® Anti-B IgM, immuClone® anti-A,B IgM во флаконах, готовые для использования (с пипеткой для мануальных методик).

Дополнительные материалы

Для всех методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Метод исследования в пробирках

1. Пипетки
2. Пробирки 10x75мм или 12x75мм, штатив для пробирок
3. Центрифуга
4. Таймер

Метод исследования на микропланшетах (мануальный)

1. Пипетки или распыляющие системы (например, ABS PreciS, Hamilton Microlab AT, Packard Multiprobe 104/204)
2. Микропланшеты
3. Микропланшетная центрифуга (например, Sorvall T6000, IEC Centra-8, Jouan C422, Hettich 30F, Heraeus Labofuge 400)
4. Механический микропланшетный шейкер (например, Titramax 3101)
5. Микропланшетный ридер (например, I-STAR)

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Метод исследования на плоскости

1. Стеклопластиковая планшета
2. Маркер
3. Аппликаторные палочки (для стеклянной поверхности)
4. Таймер
5. Пипетки

Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Проведение исследования

А. Метод исследования в пробирках

1. Промаркировать по одной пробирке для каждого используемого в исследовании реагента
2. Внести по 1 капле (примерно 50мкл) реагента в соответствующие пробирки
3. Добавить по 1 капле (примерно 50мкл) 2-5% суспензии исследуемых эритроцитов, разведенных в физиологическом растворе, плазме или сыворотке. (Перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть). Содержимое пробирок перемешать, затем центрифугировать.*
4. Осторожно встряхнуть пробирки, чтобы ресуспендировать осадок. Оценить наличие агглютинации.
5. Фиксировать результаты исследования.

* Рекомендуемый режим центрифугирования: 15-30 секунд при 900-1000G или режим, рекомендованный для данной центрифуги,

обеспечивающий наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющий возможность легкого ресуспендирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых подгрупп антигенов А и В может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5–60 минут при температуре 18-30°C.

В. Метод исследования на микропланшетах

1. Промаркировать микропланшеты
2. Внести по 1 капле реагентов (примерно 50мкл) в соответствующие промаркированные лунки микропланшет
3. Приготовить 2-4% суспензию исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе (перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть)
4. Добавить по 1 капле суспензии исследуемых эритроцитов (примерно 50мкл) в каждую лунку микропланшет
5. Тщательно перемешать реакционную смесь либо покачивая микропланшеты вручную, либо используя шейкер.*
6. Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, обеспечивающем оптимальную реакцию.**
7. Встряхнуть микропланшеты для ресуспендирования неагглютинированных эритроцитов вручную, либо с помощью микропланшетного встряхивателя. Оценить агглютинацию в каждой лунке. Для этой цели может быть также использовано зеркало или микропланшетный ридер.
8. Фиксировать результаты.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых подгрупп антигенов А и В может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5–60 минут при температуре 18-30°C.

* Предполагаемое время работы для механического шейкера: 1) Перемешивание: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности. 2) Ресуспендирование: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности или время и скорость, рекомендованное для данного прибора производителем. Режим должен обеспечивать полное ресуспендирование, но не разрушать агглютинаты эритроцитов.

** Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, рекомендованном для данной центрифуги, обеспечивающем наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющем возможность легкого ресуспендирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

С. Метод исследования на плоскости

1. Промаркировать планшеты, на которых будет проводиться исследование
2. Поместить на отдельные планшеты по одной капле (примерно 50мкл) реагентов. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.

3. Добавить по одной капле исследуемой цельной крови (или 35-45% суспензии эритроцитов в физиологическом растворе или совместимой сыворотке или плазме) к каждому реагенту.
4. Отдельными палочками перемешать реагенты и образцы крови с тем, чтобы получились овальные капли примерно 20x40 мм. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя.
5. Наблюдать появление макроскопически регистрируемой агглютинации. На стеклянной поверхности при медленной ротации агглютинация появляется максимум в течение 2 минут. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.
6. Фиксировать результаты.

Стабильность реакции

Все результаты должны фиксироваться тотчас после окончания исследования. В дальнейшем может иметь место диссоциация комплексов антиген-антитело, что приведет к получению ложноотрицательных (или, как минимум, ложных «слабых») результатов. Результаты исследования на плоскости также должны оцениваться незамедлительно во избежание высыхания планшет и ошибочной интерпретации таких результатов, как ложных. Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после встряхивания планшеты после центрифугирования. В противном случае возможна ошибочная интерпретация результатов как вследствие диссоциации агглютинатов, так и вследствие повторного оседания эритроцитов.

Контроль качества

Для контроля активности реагентов immuClone® Anti-A IgM, Anti-B IgM, Anti-A,B рекомендуется ежедневно проверять эти реагенты с антиген-положительными эритроцитами, например, A₂B. Если реагенты удовлетворительно реагируют с такими эритроцитами, они считаются пригодными для работы.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: агглютинация эритроцитов
Отрицательная реакция: агглютинация эритроцитов отсутствует

Типовые результаты исследования

Группа крови	Реагент			Частота встречаемости в популяции США (%)	
	Анти-А	Анти-В	Анти-А,В	Европеоиды	Негроиды
A	+	0	+	40	27
B	0	+	+	11	20
O	0	0	0	45	49
AB	+	+	+	4	4

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов. Недостаточное или избыточное центрифугирование могут также приводить к ложноотрицательным и ложноположительным результатам.

Некоторые подгруппы антигенов А и В могут слабее взаимодействовать с реагентами, чем эритроциты большинства доноров. Реакции прямой агглютинации в пробирках, на плоскости или в микропланшетах с некоторыми из подгрупп могут быть отрицательными.

Реагент immuClone® Anti-A может не взаимодействовать со всеми образцами, классифицированными, как A_x, а также не взаимодействует с образцами эритроцитов, классифицированных, как B(A).

Реагент immuClone® Anti-B не взаимодействует с приобретенным антигеном В.

Реагент immuClone® Anti-A,B не взаимодействует с эритроцитами A_x. Образцы каждой партии реагента immuClone® Anti-A,B тестируются с тремя образцами эритроцитов A_x.

Эритроциты людей, имеющих некоторые заболевания, могут давать ложноположительные или ложноотрицательные реакции реагентами анти-А и анти-В.⁹ Некоторые образцы пуповинной крови также могут давать ослабленные реакции с этими реагентами. Пуповинная кровь, контаминированная гелем Вартона, может давать ложноположительные реакции.

Система АВО является единственной системой групп крови, в рамках которой индивиды старше 6 месяцев без дополнительной иммунизации вырабатывают антитела против отсутствующих у них антигенов. Поэтому для подтверждения результатов определения группы крови, полученных при исследовании эритроцитов используется реакция определения антител анти-А и анти-В в сыворотке с использованием стандартных эритроцитов. Однако, при этом могут возникать расхождения между результатами прямого и обратного типирования в случаях, когда в исследуемом образце обнаруживается неожиданный антиген или антитело или наоборот, какой-либо антиген или антитело оказывается утраченным. Более подробно такие возможности обсуждаются в ссылке 9. До окончательной регистрации результата исследования все подобные расхождения должны быть устранены.

Не следует использовать моноклональные реагенты, приготовленные из материала морских свинок, для непрямого антиглобулинового теста с использованием антиглобулинового реагента против антигенов человека. Аутоантитела, активные при комнатной температуре, могут приводить к ошибкам при определении групп крови. Предсказать существование этих антител до проведения теста невозможно. Если аутоантитела имеют достаточно высокий уровень активности, они могут вызывать неспецифическую агглютинацию стандартных эритроцитов в перекрестной реакции. Они также могут вызывать агглютинацию аутоэритроцитов, если определение группы крови реагентами анти-А и анти-В проводится без предварительного отмывания эритроцитов. По этой причине до принятия окончательного решения о групповой принадлежности необходимо проводить как прямую, так и обратную реакцию и внимательно сопоставлять полученные результаты. Все возникающие при этом противоречия следует изучать вне зависимости от силы наблюдаемых реакций. Сильная агглютинация, полученная при прямой реакции не может считаться более значимой, чем слабая агглютинация, полученная при реакции обратной, и наоборот. Некоторые аутоантитела лучше реагируют при комнатной температуре, если pH среды ниже 6,5. Реагенты immuClone® anti-A, anti-B и anti-A,B имеют pH 7,0. Неспецифическая агглютинация, вызванная аутоантителами может быть как слабой, так и сильной. Если имеет место повторное получение противоречивых результатов с неотмытыми эритроцитами, рекомендуется проведение исследования с другими реагентами имеющими pH 7,0, а также с другими стандартными эритроцитами.

При использовании микропланшетного метода: новые, не бывшие в употреблении пластиковые планшеты могут пассивно сорбировать на свою поверхность клетки и сывороточные протеины. Эта неспецифическая абсорбция может приводить к искажению результатов.¹¹ Каждая получаемая партия микропланшет должна валидироваться пользователем на предмет пригодности для использования.

При необходимости микропланшеты можно обрабатывать до использования для предотвращения неспецифической абсорбции. В качестве блокирующих реагентов могут применяться БСА (1-2%) или 1% желатин. Раствор следует инкубировать в лунках в течение 10 минут при 18-30°C, затем промыть лунки дистиллированной или деионизированной водой. После промывания максимально удалить воду из лунки и дать микропланшетам полностью высохнуть перед использованием.

Несоблюдение настоящих правил может приводить к снижению активности реагентов. Исследование на плоскости может быть недостаточно чувствительным для достоверного определения антигенов со сниженной экспрессией. Модификации, вносимые пользователем в методики, требуют дополнительной валидации.

Характеристики реагентов

Реагенты immuClone® anti-A, anti-B и anti-A,B отвечают требованиям, изложенным в Технической Спецификации для реагентов, содержащейся в Приложении II, Лист А директивы 98/79/ЕС, касающейся изделий для диагностики in vitro. Данные реагенты имеют характеристики эквивалентные или лучшие, чем необходимо в соответствии с указанной директивой.

Перед выпуском в продажу все реагенты immuClone® anti-A, anti-B и anti-A,B проходят контроль качества с панелью стандартных эритроцитов для подтверждения активности. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Присутствие контаминирующих антител, составляющая в популяции в среднем 1% или больше (включающие M(g) и Wt(a)), исключается путем тестирования с АВО-совместимыми эритроцитами или в тестах с реагентами, из которых предварительно путем сорбции удалены анти-A и анти-B. Антитела к антигенам Le(c) и Le(d) не подлежат обязательному исключению. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

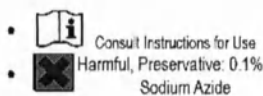
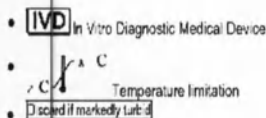
1. Landsteiner K. Zur der antifermentativen, lytischen und agglutiniereiden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe, Zbl Bakt 1990;27:357
2. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wien klin Wschr 1901;14:1132
3. Decastello A. Von, Sturli A. Über die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. Munchenmed Wchnschr. 1902;26:1090
4. Vcak D, Saks S, Alderson T et al. Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: evaluation as a blood grouping reagent. Vox Sang 1980;39:134
5. Munro AC, Inglis G, Blue A et al. Mouse monoclonal anti-A and anti-B as routine blood grouping reagents: an evaluation. Med Lab Sci 1982;39:123
6. Vcak D, Lennox E, Saks S et al. Monoclonal anti-A and anti-B : development as cost effective reagents. Med Lab Sci 1982; 39:109
7. Messeter L, Brodin T, Chester MA et al. Mouse monoclonal antibodies with anti-A, anti-B and anti-A,B specificities: some superior to human polyclonal ABO reagents. Vox Sang 1984;46:185
8. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6-th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1975:9-56
9. Nance ST. Serology of ABH and Lewis blood group systems. In: Wallace ME, Gibbs FL, eds. Blood group systems: ABH and Lewis. Arlington VA: American Association of Blood Banks, 1986:57-81
10. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
11. Crawford MN, Gottman FE, Gottman CA, Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion 1970;10:258

REF	Описание
0006401; 0006400	immuClone® Anti-A IgM
0066001; 0066080	immuClone® Anti-A Galileo IgM
0006407; 0006406	immuClone® Anti-B IgM
0066002; 0066081	immuClone® Anti-B Galileo IgM
0006409; 0006408	immuClone® Anti-A,B IgM
0066003; 0066082	immuClone® Anti-A,B Galileo IgM



Reagent Capture-CMV®

Твердофазная система для определения антител IgG и IgM против Цитомегаловируса (CMV)



Назначение: Твердофазная система адгезии эритроцитов Immucor Capture-CMV разработана для качественного определения антител IgG и IgM против цитомегаловируса в образцах сыворотки или плазмы. Система Capture-CMV предназначена для проведения скрининговых исследований доноров и пациентов с целью выявления наличия перенесенной инфекции CMV.

Общая информация

Цитомегаловирус является часто встречающимся вирусом человека из семейства вирусов герпеса. Наличие антител против CMV является признаком перенесенной инфекции. В этих случаях возможна реактивация инфекции. Инфекция CMV обычно протекает бессимптомно и может существовать в качестве латентной или хронической инфекции (1). Заражение вируса возможно при трансфузии крови или трансплантации органов от серопозитивных доноров (2).

Инфекция CMV может иметь значительно более серьезные проявления у пациентов с ослабленным иммунитетом, например, у недоношенных детей, реципиентов трансплантации органов или онкологических пациентов, являясь прямой или косвенной причиной повышения смертности у пациентов этих групп (2). При врожденной инфекции у новорожденных может иметь место тяжелая инклюзионная цитомегалия (CID) (3). Цитомегалия может вызывать тяжелые неврологические нарушения, такие как задержки развития, глухота, микроцефалия и дисфункция моторики. При трансфузии инфицированных продуктов крови или трансплантации органов от инфицированных доноров может возникать CMV-синдром мононуклеозного типа (1). Эта разновидность инфекции может также иметь место у новорожденных с недостаточным весом, получившим трансфузию CMV-инфицированного гемокомпонента.

Единственным способом профилактики инфекции CMV у иммунокомпроментированных серонегативных пациентов является отбор для трансфузии серонегативных гемокомпонентов, а также проведение трансплантации от серонегативных доноров. Система Capture-CMV является твердофазной системой адгезии эритроцитов, основанной на методике Rapp et al (4). Методика является модификацией теста смешанной агглютинации для определения антигенов и антител Coombs et al (5) и Nogman(6), в котором в качестве индикаторной системы используются иммуноглобулины анти-IgG и эритроциты, sensibilizированные IgG. В исследованиях Capture для определения антител к антигенам эритроцитов или тромбоцитов в качестве индикатора используются эритроциты, покрытые IgG(7). В системе Capture-CMV индикаторные эритроциты покрыты IgG и IgM.

Принцип

Включенный в состав реагента антиген CMV получен из цепи AD-169, выращенной на фибробластах эпидермиса человека. Подложка лунок микропланшетов приготовлена из инактивированного вируса. Микропланшеты высушены и поставляются вместе с сопутствующими реагентами и контролями.

Исследование представляет собой двухступенчатую методику твердофазной адгезии эритроцитов, проводимую в лунках микропланшетов, покрытых инактивированным вирусом. В лунки добавляется исследуемая сыворотка или плазма. Образцы инкубируются пять минут, в ходе чего происходит связывание антител против протеинов CMV, находящихся в исследуемом образце, с иммобилизованными вирусными протеинами. Несвязанные иммуноглобулины отмываются из лунок, после чего в лунки добавляется суспензия индикаторных эритроцитов, покрытых IgG и IgM. При центрифугировании антитела, находящиеся на эритроцитах, соединяются с антителами против CMV, соединенными с иммобилизованными на стенках лунок антигенами. При положительном

результате индикаторные эритроциты, соединенные мостиками антиген-антитело с подложкой лунок не могут смещаться на дно лунок и равномерно распределяются по их поверхности. Напротив, при отрицательном результате индикаторные эритроциты образуют компактный осадок на дне лунки в виде «пуговицы».

Реагент

Реагент Capture-CMV: Микропланшеты с U-образной формой лунок, покрытые экстрагированным в глицине и очищенным антигеном CMV, полученным из цепи AD-169, выращенной на фибробластах эпидермиса человека. Микропланшеты упакованы в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности, готовы к использованию. Хранить при температуре 1-30°C. Микропланшета не должна использоваться, если индикатор показывает наличие чрезмерной влажности (цвет изменился с голубого на розовый). Стрипы могут использоваться как по отдельности, так и все одновременно. Неиспользованные микропланшеты должны быть немедленно вновь завернуты в фольгу вместе с осушителем и индикатором влажности, поскольку избыточная влажность может повредить покрытие лунок. Неиспользованные микропланшеты должны быть тщательно завернуты, чтобы во время их последующего хранения к ним не проникала влага. После такой повторной упаковки микропланшета должна быть использована в течение двух недель (но не позднее срока годности), при этом индикатор должен показывать отсутствие избыточной влажности.

После вскрытия упаковки стрип должен быть использован в течение 1 часа.

Дополнительные реагенты для проведения исследования:

(поставляются отдельно)

Capture-CMV готовые индикаторные эритроциты: суспензия эритроцитов человека, покрытых IgG кролика и IgM козла против антигенов человека. Реагент суспензирован в буферном растворе, содержащем в качестве консервантов хлорамфеникол (0,25 мг/мл), неомидина сульфат (0,1 мг/мл) и гентамицина сульфат (0,05 мг/мл). Хранить при 1-10°C.

Capture-CMV положительная контрольная сыворотка (слабая): сыворотка крови человека, содержит антитела к антигену CMV. Активность реагента соответствует таковой для слабоположительного донора. У слабоположительных доноров имеет место титр антител не выше 1:2. Такие титры отмечаются менее чем у 2% серопозитивных доноров. Консервант - азид натрия (0,1%)*. Хранить при 1-10°C. По мере старения реагента может наблюдаться его легкое помутнение.

Capture-CMV отрицательная контрольная сыворотка: не содержит антител к антигену CMV. Консервант - азид натрия (0,1%)*. Хранить при 1-10°C. По мере старения реагента может наблюдаться его легкое помутнение.

Capture LISS: Раствор низкой ионной силы, содержит глицин, бромкрезол розовый и азид натрия 0,1% в качестве консерванта*. Хранить при температуре 1-10°C.

Дополнительные реагенты должны храниться при температуре 1-10°C.

Дополнительные реагенты могут использоваться до окончания срока годности с любой серией реагента Capture-CMV.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидата натрия с водопроводными трубами.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Источники всех продуктов обследовались на отсутствие инфекционных заболеваний в соответствии с правилами FDA. Однако в настоящее время не существует тестов, способных полностью гарантировать инфекционную безопасность.

К моменту начала исследования все реагенты и материалы должны иметь температуру 18-30°C.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Не использовать реагент с истекшим сроком годности. Не использовать флаконы с нарушенной герметичностью.

С исследуемыми образцами необходимо обращаться в соответствии с правилами OSHA для патогенных продуктов крови. Все продукты крови и материалы, с ними соприкасавшиеся, требуют обращения, соответствующего потенциально инфицированным материалам и утилизации с соответствующими предосторожностями. При работе с реагентами и исследуемыми образцами необходимо надевать защитные перчатки, а после окончания работы тщательно мыть руки. Никогда не раскапывать реагенты и образцы при помощи рта и избегать их контакта с кожей и слизистыми. Избегать разбрызгивания и образования аэрозолей.

Беречь реагенты от микробной контаминации. Проводить манипуляции с оборудованием правил асептики. Хранить неиспользуемые реагенты при надлежащей температуре.

Обращаться с реагентами и материалами, как с инфицированным материалом.

Кросс-контаминация образцов может приводить к ложноположительным результатам. Для исключения возможности кросс-контаминации для каждого нового образца следует брать новый наконечник.

Исследования должны проводиться на хорошо откалиброванном оборудовании, включая центрифуги и отмыватели. Использование плохо откалиброванного оборудования может привести к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

После начала исследования не допускать высыхания планшет.

Лунки планшет можно использовать только однократно.

Использование времени и температуры инкубации иной, чем указано в данной инструкции, может привести к получению неправильных результатов.

Хранить изотонический раствор для отмывания планшет в стерильном контейнере во избежание контаминации. Стеклопластиковые флаконы для многократного использования необходимо после промывки тщательно ополаскивать для удаления следов детергента.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции (8).

В исследование могут быть взяты образцы сыворотки или плазмы, заготовленной на ЭДТА, ACD, CPD, CP2D или CPDA-1. Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов рекомендуется проводить исследование как можно быстрее после заготовки. Если проведение исследования откладывается, образцы сыворотки или цельной крови, заготовленной на ЭДТА, CPD или ACD должны храниться при температуре 1-10°C сроком до 1 недели. Образцы цельной крови, заготовленной на CP2D или CPDA-1 могут храниться при температуре 1-10°C сроком до 42 дней. Допускается использование образцов, заготовленных на CPDA-1 или ACD, которые хранились при 18-25°C сроком до 5 дней. Образцы сыворотки или плазмы могут храниться в замороженном виде при температуре -20°C в морозильнике. Повторное замораживание образцов после размораживания не допускается. Если образцы хранились при температуре 1-10°C более указанного срока или при комнатной температуре более 5 дней, антитела с низкой активностью могут быть повреждены и перестать определяться.

Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура исследования

Состав упаковки

Микропланшеты Capture-CMV в упаковке из фольги

Дополнительные реагенты

1. Реагент Capture-CMV индикаторные эритроциты во флаконах с пипетками
2. Реагент Capture-CMV положительная контрольная сыворотка (слабая) во флаконах с пипетками
3. Capture-CMV отрицательная контрольная сыворотка во флаконах с пипетками

4. Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками

Дополнительные материалы

1. Автоматический или мануальный отмыватель микропланшет, вакуумный отсос или многоканальный шприц для заполнения микропланшет. **Примечание:** Система Capture-CMV допускает использование автоматических отмывателей для снижения риска, связанного с манипуляциями с продуктами крови пациентов
2. Центрифуга с ротором для микропланшет*
3. Пипетки и наконечники для дозирования 50 и 100 мкл жидкости или разовые пастеровские пипетки с размером капли 50±5 мкл. Также может быть использована и автоматическая пипетка
4. Стеклопластиковые или пластиковые пробирки
5. Таймер
6. Поверхность с подсветкой
7. Фосфатно-солевой изотонический буфер (примерно 15 mM), pH 6,5-7,5

Ответственность за валидацию дополнительного оборудования лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими инстанциями.

Для использования автоматических приборов см. соответствующие инструкции для операторов.

Проведение исследования

1. К моменту начала исследования все реагенты и материалы должны иметь комнатную температуру.
2. Вынуть из упаковки необходимое для исследования количество стрипов. Проверить состояние индикатора влажности. Если индикатор показывает повышенную влажность, не использовать стрип.

Примечание: Под одним исследованием понимается общее количество лунок, используемых одновременно для инкубации, отмывания и центрифугирования. Минимально за одно исследование можно использовать один стрип. Максимально – двенадцать стрипов по 8 лунок, вставленных в рамку. В каждое исследование должен быть включен положительный и отрицательный контроль.

3. Внести по 2 капли (100±10 мкл) реагента Capture LISS во все лунки.

Примечание: Розовый цвет реагента Capture LISS в присутствии плазмы или сыворотки должен измениться на синий или бирюзовый. Если изменения цвета не произошло, это может говорить о том, что сыворотку или плазму забыли добавить в лунку.

4. Добавить 1 каплю (50±5 мкл) реагента Capture-CMV положительная контрольная сыворотка (слабая) в первую лунку.
5. Добавить 1 каплю (50±5 мкл) реагента Capture-CMV отрицательная контрольная сыворотка во вторую лунку.
6. Добавить 1 каплю (50±5 мкл) исследуемого образца в третью лунку.
7. Добавить 1 каплю (50±5 мкл) следующего образца в четвертую лунку.
8. Аналогичным образом добавить в остальные лунки все оставшиеся образцы. Для каждого нового образца использовать новый наконечник пипетки во избежание кросс-контаминации.

Примечание: Каждый проводимый цикл исследования должен включать в себя минимум по одному образцу положительного (слабого) и отрицательного контролей. Это необходимо для контроля адекватности режимов центрифугирования и отмывания.

Образцы должны раскапываться в течение 20 минут. После того, как образец внесен в лунку, этапы 9-12 должны быть проведены безотлагательно.

9. Инкубировать стрипы Capture-CMV при температуре 18-30°C в течение 5 минут, но не более 30 минут.
10. Удалить из лунок смесь сывороток и реагента Capture-LISS (можно аспирировать), используя ручное или автоматическое оборудование.

а. Мануальная методика отмывания

- Удалить жидкость из лунок
- С помощью многоканального диспенсера или специального коллектора заполнить лунки изотоническим раствором. Раствор можно также разлить непосредственно

из флакона. Раствор должен подаваться в лунки без усилия, чтобы не повредить подложку.

- Опорожнить лунки, перевернув планшет над раковиной или контейнером для отходов и несколькими резкими движениями стряхнув из нее остатки жидкости.

- Промыть лунки изотоническим раствором минимум 6 раз.

6. Полуавтоматическая методика отмывания

Для использования полуавтоматических приборов см. соответствующие инструкции для оператора.

Примечание: Отмывающие приборы должны быть отрегулированы таким образом, чтобы после аспирации жидкости в лунках оставалось примерно 4-8 мкл жидкости. Жидкость не должна аспирироваться полностью.

11. Ресуспензировать Capture-CMV индикаторные эритроциты, осторожно перевернув флакон несколько раз. Незамедлительно добавить во все лунки по 1 капле (50 ± 5 мкл) Capture-CMV индикаторных эритроцитов.

12. Центрифугировать планшету в течение 1 минуты при 450-600G. Дождаться полной остановки ротора. Центрифугировать планшету еще раз при 1000-1400G в течение минуты. (Интенсивность центрифугирования G указана приблизительно для создания оптимальных условий для адгезии эритроцитов. Более точно режим центрифугирования должен быть установлен применительно к конкретной центрифуге).

Примечание: Чрезмерно интенсивное центрифугирование после добавления индикаторных эритроцитов может привести к ложноотрицательному или сомнительному результату вследствие повреждения подложки. Если после проведения исследования с положительной контрольной сывороткой (сильной) не получена адгезия эритроцитов по всей поверхности лунки, или после проведения исследования с Положительной контрольной сывороткой (слабой) не получена частичная адгезия эритроцитов, это может говорить о чрезмерно интенсивном центрифугировании. На результат могут также влиять параметры торможения центрифуги. Если торможение слабое и остановка центрифуги происходит слишком долго, результат может быть ложноотрицательным. Если торможение, напротив, чересчур сильное, это также может привести к искажению результатов. Параметры разгона и торможения центрифуги необходимо отрегулировать применительно к каждой конкретной центрифуге. В большинстве случаев к удовлетворительным результатам приводит разгон центрифуги в течение 5-30 секунд. Вибрация при торможении центрифуги может привести к получению слабых ложноположительных результатов. В таких случаях результат с отрицательным контролем будет неправильный. Не центрифугируйте планшету повторно. Повторить исследование, используя другую центрифугу.

13. Поместить планшету на поверхность с подсветкой и оценить наличие адгезии индикаторных эритроцитов в лунках. Для признания результатов достоверными в лунках с контрольными сыворотками должна иметь место следующая картина:

Положительная реакция с Положительной контрольной сывороткой (слабой) - наличие адгезии индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки.

Отрицательная реакция с Отрицательной контрольной сывороткой - адгезия отсутствует и индикаторные эритроциты образуют на дне лунки компактный осадок в виде «пуговицы».

14. Сравнить результат в каждой лунке с результатами положительного и отрицательного контроля. В случае, если имеет место сомнительный результат (неоднородный неконцентрический осадок со стертыми границами) или наблюдается неправильный результат в контроле исследование следует повторить.

Стабильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре $1-10^{\circ}\text{C}$. При этих условиях можно производить повторную визуальную оценку результата в течение 2 дней.

Контроль качества

Активность системы Capture-CMV оценивается при каждом исследовании путем включения в исследование положительного и отрицательного контролей. Если в каком-либо исследовании положительный контроль не дает положительный результат и/или отрицательный контроль не дает отрицательный результат, исследование необходимо повторить. Повторное получение неправильных результатов говорит о том, что како-либо из

реагентов испорчен, или имеет место системная ошибка при проведении исследования.

Интерпретация результатов

Отрицательная реакция: Адгезия индикаторных эритроцитов отсутствует, эритроциты образуют компактный осадок на дне лунки. Результат говорит о том, что в исследуемом образце не содержится определяемых антигенов. Данный пациент не был инфицирован CMV и может быть подвержен первичной инфекции.

Положительная реакция: Адгезия индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки или по части поверхности. Данный результат говорит о том, что пациент перенес ранее (или переносит сейчас) инфекцию CMV, представляет риск для передачи инфекции с продуктами крови, но не обязательно контагиозен.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов.

Образцы плазмы или сыворотки, взятые в пробирки с разделительным гелем, могут давать ложноположительные результаты. Пробирки с разделительным гелем не предназначены для использования в банках крови.

Добавление индикаторных эритроцитов в чрезмерных количествах может привести к получению ложноотрицательных или сомнительных результатов.

Система Capture-CMV предназначена для определения антител классов IgG и IgM против антигена CMV. Система не предназначена для выявления IgA и IgE, а также для дифференцировки IgG и IgM.

Результаты исследования неонатальных образцов должны оцениваться с осторожностью. Положительный результат обычно означает, что новорожденный получил антитела путем пассивного переноса от матери. Отрицательный результат может быть полезен для исключения вирусной инфекции. Диагноз активной инфекции в этом случае может быть поставлен только на основании культуральных исследований (9,10).

Наличие IgG или антител, связывающих комплемент, не означает наличия надежной защиты от инфекции (11).

Титрование антител только одного образца не может использоваться для диагностики текущей инфекции. Следует собирать образцы, взятые в острый период и во время выздоровления и исследовать параллельно. Выявление сероконверсии будет означать наличие первичной инфекции (12).

Получение положительного результата может быть недостоверным в случае, если пациент получал трансфузии гемокомпонентов в течение последних нескольких месяцев.

Образцы, взятые в начальном этапе CMV-инфекции, могут не содержать достаточного для определения количества антител. Если подозревается CMV-инфекция, рекомендуется взять второй образец через 2-7 недель после первого и исследовать оба образца параллельно. Наличие сероконверсии будет означать первичную инфекцию.

Интерпретация положительного результата при наличии клинической симптоматики должна производиться с осторожностью с учетом того, что при гетерофильно-положительном мононуклеозе или инфекции varicella zoster могут присутствовать гетерофильные IgM, дающие ложноположительные результаты при определении антител к CMV (14).

При инфекционном мононуклеозе гетерофильные IgM, способные взаимодействовать с антигеном CMV, выявляются в 30% случаев (15). Наиболее вероятным механизмом появления этих антител считается поликлональная стимуляция В-лимфоцитов вирусами Эпштейна-Барра. Однако, возможна также активация латентной CMV-инфекции. Гораздо реже встречается, но также описана обратная ситуация, когда при инфекции CMV вырабатываются гетерофильные антитела, способные взаимодействовать вирусами Эпштейна-Барра (13). Возможно, при этом происходит активация латентной инфекции EBV (13).

Чрезмерно интенсивное центрифугирование после добавления индикаторных эритроцитов может приводить к ложноотрицательным или сомнительным результатам вследствие повреждения подложки. Недостаточно интенсивное центрифугирование может привести к получению ложноположительных результатов.

Ожидаемые параметры

Частота распространения инфекции CMV зависит от географических, социально-экономических и возрастных факторов. Серологические исследования показали наличие антител к антигену CMV у 15-70% представителей взрослой популяции (17). Географическое распределение

частоты встречаемости антител против CMV, полученное с помощью исследования Capture-CMV, представлено в таблице.

Зона исследования	Географическое расположение	Частота выявления антител против CMV
Зона 2	Южные регионы США	59%
Зона 3	Западные регионы США	27%
Зона 5	Южные регионы США	34%
Зона 6	Средний запад США	49%
Зона 7	Северо-восточный регион США	31%

Характеристики реагентов

Характеристики продукта в значительной мере зависят от точности выполнения приведенной методики.

Срок годности Capture-CMV индикаторных эритроцитов составляет 60 дней от изготовления, которое производится непосредственно в день донации.

Эффективность методики изучалась в семи независимых лабораториях на материале 6.506 образцов. В группу обследования вошли как доноры, так и пациенты, для которых определение антител против CMV проводится рутинно.

Данные обследования группы пациентов:

Тест Capture-CMV изучался на материале 308 пациентов в двух независимых местах. В качестве контрольного теста использовался тест латексной агглютинации. Если возникали расхождения результатов, такие образцы исследовались в иммунофлуоресцентном метод (выявление IgM против CMV). Кроме того, эти образцы исследовались также в независимой лаборатории с помощью коммерческих реагентов для иммуноферментного анализа (выявление общих антител к CMV). На основании этих двух исследований делалось окончательное заключение по образцам, давшим противоречивые результаты. Результаты исследования приведены в таблице.

		Capture-CMV	
		Положительный	Отрицательный
Окончательный результат	Положительный	138	0
	Отрицательный	1	169

Относительная чувствительность – 100% (138/138)

Относительная специфичность – 99,4% (169/170)

Коммерческий тест латексной агглютинации показал относительную чувствительность 100% (138/138) и относительную специфичность 99,4% (169/170).

Данные обследования группы доноров:

Тест Capture-CMV изучался на материале 508 доноров в двух независимых местах (сравнивался с коммерческим тестом латексной агглютинации) и на материале 4367 доноров в трех независимых местах (сравнивался с коммерческим автоматическим тестом пассивной гемагглютинации). У доноров брались образцы сыворотки и плазмы (ЭДТА). Если возникали расхождения результатов между Capture-CMV и тестом латексной агглютинации, такие образцы исследовались в иммунофлуоресцентном метод (выявление IgM против CMV). Кроме того, эти образцы исследовались также в независимой лаборатории с помощью коммерческих реагентов для иммуноферментного анализа (выявление общих антител к CMV). Аналогичным образом при расхождении результатов между Capture-CMV и тестом пассивной гемагглютинации проводилось исследование с помощью коммерческих реагентов для иммуноферментного анализа (выявление общих антител к CMV). На основании этих исследований делалось окончательное заключение по образцам, давшим противоречивые результаты. Относительная чувствительность и относительная специфичность теста Capture-CMV определены с доверительным интервалом 95% и приведены в таблице.

Зона исследования	Относительная чувствительность		Относительная специфичность	
	Величина	Разброс	Величина	Разброс
Зона 2	100%	99,6-100	98,9%	96,7-100%
Зона 3	100%	99,3-100	99,5%	98,7-100
Зона 5	100%	99,9-100	100%	99,9-100
Зона 6	99,3%	98,7-99,9	99,5%	99,0-100
Зона 7	99,2%	98,5-99,9	99,4%	99,1-99,7

Доверительный интервал 95%.

Тест латексной агглютинации показал относительную чувствительность 9,5% (211/212) и относительную специфичность 99,3% (294/296), исследование проводилось в зонах 2 и 3. Тест автоматической пассивной гемагглютинации показал относительную чувствительность 96% (1313/1368) и относительную специфичность 99,2% (2573/2593), исследование проводилось в зонах 5-7.

Исследование с помощью системы Capture-CMV на материале 3537 доноров на автоматическом приборе Galileo показало относительную чувствительность 99,7% и относительную специфичность 99,6%. При проведении исследований в мануальном режиме или с применением полуавтоматического оборудования результаты составили соответственно 99,2% и 98,4%.

Воспроизводимость:

Воспроизводимость результатов исследования Capture-CMV проверялась с помощью двух различных панелей кодированных образцов, предоставленных в зоны испытания. В панели входило 25 образцов, исследование проводилось в пяти местах, в качестве метода сравнения использовался тест латексной агглютинации. Система Capture-CMV показала 9696,8% воспроизводимости результатов между разными местами проведения исследования (121 из 125 образцов). В трех местах, где в качестве метода сравнения использовался тест пассивной гемагглютинации, воспроизводимость определялась на панелях, составленных из 60 образцов, приготовленных из пула из 6 образцов плазмы. В этом исследовании тест Capture-CMV показал воспроизводимость 94,4% (170/180) между разными местами проведения исследования при выполнении исследований в один и тот же день и воспроизводимость 94,2% при выполнении исследований в различные дни. Суммарные данные по воспроизводимости Capture-CMV с учетом отрицательных, слабоположительных и умеренно положительных результатов исследований доноров представлены в таблице.

	Зона 5		Зона 6		Зона 7	
Сила реакции	Частота	Воспроизводимость	Частота	Воспроизводимость	Частота	Воспроизводимость
Отрицательная	65,9%	100%	51,4%	100%	69,5%	100%
Слабо Положительная	1,5%	91,7%	2,2%	83,3%	1,4%	83,3%
Умер. Положительная	3,1%	100%	4,4%	100%	2,7%	100%

Частота = частота встречаемости в популяции доноров

Для того чтобы показать отсутствие неспецифических реакций при исследовании образцов, взятых у пациентов, имеющих другие антитела IgG, было проведено исследование Capture-CMV с образцами, взятых у больных, имеющих herpes simplex (10), вирус Эпштейна-Барра (10), краснуху (8), ревматоидный фактор (5), токсоплазмоз (4) и антиядерные антитела. В исследование также было включено два образца, содержащие IgM против herpes simplex. Во всех случаях было отмечено отсутствие перекрестных реакций.

Перед выпуском в продажу все партии реагента проверяются с сыворотками, содержащими антитела против CMV, а также с сыворотками, антител не содержащими. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукоп по телефону 800-492-BLUD(2853) или 770-441-2051.

Библиография

- Ho M, ed. Characteristics of cytomegalovirus, In: Cytomegalovirus biology and infection. New York: Plenum Medical Book Co, 1982:9-32
- Adler SP. Transfusion-associated cytomegalovirus infections. Rev Infect Dis 1983;5:977-993
- Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moor EG, Walton PD, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection. N Eng J Med 1982; 306:945
- Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM et al. A solid phase antibody screen. Am J Clin Pathol 1984;82:719
- Coombs RRA, Marks J, Bedford D. Specific mixed agglutination: Mixed erythrocyte-platelet anti-globulin reactions for the detection of platelet antibodies. Br J Haematol 1956;2:84
- Hogman C. The principle of mixed agglutination applied to tissue culture systems. Vox Sang 1959;4:12
- Sinor LT. Advances in solid phase red cell adherence methods and transfusion serology. Transf Rev Med 1992;6:26

8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Publication H 4-A: Standard procedures for the collection of diagnostic blood specimens by skin puncture. Villanova PA: NCCLS, 1982
9. Chernesky MA, Ray CG, Smith TF. Laboratory diagnosis of viral infections, In: Cmitex 15. Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology, Washington DC: American Society for Microbiology, 1982:11
10. Starr SE, Friedman HM, Human Cytomegalovirus, In: Lennette EH, Balows A, Hausler WH Jr. Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology, 4-th ed., Washington DC: American Society for Microbiology, 1985:711-19
11. Cremer NE. Antibodies in serodiagnosis of viral infections, in: Lennette EH, ed. Laboratory diagnostics of viral infections, NEW York: Marcel Dekker, Inc., 1985:73
12. Klemola E, von Essen R, Wagner O et al. Cytomegalovirus mononucleosis in previously healthy individuals. Ann Intern Med 1969;71:11-19
13. Schmidt NJ. Update on class-specific viral antibody assays. Clin Immunol Newsletter 1984;5:81-85
14. Hanshaw JB, Niederman JC, Chessin LN. Cytomegalovirus macroglobulin in herpes-associated viral infections. J Infect Diseases 1972;125:304-306
15. Schmitz H. Detection of immunoglobulin M to Epstein-Barr virus by use of enzyme-labelled antigen. J Clin Microbiol 1982;16:361-366
16. Forsgren M, Demissie A. IgM Responses to EBV/CMV in cytomegalovirus and Epstein-Barr infections, In: Nahmias IJ, Dowdle WR, Schinazi RF, eds. The human herpes virus, an interdisciplinary perspective. North Holland, New York: Elsevier Scientific, 1981
17. Belts RF. The relationship of epidemiology and treatment factors to infection and allograft survival in renal transplantation, In: CMV: pathogenesis and prevention of human infection. New York: Alan R. Liss, Inc., 1984:87-89

CE
0088

Реагент Capture® LISS

Раствор Низкой Ионной Силы

Для твердофазной методики выявления антител Capture

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Consult Instructions for Use
-  Temperature Limitation
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
-  Discard if markedly turbid



Назначение: Раствор Capture LISS предназначен для использования в качестве потенциатора реакции, а также индикатора добавления образцов твердофазных системах выявления антител (Capture-R Select, Capture Ready-Screen, Capture-R Ready-ID, Capture-R Ready-ID Extend, Capture-P Ready Screen, Capture-CMV, Capture-S).

Общая информация

Ионная сила тестовой системы зависит от количества растворенных ионов. 92% осмолярности сыворотки человека обеспечивается растворенным NaCl и бикарбонатом (1). В серологических тестовых системах растворенный хлорид натрия дает положительные ионы в виде Na⁺ и отрицательные ионы в виде Cl⁻. Если эти ионы присутствуют в большом количестве, они способны ослабить связывание антител с антигенами (2).

При той концентрации ионов, которая имеет место в плазме или сыворотке (или в изотоническом солевом растворе) реакция антиген-антитело протекать может, но эти условия не всегда являются для нее оптимальной. Во многих случаях при понижении концентрации ионов в серологических системах до величины ниже физиологической приводит к усилению взаимодействия антигенов и антител.

Несколькими группами исследователей было показано, что раствор хлорида натрия низкой ионной силы усиливает взаимодействие антигенов и антител в серологических реакциях и позволяет сократить время инкубации (2-11). Для этих же целей используется раствор низкой ионной силы при выявлении антител к антигенам тромбоцитов (10). Реагент Capture LISS содержит краситель, который изменяет свой цвет в присутствии сыворотки или плазмы крови человека. Таким образом, реагент служит также индикатором добавления образца в лунки планшет Capture-R, Capture-P, Capture-CMV и Capture-S.

Принцип

Ионная сила среды проведения исследования ограничивается добавлением в нее раствора низкой ионной силы. Это позволяет облегчить выявление антител, а также снизить необходимое время инкубации.

Бромкрезол розовый изменяет свою окраску в присутствии протеинов, присутствующих в плазме или сыворотке человека. Изменение цвета реагента является признаком того, что исследуемый образец добавлен в лунку.

Реагент

Реагент Capture LISS представляет собой раствор низкой ионной силы, содержащий глицин и краситель бромкрезол розовый, а также азид натрия 0,1% в качестве консерванта. В присутствии плазмы или сыворотки человека реагент меняет цвет с розового на небесно-голубой или бирюзовый. Хранить при температуре 1-10°C.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro.

Перед использованием реагент должен быть согрет до 18-30°C. Хранить при температуре 1-10°C. Не использовать после истечения срока годности.

Не использовать реагент в случае помутнения или изменения окраски.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

РЕАГЕНТ ПРЕДНАЗНАЧЕН ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕСТАХ ТВЕРДОФАЗНОЙ АДГЕЗИИ CAPTURE.

Упаковка включает грушу из натуральной резины.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Руководствоваться требованиями, перечисленными в инструкциях по использованию тестов Capture-R Select, Capture Ready-Screen, Capture-R Ready-ID, Capture-R Ready-ID Extend, Capture-P Ready Screen, Capture-CMV, Capture-S.

Процедура

Состав упаковки

Реагент Capture LISS во флаконах с пипетками.

Дополнительные материалы

Для всех методик

1. Микропланшеты для проведения исследования и инструкции по их применению (Capture-R Select, Capture Ready-Screen, Capture-R Ready-ID, Capture-R Ready-ID Extend, Capture-P Ready Screen, Capture-CMV, Capture-S).
2. Индикаторные эритроциты и инструкции по их применению: Capture-R Ready (если выполняется исследование Capture-R Select, Capture-R Ready Screen, Capture-R Ready-ID или Capture-R Ready-ID Extend), Capture-P (если выполняется исследование Capture-P или Capture-P Ready Screen) или Capture-Indicator Cells для исследований Capture-CMV или Capture-S.
3. Фосфатно-солевой изотонический буфер (примерно 15 mM), pH 6,5-7,5

Для мануальных тестов с использованием полуавтоматического оборудования

1. Контрольные сыворотки Capture-R (если проводится какой-либо тест Capture-R), или контрольные сыворотки Capture-P (если проводится какой-либо тест Capture-P), или контрольные сыворотки Capture-CMV (если проводится тест Capture-CMV), или контрольные сыворотки Capture-S (если проводится тест Capture-S).
2. Таймер
3. Инкубатор 37°C, сухой нагревательный блок или водяная баня
4. Центрифуга с ротором для 1x8 или 2x8 стрипов или микропланшет
5. Раскапывающее устройство или пипетка для микропланшет
6. Поверхность с подсветкой
7. Флакон с изотоническим раствором или полуавтоматическое устройство для отмывания микропланшет.

* Ответственность за валидацию дополнительных устройств (перечисленных выше или иных) лежит на пользователе. Результаты валидации должны храниться в лаборатории и быть доступными для проверки контролирующими органами.

Для автоматического метода исследования

Для проведения исследования с использованием автоматического оборудования см. инструкцию для оператора к соответствующим приборам.

Проведение исследования

Мануальный или полуавтоматический метод

1. К началу исследования все реагенты и образцы должны иметь температуру 18-30°C.
2. Подготовить образец сыворотки/плазмы донора или пациента согласно инструкции, прилагаемой к реагенту Capture.
3. Подготовить лунки микропланшет Capture согласно инструкции.
4. Внести по 2 капли (100±10 мкл) реагента Capture LISS в каждую лунку, предназначенную для проведения исследования или контроля.

ПРИМЕЧАНИЕ: В присутствии сыворотки или плазмы реагент Capture LISS меняет цвет с розового на голубой или бирюзовый. Если реагент не поменял цвет, это может говорить о том, что в лунку забыли добавить исследуемый образец.

5. Добавить образец сыворотки/плазмы донора или пациента и инкубировать планшеты в соответствии с инструкцией по ее применению.
6. После инкубации отмыть планшеты вручную или используя полуавтоматическое оборудование согласно инструкции к планшетам.
7. Добавить в лунки планшеты индикаторные эритроциты и завершить исследование в соответствии с инструкцией к планшетам.

Автоматический метод исследования

Для проведения исследования с использованием автоматического оборудования см. инструкцию для оператора к соответствующим приборам.

Стабильность реакции

Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после центрифугирования. После центрифугирования лунки должны быть плотно закрыты во избежание испарения раствора и храниться при температуре 1-10°C. При этих условиях можно производить повторную визуальную оценку результата в течение 2 дней.

При проведении исследования с использованием автоматического оборудования см. инструкцию для оператора к соответствующим приборам.

Контроль качества

При проведении исследований на полуавтоматических и автоматических приборах контроль качества с положительными и отрицательными реагентами должен проводиться ежедневно для подтверждения пригодности реагентов для проведения исследований. Повторное получение неправильных результатов говорит о том, что какой-либо из реагентов испорчен, или имеет место системная ошибка при проведении исследования.

Интерпретация результатов

Отрицательный результат: Адгезия индикаторных эритроцитов отсутствует, эритроциты образуют компактный осадок на дне лунки.

Положительный результат: Адгезия индикаторных эритроцитов по всей поверхности лунки или по части поверхности.

При проведении исследования с использованием автоматического оборудования см. инструкцию для оператора к соответствующим приборам.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации реагента. Кроме того, ошибочные результаты могут быть получены при несоблюдении правил проведения исследований.

Ионная сила тестовой системы зависит от количества используемой сыворотки. Добавление сыворотки/плазмы в чрезмерном количестве может привести к повышению ионной силы раствора и снижению чувствительности системы.

Характеристики реагентов

Было показано, что реагент Capture LISS усиливает взаимодействие антигенов и антител в серологических тестах. Чувствительность тестов Capture-R Select, Capture-R Ready Screen, Capture-R Ready-ID, Capture-R Ready-ID Extend, Capture-P, Capture-P Ready-Screen, Capture-CMV, Capture-S описана в соответствующих инструкциях. Эффективность реагента зависит от соблюдения правил проведения исследований. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону 800-492-BLUD(2853) или 770-441-2051.

Библиография

1. Henry JB, ed. Clinical Diagnosis and management by laboratory methods. Philadelphia: WB Saunders Co., 1979:142.
2. Walsh RJ. The effect of electrolytes on the Rh agglutination reaction. Med J Aust 1948;1:793.
3. Atchley Wa, Bragavan NV, Masouredis SP. Influence of ionic strength on the reaction between human anti-D and D-positive red cells. J Immunol 1964;93:701.

4. Elliot M, Boosom E, Dupuy ME, Masouredis SP. Effects of ionic strength on the serologic behavior of red cell isoantibodies. Vox Sang 1964;9:396.
5. Hughes-Jones NC, Gardner B, Telford R. The effect of ionic strength on the reaction between anti-D and erythrocytes. Immunology 1964;7:72.
6. Low B, Messeter L. Antiglobulin test in low ionic strength salt solution for rapid antibody screening and crossmatching. Vox Sang 1974;26:53.



Реагент Субстанция Gamma Lewis

Содержит Субстанцию Le^a и Le^b человека

Для идентификации антиэритроцитарных антител

- IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
- Consult Instructions for Use
- Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
- Temperature Limitation
- Discard if markedly Luteal



Назначение: Субстанция Gamma Lewis предназначена для помощи при идентификации антиэритроцитарных антител путем нейтрализации антител анти-Le^a и анти-Le^b в сыворотке или плазме.

Общая информация

Некоторые антитела в организме человека существуют в растворимой форме, например, в слюне (1). Это обстоятельство может быть использовано для нейтрализации соответствующих антител. Примером антител, которые могут быть нейтрализованы, служат антитела к антигенам системы Lewis - анти-Le^a и анти-Le^b. Эти антитела часто абатываются вместе и поэтому могут взаимодействовать с большинством тест-эритроцитов панели для идентификации антител, затрудняя определение других антител, если они также присутствуют в образце. Добавление субстанции Lewis в исследуемый образец сыворотки или плазмы, подозрительный на наличие анти-Le^a или анти-Le^b антител, позволяет подтвердить наличие этих антител, а также провести дополнительные исследования образца для выявления других антител без использования тест-эритроцитов, типированных по антигенам Lewis.

Принцип

После добавления в определенных пропорциях субстанции Gamma Lewis в образец сыворотки или плазмы, содержащий антитела анти-Le^a и/или анти-Le^b в последующее тестирование образца с Le^a- или Le^b-положительными эритроцитами приведет к отрицательному результату. Таким образом, можно подтвердить результат идентификации антител, если провести параллельное исследование образца, в который добавлена субстанция и образца, в который субстанция не добавлена. Если в образце присутствуют дополнительные антитела, нейтрализация анти-Le антител может облегчить их идентификацию. Эффект разведения образца при этом будет минимальный, поскольку субстанция добавляется к образцу в пропорции 9:10, но и этого искажения можно избежать, если добавить к параллельно исследуемому образцу изотонический раствор в той же пропорции 1:10.

Реагент

Реагент Субстанция Gamma Lewis представляет собой стандартизованный раствор частиц субстанции Le^a и Le^b в фосфатно-солевом буфере. Содержит 0,1% азид натрия в качестве консерванта.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro. Хранить при температуре 1-10°C. Не замораживать. Не использовать при выраженном помутнении. Не использовать после истечения срока годности. Стараться избегать контаминации реагента.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Предупреждение: Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Обращаться с реагентом, как с потенциально инфицированным материалом.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Для проведения теста пригодны образцы, заготовленные для определения и идентификации антиэритроцитарных антител. Если количество образца недостаточно для проведения параллельного исследования, взять новый образец, руководствуясь правилами, изложенными в инструкции к тест-эритроцитам.

Процедура

Состав упаковки

Реагент субстанция Gamma Lewis.

Дополнительные материалы

Тестовые пробирки (12x75 мм или 10x75мм), пипетки, изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15 mM) pH 6,5-7,5, таймер, центрифуга, лупа или микроскоп.

Проведение исследования

1. Внести исследуемую сыворотку или плазму в необходимых объемах в две тестовые пробирки. Объем образца должен быть достаточен для последующих исследований, а также должен быть учтен для последующего добавления субстанции. Например, 10 капель образца может быть в дальнейшем подвергнуто только ограниченному исследованию, в то время как 1 мл может быть достаточен для проведения исследования с панелью эритроцитов.
2. Пробирки промаркировать и добавить в них:
 - в первую пробирку – субстанцию Gamma Lewis в пропорции 1:10 к объему образца (например, 1 каплю субстанции на 10 капель образца или 0,1 мл субстанции на 1,0 мл образца).
 - во вторую пробирку добавить аналогичное количество изотонического раствора.**Примечание:** Субстанцию следует вносить непосредственно в образец, а не на стенку пробирки.
3. Содержимое пробирок хорошо перемешать и оставить пробирки при комнатной температуре (23±3°C) на 5 минут. Инкубация в течение более длительного времени может усилить нейтрализацию.
4. Снова перемешать содержимое пробирок и провести параллельно предполагаемые исследования с панелями эритроцитов в соответствии с инструкциями к тест-эритроцитам. В состав панели должен входить как минимум один образец эритроцитов, дававших ранее положительную реакцию с образцом.
5. Интерпретировать и фиксировать результат.

Контроль качества

Методика проведения исследования предполагает учитывать возможный эффект разведения образца, которое происходит от добавления 1 части субстанции Lewis к 10 частям образца, включением параллельного теста с разведением образца изотоническим раствором. Важно, чтобы это параллельное исследование проводилось с тем же самым образцом. В случае, если с обоими образцами получен отрицательный результат с теми же эритроцитами, с которыми ранее был получен положительный результат, это может означать, что или наблюдается эффект разведения, сделавший невозможным выявление очень слабых антител, или условия проведения исследования не были идентичными в первый и второй раз. Например, если в первый раз исследование проводилось с эритроцитами, которые были только что вынуты из холодильника, а второй – после того, как эритроциты успели согреться, то первый тест мог быть более чувствительным, поскольку антитела анти-Le более активны при низкой температуре. Другая возможность заключается в том, что первое и второе исследование могли быть проведены с образцами, взятыми в разное время. Для контроля эффективности методики рекомендуется периодически проводить исследование с сыворотками, содержащими известные антитела анти-Le^a и анти-Le^b (например, с реагентом Gamma-clone Anti-Le^a и/или Anti-Le^b).

Интерпретация результатов

Если сыворотка, обработанная субстанцией, не вызывает агглютинации Le^a- и/или Le^b-положительных эритроцитов, а сыворотка, в которую был добавлен изотонический раствор, агглютинацию вызывает, присутствие антител анти-Le в образце можно считать доказанным.

Если образец, обработанный субстанцией Le и образец, субстанцией не обработанный, дают одинаковые и равные по силе и специфичности результаты, это говорит о том, что антитела, присутствующие в образце, субстанцией инактивированы не были. В большинстве случаев это означает, что данные антитела имеют иную специфичность, отличную от анти-Le. В редких случаях особенно активные антитела анти-Le при

добавлении субстанции Lewis могут быть или не нейтрализованы, или нейтрализованы только частично. В таких случаях между двумя образцами может наблюдаться разница в силе реакции 1+ и более. Если предполагается наличие частичной нейтрализации, исследование следует повторить, увеличив соотношение субстанции и образца до 1:5 или даже до соотношения 1:1, также добавляя эквивалентное количество изотонического раствора в параллельный образец.

В случае наличия нескольких антител включая анти-Lewis характер реакции с образцом, обработанным субстанцией, будет соответствовать ожидаемому результату для нескольких антител. Удаление из образца антител анти-Lewis облегчит идентификацию остальных антител, поскольку не будет необходимости использовать Le-отрицательные эритроциты. Также процедура удаления из образца антител анти-Le может быть полезна для определения группы крови ABO. В случае отсутствия в образце других антител, активных при данных условиях, удаление из образца антител анти-Le позволит подтвердить результаты, полученные при типировании эритроцитов.

Примечание: Продукт готовится из человеческого источника, содержащего также субстанцию H, поэтому анти-H антитела будут данным продуктом также нейтрализоваться.

Ограничения

Как и во всех серологических тестах, ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования и нарушении техники проведения исследования. Кроме того:

1. Антитела анти-Le, имеющие особенно высокую активность, могут быть только частично нейтрализованы при использовании рекомендованного количества субстанции.
2. Особо слабые антитела могут перестать определяться при добавлении субстанции и изотонического раствора в соотношении 1:10.
3. Кроме антител анти-Le данный продукт может нейтрализовать также антитела анти-H.

Характеристики реагентов

Было показано, что реагент субстанция Gamma P1 ингибирует агглютинацию Le^a- и Le^b-положительных эритроцитов антителами анти-Le при титре антител в сыворотке не менее 1:8. Субстанция не ингибирует другие обычно идентифицируемые антитела (к антигенам групп MNSs, Rh, Lutheran, Lewis, Duffy, Kidd). При правильном использовании продукт помогает при идентификации антиэритроцитарных антител. Эффективность реагента зависит от соблюдения правил проведения исследований. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть представлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону 800-492-BLUD(2853) или 770-441-2051.

Библиография

1. Francois-Gerard CH, Brocteur J. Description of P1-like antigen present in turtle-dove eggs. Abstract of a poster presented at XV Congress of the international Society of Blood Transfusion, Paris 1978.

CE
0088

Реагенты для определения антигена

эритроцитов

immuclone® Anti-D duo IgM + IgG

immuclone® Anti-CDE IgM + IgG

Для определения антигенов эритроцитов на плоскости, в пробирке, в микропланшете или в непрямом антиглобулиновом тесте

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature Limitation
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение:

immuclone® Anti-D duo IgM + IgG является реагентом для определения антигена D (Rh1) на плоскости, в пробирке, в микропланшете или в непрямом антиглобулиновом тесте.

immuclone® Anti-CDE IgM + IgG является реагентом для определения антигенов C (RH2), D (RH1) и E (RH3) на плоскости, в пробирке, в микропланшете, а также слабых вариантов антигена D (RH1) в непрямом антиглобулиновом тесте.

Общая информация

Работы Levine и Stetson в 1939 году, а также Landsteiner и Weiner в 1940 году заложили основу современного понимания значения определения антигена анти-D. В европеоидной популяции примерно у 15% индивидов антиген D отсутствует.

Индивиды, не имеющие отдельных антигенов системы Rh, могут вырабатывать антитела против этих антигенов при стимуляции, которая происходит при беременности или гемотрансфузии, что может приводить к гемолитической болезни новорожденных или к посттрансфузионным осложнениям.

Система группы крови Rh включает в себя более 40 антигенов и антигенных комплексов на поверхности эритроцитов. Пять наиболее иммуногенных антигенов системы Rh и антитела против них являются наиболее важными объектами претрансфузионного обследования и определения риска возникновения ГБН.

Источники встречаемости Rh антигенов в различных популяциях варьирует и в европеоидной популяции составляет:

Антиген	Частота встречаемости
D (RH1)	85%
C (RH2)	70%
E (RH3)	30%
c (RH4)	80%
e (RH5)	98%

Для описания фенотипов, характеризующихся ослабленной экспрессией антигена D, используется объединяющий термин "D^u". Термином "D^{weak}" определяют эритроциты с пониженным количеством антигенных детерминант. Под термином "D^{PARTIAL}" понимают варианты антигена с утраченными эпитопами. Наибольшее количество эпитопов утрачено у вариантной форма антигена, называемой D^{VI}. Настоящие реагенты взаимодействуют с образцами D^{PARTIAL}, включая вариант антигена D^{VI} в непрямом антиглобулиновом тесте (в соответствии с рекомендациями руководств UKBTS и BCSH). Реагенты пригодны для использования при проведении исследований у пациентов и доноров.

Компонент реагентов IgM Anti-D (выделенный из клеточной линии TH28 для реагента Anti-D duo и из линии MS201 для реагента Anti-CDE) способен вызывать прямую агглютинацию D-положительных эритроцитов и большинства эритроцитов, имеющих слабый или вариантный антиген D, но этот компонент не взаимодействует с вариантом D^{VI}. Моноклональный компонент IgG (выделенный из клеточной линии MS26) взаимодействует также с наиболее слабыми формами антигена D, включая вариант D^{VI}, в непрямом антиглобулиновом тесте.

Принцип

Реагент immuclone® Anti-D duo вызывает агглютинацию эритроцитов, имеющих антиген D (RH1). Отсутствие агглютинации в тесте говорит об отсутствии антигена D на исследуемых эритроцитах.

Реагент immuclone® Anti-CDE вызывает агглютинацию эритроцитов, имеющих антигены C, D и E в тестах прямой агглютинации, а также антигена D в непрямом антиглобулиновом тесте (для слабых форм антигена).

Реагенты

Реагент immuclone® Anti-D duo содержит антитела, выделенные из клеточных линий TH28 (IgM) и MS26 (IgG).

Реагент immuclone® Anti-CDE содержит антитела, выделенные из клеточных линий MS24 (IgM Anti-C), MS201, (IgM Anti-D), MS80 (IgM Anti-E) и MS26 (IgG Anti-D).

Человеческие моноклональные антитела IgM и IgG содержатся в растворе, который включает в себя хлорид натрия, БСА, буфер и макромолекулярные соединения для повышения активности реагента. БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (губчатого энцефалита). В качестве консерванта используется азид натрия (в конечной концентрации 0,1%).

Данные реагенты предназначены для использования без дополнительного разведения.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn). Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагентов не допускать их контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагентов на протяжении их срока годности. Помутнение реагентов может означать их контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты с явлениями преципитации либо инородными включениями во флаконах. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагенты из немаркированных флаконов.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Все материалы, использованные для производства реагентов, тестировались на отсутствие инфекций HIV, HCV, HBs, EBV и вируса MAP (вирус продукции антител мышей). Тем не менее, ни один из существующих в настоящее время тестов не дает полной гарантии инфекционной безопасности.

Внимание:

Не раскапывать реагенты при помощи рта.

Упаковка реагентов включает сухую резиновую грушу.

Не использовать реагенты после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венопункции.

Для мануальных методик можно брать кровь в пробирки, содержащие гепарин, ЭДТА, АСД, СРД, СРДА-1, СРД2 или в сухие пробирки без антикоагулянта.

Для автоматических или полуавтоматических методик может потребоваться кровь, заготовленная на антикоагулянте. Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней; образцы, взятые в сухие пробирки – до 21 дня. Образцы, взятые на гепарин, ACD, CPD, CPDA-1, CP2D могут быть исследованы в сроки, указанные для соответствующих антикоагулянтов.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагенты immuclone® Anti-D duo IgM + IgG и immuclone® Anti-CDE IgM + IgG во флаконах, готовые для использования (с пипеткой для мануальных методик).

Дополнительные материалы

для всех мануальных методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Метод исследования в пробирках

1. Пипетки
2. Пробирки 10x75мм или 12x75мм, штатив для пробирок
3. Центрифуга
4. Таймер

Метод определения слабого варианта антигена D

1. Пипетки
2. Пробирки 10x75мм или 12x75мм, штатив для пробирок
3. Центрифуга*
4. Таймер
5. Инкубатор 37°C
6. Антиглобулиновый реагент*
7. Эритроциты, сенсibilизированные IgG (для контроля теста Кумбса)*

Метод исследования на микропланшетах (мануальный)

1. Пипетки или распыляющие системы* (например, ABS PreciS, Hamilton Microlab AT, Packard Multiprobe 104/204)
2. Микропланшеты*
3. Микропланшетная центрифуга* (например, Sorvall T6000, IEC Centra-8, Jouan C422, Hettich 30F, Heraeus Labofuge 400)
4. Механический микропланшетный шейкер* (например, Titramax 3101)
5. Микропланшетный ридер* (например, I-STAR)

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Метод исследования на плоскости

1. Стеклоянная или пластиковая планшета
2. Маркер
3. Аппликаторные палочки (для стеклянной поверхности)
4. Таймер
5. Пипетки

* Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Проведение исследования

А. Метод исследования в пробирках

1. Промаркировать по одной пробирке для каждого используемого в исследовании реагента
2. Внести по 1 капле (примерно 50мкл) реагентов в соответствующие пробирки
3. Добавить по 1 капле (примерно 50мкл) 2-4% суспензии исследуемых эритроцитов, разведенных в физиологическом растворе. (Перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть). Содержимое пробирок перемешать, затем центрифугировать.*
4. Осторожно встряхнуть пробирки, чтобы ресуспендировать осадок. Оценить наличие агглютинации.
5. Фиксировать результаты исследования.

* Рекомендуемый режим центрифугирования: 15-30 секунд при 900-1000G или режим, рекомендованный для данной центрифуги, обеспечивающий наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющий возможность легкого ресуспендирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для усиления реакции при определении некоторых редких фенотипов может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5-60 минут при температуре 18-30°C.

В. Непрямой антиглобулиновый тест для выявления слабых вариантов антигена D

1. Приготовить 3-5% суспензию исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе. Перед приготовлением суспензии эритроциты должны быть отмыты как минимум однократно.
2. Внести 1 каплю (примерно 50мкл) реагента в предварительно промаркированную пробирку.
3. Добавить 1 каплю (примерно 50мкл) суспензии исследуемых эритроцитов.
4. Перемешать и инкубировать 15 минут при 37°C.
5. Отмыть эритроциты физиологическим раствором 1 раз, тщательно удалить супернатант. Поскольку данные реагенты имеют низкое содержание протеина, однократного отмыкания достаточно. Однако, 3-4-х кратное отмывание, как при проведении традиционного антиглобулинового теста, не является ошибкой.
6. Добавить две капли антиглобулинового реагента, осторожно перемешать и центрифугировать в течение 20 секунд при 900-1000G.
7. Осторожно встряхнуть пробирку. Оценить наличие агглютинации макроскопически.
8. Для контроля отрицательного результата необходимо проводить параллельное исследование с эритроцитами сенсibilизированными IgG (клетки для контроля теста Кумбса). Если в контрольном исследовании получен также отрицательный результат, исследование считать недостоверным.
9. Фиксировать результаты.

С. Метод исследования на микропланшетах

1. Промаркировать микропланшеты.
2. Внести по 1 капле реагента (примерно 50мкл) в соответствующие промаркированные лунки микропланшет.
3. Приготовить 2-4% суспензию исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе (перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть).
4. Добавить по 1 капле суспензии исследуемых эритроцитов (примерно 50мкл) в каждую лунку микропланшет.
5. Тщательно перемешать реакционную смесь либо покачивая микропланшеты вручную, либо используя шейкер.*
6. Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, обеспечивающем оптимальную реакцию.**
7. Встряхнуть микропланшеты для ресуспендирования неагглютинированных эритроцитов вручную, либо с помощью

микропланшетного встряхивателя. Оценить агглютинацию в каждой лунке. Для этой цели может быть также использовано зеркало или микропланшетный ридер.

8. Фиксировать результаты.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых редких фенотипов антигенов может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5–60 минут при температуре 18–30°C.

* Предполагаемое время работы для механического шейкера:
1) Перемешивание: 10–30 секунд при работе прибора на средней мощности.
2) Ресуспензирование: 10–30 секунд при работе прибора на средней мощности или время и скорость, рекомендованное для данного прибора производителем. Режим должен обеспечивать полное ресуспензирование, но не разрушать агглютинаты эритроцитов.

** Центрифугировать микропланшеты при 100–250G в течение 40–60 секунд или в другом режиме, рекомендованном для данной центрифуги, обеспечивающем наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющем возможность легкого ресуспензирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспензировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

D. Метод исследования на плоскости

1. Промаркировать планшеты, на которых будет проводиться исследование
2. Поместить на отдельные планшеты по одной капле (примерно 50 мкл) реагента. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.
3. Добавить по одной капле исследуемой цельной крови (или 35–45% суспензии эритроцитов в физиологическом растворе или совместимой сыворотке или плазме) к каждому реагенту.
4. Отдельными палочками перемешать реагенты и образцы крови с тем, чтобы получились овальные капли примерно 20x40 мм. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя.
5. Наблюдать появление макроскопически регистрируемой агглютинации. На стеклянной поверхности при медленной ротации агглютинация появляется в течение 2 минут. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.
6. Фиксировать результаты.

Стабильность реакции

В результате должны фиксироваться тотчас после окончания исследования. В дальнейшем может иметь место диссоциация комплексов антиген-антитело, что приведет к получению ложноотрицательных (или, как минимум, ложных «слабых») результатов. Результаты исследования на плоскости также должны оцениваться незамедлительно во избежание высыхания планшет и ошибочной интерпретации таких результатов, как положительных. Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после встряхивания планшеты после центрифугирования. В противном случае возможна ошибочная интерпретация результатов как вследствие диссоциации агглютинатов, так и вследствие повторного оседания эритроцитов.

Контроль качества

Для контроля активности реагентов immuclone® Anti-D duo и immuclone® Anti-CDE рекомендуется ежедневно проверять активность реагентов с антиген-положительными и антиген-отрицательными эритроцитами, например, Immucor corQC Extend. Если реагенты удовлетворительно реагируют с антиген-положительными эритроцитами и не реагируют с антиген-отрицательными, они считаются пригодными для работы.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Интерпретация результатов

Положительная реакция (антиген выявлен): агглютинация есть

Отрицательная реакция (антиген отсутствует): агглютинации нет

Ограничения

Реагент immuclone® Anti-CDE не взаимодействует с эритроцитами, имеющими фенотип i^a .

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов. Многие человеческие моноклональные IgM против антигенов системы Rh имеют также холодовую анти-I/i активность, особенно с образцами пуповинной крови или эритроцитами, обработанными протеолитическими ферментами. Эта активность может проявляться, если исследование проводится при температуре, ниже рекомендованной.

Эритроциты, положительные в прямом антиглобулиновом тесте, могут давать ложноположительные результаты. Для исключения подобных ошибок рекомендуется использовать реагент immuClone® Rh-Hr Control.

Недостаточное или избыточное центрифугирование могут также приводить к ложноотрицательным и ложноположительным результатам.

При использовании микропланшетного метода новые, не бывшие в употреблении пластиковые планшеты могут пассивно сорбировать на свою поверхность клетки и сывороточные белки. Эта неспецифическая абсорбция может приводить к искажению результатов.⁴ Каждая получаемая партия микропланшетов должна валидироваться пользователем на предмет пригодности для использования. При необходимости микропланшеты можно обрабатывать до использования для предотвращения неспецифической абсорбции. В качестве блокирующих реагентов могут применяться БСА (1–2%) или 1% желатин. Раствор следует инкубировать в лунках в течение 10 минут при 18–30°C, затем промыть лунки дистиллированной или деионизированной водой. После промывания максимально удалить воду из лунок и дать микропланшетам полностью высохнуть перед использованием.

Несоблюдение настоящих правил может приводить к снижению активности реагентов. Исследование на плоскости может быть недостаточно чувствительным для достоверного определения антигенов со сниженной экспрессией. Модификации, вносимые пользователем в методики, требуют дополнительной валидации.

Характеристики реагентов

Реагенты immuclone® Anti-D duo и immuclone® Anti-CDE отвечают требованиям, изложенным в Технической Спецификации для реагентов, содержащейся в Приложении II, Лист А директивы 98/79EC касающейся изделий для диагностики *in vitro*. Данные реагенты имеют характеристики эквивалентные или лучшие, чем необходимо в соответствии с указанной директивой.

Перед выпуском в продажу каждый лот реагентов immuclone® Anti-D duo и immuclone® Anti-CDE проходит контроль качества с панелью антиген-положительных и антиген-отрицательных стандартных эритроцитов для подтверждения активности. Кроме того, тестирование реагентов производится на аппарате Galileo. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Guidelines for Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 5th Edition 2001. The Stationary Box
2. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1975:178
3. Issitt P.D and Anstee D.J. Applied Blood Group Serology 4th Edition, Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1998
4. Crawford MN, Gottman FE, Gottman CA. Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion 1970;10:258
5. Brecher ME, ed. Technical manual. 14th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002

REF	Описание
0006196; 0006199	immuclone® Anti-D duo IgM + IgG
0066009; 0066086	immuclone® Anti-D duo Galileo IgM+IgG
0006820; 0006821	immuclone® Anti-CDE IgM + IgG

0066010

immuclone® Anti-CDE Galileo IgM + IgG

CE

0088

Реагент immuClone® Rh-Hr Control

Отрицательный контроль для исследований на плоскости, в пробирке или микропланшете

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  $2-8^{\circ}\text{C}$ Temperature Limitation
-  Discard if markedly turbid
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide



Назначение: реагент immuClone® Rh-Hr Control предназначен для проведения параллельных исследований в качестве отрицательного контроля при определении групп крови реагентами immuClone® IgM с целью выявления ложноположительных результатов, которые могут иметь место вследствие наличия аутоантител, положительного прямого антиглобулинового теста или патологии сывороточных протеинов. Реагент предназначен для проведения исследований на плоскости, в пробирке или на микропланшете.

Общая информация

Моноклональные реагенты IgM содержат протеины в более низкой концентрации (<12%), чем традиционные поликлональные реагенты, поэтому для них нецелесообразно в качестве контроля растворы с высоким содержанием протеинов. Реагент immuClone® Rh-Hr Control имеет состав, адекватный для контроля таких моноклональных реагентов.

Принцип

Реагент immuClone® Rh-Hr Control не содержит каких-либо антител. Исследование эритроцитов пациента проводится параллельно с реагентом immuClone® Rh-Hr Control и с моноклональными антителами для определения групп крови. Если тест с реагентом immuClone® Rh-Hr Control положителен, все результаты определения группы крови, полученные с данными эритроцитами, считаются недостоверными.

Эритроциты, на поверхности которых фиксированы антитела или другие протеины, могут агглютинироваться в присутствии каких-либо химических индукторов агглютинации. Использование реагента immuClone® Rh-Hr Control позволяет выявить ложноположительные результаты, получаемые с моноклональными реагентами для определения групп крови immuClone® и NOVACLONE™.

Реагент

Реагент представляет собой композицию буферного раствора и макромолекулярных потенциальных индукторов агглютинации. Реагент содержит бычий сывороточный альбумин и 0,1% азид натрия. БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (патогенов энцефалита).

Данный реагент предназначен для использования без дополнительного разведения и добавок.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидов натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагентов не допускать их контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагентов на протяжении их срока годности. Помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагенты из немаркированных флаконов.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

Внимание:

Не раскапывать реагенты при помощи рта. Существующие в настоящее время методы исследования не могут полностью гарантировать отсутствие в продуктах инфекционных агентов.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Не использовать реагент после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венопункции.

Для мануальных методик можно брать кровь в пробирки, содержащие гепарин, ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D или в сухие пробирки без антикоагулянта.

Для автоматических или полуавтоматических методик может потребоваться кровь, заготовленная на антикоагулянте. Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней; образцы, взятые в сухие пробирки – до 21 дня. Образцы, взятые на гепарин, ACD, CPD, CPD-A, CP2D могут быть исследованы в сроки, указанные для соответствующих антикоагулянтов.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент immuClone® Rh-Hr Control во флаконах, готовый для использования (с пипеткой для мануальных методик).

Дополнительные материалы

Для всех мануальных методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Метод исследования в пробирках

1. Пипетки
2. Пробирки 10x75мм или 12x75мм, штатив для пробирок
3. Центрифуга
4. Таймер

Метод исследования на микропланшетах (мануальный)

1. Пипетки или раскапывающие системы (например, ABS Precis, Hamilton Microlab AT, Packard Multiprobe 104/204)
2. Микропланшеты
3. Микропланшетная центрифуга (например, Sorvall T6000, IEC Centra-8, Jouan C422, Hettich 30F, Heraeus Labofuge 400)
4. Механический микропланшетный шейкер (например, Titramax 3101)
5. Микропланшетный ридер (например, I-STAR)

для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Метод исследования на плоскости

1. Стеклопластиковая планшета
2. Маркер
3. Аппликаторные палочки (для стеклнной поверхности)
4. Таймер
5. Пипетки

Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Проведение исследования

А. Метод исследования в пробирках

1. Промаркировать по одной пробирке для каждого используемого в исследовании реагента
2. Внести по 1 капле (примерно 50мкл) реагента в соответствующие пробирки
3. Добавить по 1 капле (примерно 50мкл) 2-5% суспензии исследуемых эритроцитов, разведенных в физиологическом растворе, плазме или сыворотке. (Перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть). Содержимое пробирок перемешать, затем центрифугировать.*
4. Осторожно встряхнуть пробирки, чтобы ресуспендировать осадок. Оценить наличие агглютинации.
5. Фиксировать результаты исследования.

* Рекомендуемый режим центрифугирования: 15-30 секунд при 900-1000G или режим, рекомендованный для данной центрифуги, обеспечивающий наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющий возможность легкого ресуспендирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых подгрупп антигенов А и В может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5-60 минут при температуре 18-30°C.

В. Метод исследования на микропланшетах

1. Промаркировать микропланшеты
2. Внести по 1 капле реагентов (примерно 50мкл) в соответствующие промаркированные лунки микропланшет
3. Приготовить 2-5% суспензию исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе (перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть). Для переноса эритроцитов из пробирки с образцом в лунки микропланшеты можно также использовать аппликаторные палочки. (ПРИМЕЧАНИЕ: Необходимая скорость центрифугирования и интенсивность последующего встряхивания может существенно различаться для эритроцитов, суспензированных в физиологическом растворе и эритроцитов, суспензированных в сыворотке или плазме)
4. Добавить по 1 капле суспензии исследуемых эритроцитов (примерно 50мкл) в каждую лунку микропланшет
5. Тщательно перемешать реакционную смесь либо покачивая микропланшеты вручную, либо используя шейкер.*
6. Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, обеспечивающем оптимальную реакцию.**
7. Встряхнуть микропланшеты для ресуспендирования неагглютинированных эритроцитов вручную, либо с помощью микропланшетного встряхивателя. Оценить агглютинацию в каждой лунке. Для этой цели может быть также использовано зеркало или микропланшетный ридер.
8. Фиксировать результаты.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых подгрупп антигенов А и В может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5-60 минут при температуре 18-30°C.

* Предполагаемое время работы для механического шейкера: 1) Перемешивание: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности. 2) Ресуспендирование: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности или время и скорость, рекомендованное для данного прибора производителем. Режим должен обеспечивать полное ресуспендирование, но не разрушать агглютинаты эритроцитов.

** Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, рекомендованном для данной центрифуги, обеспечивающем наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющем возможность легкого ресуспендирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

С. Метод исследования на плоскости

1. Промаркировать планшеты, на которых будет проводиться исследование
2. Поместить на отдельные планшеты по одной капле (примерно 50мкл) реагентов. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.
3. Добавить по одной капле исследуемой цельной крови (или 35-45% суспензии эритроцитов в физиологическом растворе или совместимой сыворотке или плазме) к каждому реагенту при помощи пипетки или аппликаторной палочки.
4. Отдельными палочками перемешать реагенты и образцы крови с тем, чтобы получились овальные капли примерно 20x40 мм. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя.
5. Наблюдать появление макроскопически регистрируемой агглютинации. На стеклнной поверхности при медленной ротации агглютинация появляется максимум в течение 2 минут. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.
6. Фиксировать результаты.

Стабильность реакции

Все результаты должны фиксироваться тотчас после окончания исследования. В дальнейшем может иметь место диссоциация комплексов антиген-антитело, что приведет к получению ложноотрицательных (или, как минимум, ложных «слабых») результатов. Результаты исследования на плоскости также должны оцениваться незамедлительно во избежание высыхания планшет и ошибочной интерпретации таких результатов, как положительных. Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после встряхивания планшеты после центрифугирования. В противном случае возможна ошибочная интерпретация результатов как вследствие диссоциации агглютинатов, так и вследствие повторного оседания эритроцитов.

Контроль качества

Для контроля активности реагента immuClone® Rh-Hr Control рекомендуется использовать его ежедневно.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: агглютинация эритроцитов

Отрицательная реакция: агглютинация эритроцитов отсутствует

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов,

неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов. Недостаточное или избыточное центрифугирование могут также приводить к ложноотрицательным и ложноположительным результатам.

При использовании микропланшетного метода: новые, не бывшие в употреблении пластиковые планшеты могут пассивно сорбировать на свою поверхность клетки и сывороточные протеины. Эта неспецифическая абсорбция может приводить к искажению результатов.⁵ Каждая получаемая партия микропланшет должна валидироваться пользователем на предмет пригодности для использования. При необходимости микропланшеты можно обрабатывать до использования для предотвращения неспецифической абсорбции. В качестве блокирующих реагентов могут применяться БСА (1-2%) или 1% желатин. Раствор следует инкубировать в лунках в течение 10 минут при 18-30°C, затем промыть лунки дистиллированной или деионизированной водой. После промывания максимально удалить воду из лунок и дать микропланшетам полностью высохнуть перед использованием.

Несоблюдение настоящих правил может приводить к снижению активности реагентов. Исследование на плоскости может быть недостаточно чувствительным для достоверного определения антигенов со сниженной экспрессией. Модификации, вносимые пользователем в методики, требуют дополнительной валидации.

Характеристики реагентов

Реагент immuClone® Rh-Hr Control отвечают требованиям, изложенным в Технической Спецификации для реагентов, содержащейся в Приложении II, Лист А директивы 98/79EC, касающейся изделий для диагностики *in vitro*. Данный реагент имеет характеристики эквивалентные или лучшие, необходимо в соответствии с указанной директивой.

Перед выпуском в продажу все партии реагента проверяются во всех методиках на приборе Galileo. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
2. Guidelines for Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 5-th Edition 2001. The Stationary Box
3. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6-th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1975:178
4. Issitt P.D and Anstee D.J. Applied Blood Group Serology 4-th Edition, Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1998
5. Crawford MN, Gottman FE, Gottman CA, Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion 1970;10:258

REF	Описание
0006720; 0006721	immuClone® Rh-Hr Control
0006706; 00066083	immuClone® Rh-Hr Control Galileo

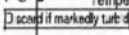


Анти-A1 Лектин Анти-H Лектин

Для исследований на плоскости и в пробирке

Анти-A1 Лектин Galileo

Для исследований в микропластиках в автоматических приборах

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature Limitation
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide
-  Discard if markedly turbid



Назначение

Реагент Иммукор Анти-A1 Лектин предназначен для определения антигенов эритроцитов A1.

Реагент Иммукор Анти-H Лектин предназначен для определения субстанции H на эритроцитах.

Эти реагенты предназначены для проведения исследований на плоскости или в пробирке.

Реагент Иммукор Анти-A1 Лектин Galileo предназначен для проведения исследований на автоматических приборах Galileo.

Общая информация

Система групп крови ABO имеет 4 антигена: A1, A2, B и H (антиген группы O).

Известно 6 фенотипов:

O, A1, A2, B, A1B, A2B. Реагент Иммукор Анти-A1 взаимодействует с эритроцитами A1 и A1B, вызывая их агглютинацию.

Кроме эритроцитов группы O, субстанция H в большом количестве присутствует также на эритроцитах A2 и A2B и может быть обнаружена в незначительных количествах при генотипе A1O и BO. Реагент Иммукор Анти-H Лектин взаимодействует с эритроцитами A2 и A2B, вызывая их агглютинацию.

Принцип

При соблюдении правил проведения исследования наличие агглютинации с реагентом Анти-A1 или Анти-H означает наличие соответствующего антигена. Отсутствие агглютинации обычно означает отсутствие компонентов комплемента или иммуноглобулинов (см. Ограничения).

Реагент

Реагент Иммукор Анти-A1 Лектин представляет собой фитагглютинин, полученный из *Dolichos biflorus*. Реагент Иммукор Анти-H представляет собой фитагглютинин, полученный из *Laburnum alpinum*.

В качестве консерванта реагенты содержат азид натрия 0,1%.

Реагенты предназначены для использования без дополнительного разведения или добавок.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики *in vitro*.

Некоторые лектины и азид натрия классифицируются как вещества, опасные при проглатывании.

Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия.

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылился в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидата натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагентов не допускать их контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагентов на

протяжении их срока годности. Легкое помутнение не влияет на активность реагента, но значительное помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагенты из немаркированных флаконов.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

Внимание:

Не раскапывать реагенты при помощи рта. Существующие в настоящее время методы исследования не могут полностью гарантировать отсутствие в продуктах инфекционных агентов.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Не использовать реагент после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венопункции.

Кровь можно брать в пробирки, содержащие антикоагулянт, а также в сухие пробирки. Исследование следует производить как можно скорее после забора образца во избежание ложноположительных или ложноотрицательных реакций вследствие контаминации или неадекватных условий хранения. Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем. Такие образцы могут давать ложноположительные результаты.

Образцы, взятые на гепарин, должны быть исследованы в течение 2 дней. Образцы, взятые на ЭДТА, ACD, CPD, CPD-1 или CPD-2 могут исследоваться в течение 14 дней или в течение срока годности антикоагулянта (если он заканчивается раньше).

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент Анти-A1 Лектин или Анти-H Лектин во флаконах, готовый для использования.

Дополнительные материалы

Для всех методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Для метода исследования в пробирках

1. Пипетки
2. Тестовые пробирки 10x75 мм или 12x75мм в штативе
3. Серологическая центрифуга
4. Таймер

Для метода исследования на плоскости

1. Предметные стекла или пластиковые слайды
2. Маркер (опционально)
3. Аппликаторные палочки
4. Таймер
5. Пипетки

Для автоматического метода

Для проведения исследований на автоматических приборах см. соответствующие инструкции для оператора.

Ответственность за валидацию дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Методика исследования

А. Исследование в пробирках

1. Промаркировать необходимое количество пробирок
2. Приготовить 2-3% суспензию исследуемых эритроцитов в изотоническом растворе (эритроциты должны быть отмыты минимум один раз).
3. Внести 1-2 капли реагента Анти-A1 или Анти-H в соответствующие промаркированные пробирки.
4. Добавить по 1 капле суспензии эритроцитов в каждую пробирку.
5. Хорошо перемешать, осторожно покачивая пробирку.
6. Инкубировать пробирки 1 минуту при комнатной температуре.

7. Центрифугировать в течение 1 минуты при 1.500 об/мин (примерно 400 G).*

8. Осторожно ресуспензировать осадок эритроцитов и оценить наличие агглютинации.

9. Анти-Н очень чувствительны к температуре. Если имеет место слабоположительная реакция, следует провести исследование, проинкубировав пробирку 5 минут при 2-8°C и затем повторить пункты 7 и 8.

* Режим центрифугирования должен обеспечивать чистый супернатант и возможность легкого ресуспензирования несвязанных эритроцитов.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

В. Исследование на плоскости

1. Промаркировать необходимое количество предметных стекол.

2. Поместить по 1 капле каждого реагента на отдельные чистые предметные стекла. Не помещайте слайды на поверхность с подсветкой.

3. С помощью пипетки или аппликаторной палочки добавить на стекла по 1 капле цельной крови (или 10% суспензии эритроцитов в изотоническом растворе).

4. Перемешать реагенты и образцы крови при помощи аппликаторной палочки в виде овала 20x40мм (на предметном стекле). Если исследование проводится на пластиковом слайде, следовать инструкции производителя.

5. Наблюдать макроскопическую агглютинацию при помощи медленной ротации предметного стекла в течение 2 минут. При осмотре не принимать участки подсыхания капли на периферии и фибрин за агглютинацию.

6. Фиксировать результаты.

Примечание: Слабые реакции следует перепроверить тестом в пробирке.

С. Автоматический метод исследования

Методику проведения исследования в микропланшетах на автоматическом оборудовании см. соответствии инструкции для оператора.

Стабильность реакции

Результаты исследования должны оцениваться тотчас после центрифугирования. В дальнейшем может иметь место диссоциация комплексов антиген-антитело, приводящая к ложной интерпретации результатов, как слабоположительных или отрицательных.

Тест на плоскости должен быть интерпретирован немедленно по исполнению во избежание высыхания капли и ошибочной интерпретации отрицательного результата, как положительного.

Контроль качества

Рекомендуется в каждую серию исследований включать положительный и отрицательный контроль с антиген-положительными и антиген-отрицательными эритроцитами. Реагент имеет удовлетворительную активность, если дает агглютинацию антиген-положительных эритроцитов и не дает агглютинации антиген-отрицательных эритроцитов.

Результаты

Положительная реакция: При учете соответствующих ограничений наличие агглютинации эритроцитов реагентами Анти-A1 и Анти-Н означает наличие соответствующих антигенов.

Отрицательная реакция: При учете соответствующих ограничений отсутствие агглютинации означает отсутствие соответствующих антигенов.

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов. Недостаточное или избыточное центрифугирование может привести к получению ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Реагент Иммукор Анти-Н Лектин может слабо реагировать с эритроцитами, имеющими фенотип A1O и BO.

Реагент Иммукор Анти-A1 Лектин может давать слабые неспецифические реакции с эритроцитами A2. При концентрации 400 µg/ml и выше реагент Иммукор Анти-A1 Лектин может агглютинировать эритроциты A2 так же как и A1.

Положительные реакции, полученные с эритроцитами, хранившимися некоторое время после заготовки, могут быть слабее, чем со свежезаготовленными.

Эритроциты, прошедшие обработку протеолитическими ферментами, могут давать неспецифические реакции.

Для проведения исследований на автоматическом оборудовании реагенты, возможно, потребуют разведения. Ответственность за валидацию метода в этом случае лежит на пользователе.

Антигены на мембране эритроцитов новорожденных могут не давать ожидаемых реакций.

Характеристики реагентов

Перед выпуском в продажу все партии реагента проверяются с панелью антиген-положительных эритроцитов. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Issitt PD, Anstee DJ. Applied Blood Group Serology. 4-th edition. Montgomery Scientific. Durham SC. 1998
2. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine 6-th edition. Blackwell Science. Oxford. 1979
3. Bregger ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
4. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man. 6-th Edition, Blackwell Scientific, Oxford. 1975.



Reagent Automated immunoClone® Anti-K IgM

Для автоматизированного определения антигена К (Kell) на микропланшетах

• IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

• Storage Temperature Limitation

• Do not store if markedly turbid



Consult Instructions for Use



Harmful, Preservative: 0.1%

Sodium Azide



Назначение: Automated immunoClone® Anti-K (Kell) IgM является реагентом для определения антигена К (Kell) на эритроцитах человека. Реагент предназначен только для автоматизированного исследования на микропланшетах.

Общая информация

Со времени открытия Coombs антигена К (KEL1 или Kell) в 1946 году и антигена к (KEL2 или Челлано, Levine, 1949) количество описанных антигенов этой системы дошло до 22. Антитела анти-К (Anti-K1) и анти-к (Anti-K2) могут вызывать тяжелые посттрансфузионные реакции и гемолитическую болезнь новорожденных.

Частота встречаемости антигенов К и к в популяциях:

	Европеоидная	Негроидная
K (KEL1)	9,0%	3,5%
k (KEL2)	99,8%	>99,9%

Принцип

Реагент предназначен для проведения исследований, основанных на гематоглобулине. Если на исследуемых эритроцитах присутствует антиген К, то при их инкубации с реагентом Automated immunoClone® Anti-K (Kell) IgM происходит агглютинация. Визуально агглютинация может наблюдаться после центрифугирования. Отсутствие агглютинации означает отсутствие антигена К (с учетом соответствующих ограничений).

Реагент

Реагент Automated immunoClone® Anti-K (Kell) IgM изготавливается из человеческих моноклональных антител IgM (клон K1.1.21HM.EF). Реагент предназначен для проведения качественных исследований на микропланшетах с применением автоматического оборудования для определения антигена К на эритроцитах человека. Раствор, в котором содержатся антитела, включает в себя БСА и макромолекулярные вещества для повышения активности реагента. БСА произведен из животных, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой на предмет отсутствия губчатого энцефалита. Материал человеческого происхождения, использованный при производстве реагента, исследован на HBsAg, HIV и HCV. В качестве консерванта используется азид натрия (в концентрации 0,1%).

Данный реагент предназначен для использования без дополнительного разведения.

Предупреждения

Реагент предназначен только для профессионального применения, диагностики in vitro.

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылился в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азидов натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагента не допускать его контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагента на протяжении его срока годности. Помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированный

реагент. Не использовать реагент с явлениями преципитации либо инородными включениями во флаконах. Не использовать реагент из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагент из немаркированных флаконов.

С реагентом следует обращаться с осторожностью и утилизировать, как с потенциально инфицированным материалом.

Внимание:

Со всеми продуктами крови необходимо обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Не использовать реагент после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Материалы, использованные в производстве, тестируются на предмет HBsAg, HIV и HCV. Однако ни один из имеющихся в настоящее время тестов не может гарантировать полную инфекционную безопасность.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венопункции.

Для автоматических методик может потребоваться кровь, заготовленная на антикоагулянте. Для проведения автоматизированного исследования с микропланшетами см. инструкции к соответствующим приборам.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Образцы, не предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагент Automated immunoClone® Anti-K (Kell) IgM во флаконах, готовый для использования.

Дополнительные материалы

- Образец крови донора или пациента

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Проведение исследования

- Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Контроль качества

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Интерпретация результатов

Положительная реакция:

С учетом возможных ограничений (см.) считается, что появление агглютинации означает наличие антигена Kell (KEL1) на исследуемых эритроцитах.

Отрицательная реакция:

Если реакция исследуемых эритроцитов с реагентом агглютинации считается, что антиген Kell (KEL1) на этих эритроцитах отсутствует (с учетом возможных ограничений – см.)

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов.

Положительные реакции с образцами, которые до проведения исследования некоторое время хранились, может быть слабее, чем со свежими образцами.

Не рекомендуется использовать для исследования эритроциты, обработанные протеолитическими ферментами, поскольку это повышает риск неспецифической агглютинации.

Не использовать для исследования эритроциты, положительные в прямом антиглобулиновом тесте.

Не использовать для исследования гемолизированные образцы.

Некоторые фенотипы могут давать более слабые реакции в силу более низкой экспрессии антигенов.

Существует редкая форма антигена K, описанная как KEL2, и являющаяся мутантной аллелью. Эта форма может давать переменные реакции с различными анти-K реagentами. Стабильность взаимодействия с эритроцитами этого типа не гарантируется.

При интерпретации результатов следует иметь в виду трансфузионный анамнез, а также наличие трансплантаций. Следует также принимать во внимание лекарственные препараты, которые принимает пациент.

При использовании микропланшетного метода новые, не бывшие в употреблении, пластиковые планшеты могут пассивно сорбировать на свою поверхность клетки и сывороточные протеины. Эта неспецифическая абсорбция может приводить к искажению результатов.⁴ Каждая получаемая партия микропланшет должна валидироваться пользователем на предмет пригодности для использования. При необходимости микропланшеты можно обрабатывать до использования для предотвращения неспецифической абсорбции. В качестве блокирующих reagentов могут применяться БСА (1-2%) или 1% желатин. Раствор следует инкубировать в лунках в течение 10 минут при 18-30°C, затем промыть лунки дистиллированной или деионизированной водой до 10 раз. После промывания максимально удалить воду из лунок и дать микропланшетам полностью высохнуть перед использованием.

Несоблюдение настоящих правил может приводить к снижению активности reagentов. Исследование на плоскости может быть недостаточно чувствительным для достоверного определения антигенов со сниженной экспрессией. Модификации, вносимые пользователем в методики, требуют дополнительной валидации.

Характеристики reagentов

Результаты, полученные при изучении активности reagenta Automated immunoClone® Anti-K (Kell) IgM показали, что данный reagent позволяет безопасно и эффективно определять антиген K.

Метод определения	Automated immunoClone® Anti-K (Kell)			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Определение в микропланшете агглютинированно	31	100%	87	100%

Тестирование reagentов проводилось в параллели с лучшими существующими на сегодняшний день reagentами и результаты исследования в 100% случаев совпадали.

Определение взято из Common Technical Specification (CTS).

Диагностическая Чувствительность: Вероятность, с которой тест дает положительный результат при исследовании образца, содержащего объект поиска.

Диагностическая Специфичность: Вероятность, с которой тест дает отрицательный результат при исследовании образца, не содержащего объекта поиска.

Перед выпуском в продажу каждый лот reagenta Automated immunoClone® Anti-K (Kell) IgM проходит контроль качества для подтверждения активности. Активность продукта соотносится с рекомендованными методами исследования. В reagentах, изготовленных из продуктов крови, могут встречаться антитела против редко встречающихся антигенов, которые могут быть причиной ложноположительных реакций. Не всегда возможно убедиться в отсутствии подобных антител, поскольку не всегда возможно иметь эритроциты, несущие эти антигены. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве reagentов или

при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Coombs, R.R.A, Mourant A.E, Race R.R. Lancet, 1946 :264-266
2. Levine P, Backer M, Wigod M, Ponder R. A new human hereditary blood property (Cellano) present in 99,8% of all bloods. Science 1949;109:464
3. Brecher ME, ed. Technical manual, 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
4. Crawford MN, Gottman FE, Gottman CA. Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion 1970;10:258

REF	Описание
0066088	Automated immunoClone® Anti-K (Kell) Galileo IgM



Реагенты для определения антигенов

эритроцитов

immuClone® Anti-D rapid IgM

immuClone® (1) Anti-C IgM, immuClone® (2) Anti-C IgM,
immuClone® (1) Anti-c IgM, immuClone® (2) Anti-c IgM
immuClone® (1) Anti-E IgM immuClone® (2) Anti-E IgM
immuClone® (1) Anti-e IgM immuClone® (2) Anti-e IgM
immuClone® (1) Anti-K IgM

Для определения антигенов эритроцитов на плоскости, в пробирке или в микропланшете

Назначение: immuClone® Anti-D rapid IgM, immuClone® (1) Anti-C IgM, immuClone® (2) Anti-C IgM, immuClone® (1) Anti-c IgM, immuClone® (2) Anti-c IgM, immuClone® (1) Anti-E IgM, immuClone® (2) Anti-E IgM, immuClone® (1) Anti-e IgM, immuClone® (2) Anti-e IgM и immuClone® (1) Anti-K IgM являются реагентами для определения антигенов эритроцитов C, c, E, e и K на плоскости, в пробирке или в микропланшете.

Общая информация

Индивиды, не имеющие отдельных антигенов системы Rh, могут вырабатывать антитела против этих антигенов при стимуляции, которая происходит при беременности или гемотрансфузии, что может приводить к гемолитической болезни новорожденных или к посттрансфузионным осложнениям.

Система групп крови Rh включает в себя более 40 антигенов и антигенных комплексов на поверхности эритроцитов. Пять наиболее иммуногенных антигенов системы Rh и антитела против них являются наиболее важными факторами предтрансфузионного обследования и определения риска возникновения ГБН.

Частота встречаемости Rh антигенов в различных популяциях варьирует и в европеоидной популяции составляет:

Антиген	Частота встречаемости
D (RH1)	85%
C (RH2)	70%
E (RH3)	30%
c (RH4)	80%
e (RH5)	98%

Ослабленная экспрессия антигена D

Для описания фенотипов, характеризующихся ослабленной экспрессией антигена D используется объединяющий термин "D^u". Термином "D^{WEAK}" определяют эритроциты с пониженным количеством антигенных детерминант. Под термином "D^{PARTIAL}" понимают варианты антигена с утраченными эпитопами. Наибольшее количество эпитопов утрачено у вариантной форма антигена, называемой D^{VI}. Реагент immuClone® Anti-D rapid взаимодействует с большинством образцов D^{WEAK} и D^{PARTIAL}, но не взаимодействует с вариантом антигена D^{VI} (в соответствии с рекомендациями руководств по обследованию пациентов). Реагент рекомендован для использования при проведении исследований у пациентов.

Антиген K (K1 или Келл) был открыт Coombs в 1946 году, антиген k (K2 или Челлано) был открыт в 1949 году Levine. В дальнейшем количество открытых антигенов этой системы достигло 22. Антитела анти-K (анти-K1) и анти-k (анти-K2) могут вызывать тяжелые посттрансфузионные осложнения и ГБН.

Частота встречаемости антигенов K и k варьирует среди популяций следующим образом:

	Европеоиды	Негроиды
K (KEL1)	9,0%	3,5%
k (KEL2)	99,8%	>99,9%

Принцип

Прямая агглютинация исследуемых эритроцитов реагентом означает наличие на эритроцитах соответствующего антигена. Отсутствие агглютинации как правило означает отсутствие соответствующего антигена (см. Ограничения). Заключение о фенотипе эритроцитов (C,c,D,E,e) делается на основании результатов, полученных со всеми использованными реагентами.

Реагенты

Реагент immuClone® Anti-D rapid получен из клеточной линии RUM-1
Реагент immuClone® (1) Anti-C получен из клеточной линии MS-24
Реагент immuClone® (1) Anti-c получен из клеточной линии MS-33

Реагент immuClone® (1) Anti-E получен из клеточных линий MS-80 и MS-258
Реагент immuClone® (1) Anti-e получен из клеточных линий MS-16, MS-21 и MS-63

Реагент immuClone® (2) Anti-C получен из клеточной линии MS-273
Реагент immuClone® (2) Anti-c получен из клеточной линии MS-35
Реагент immuClone® (2) Anti-E получен из клеточных линий MS-12 и MS-260

Реагент immuClone® (2) Anti-e получен из клеточных линий MS-62 и MS-69
Реагент immuClone® (1) Anti-K получен из клеточной линии MS-56

Антитела содержатся в буферном растворе, включающем БСА (без стабилизаторов), ЭДТА, а также макромолекулярные химические реагенты. БСА произведен из животных, разводимых в США, которые были обследованы и сертифицированы Ветеринарной службой США на предмет отсутствия заболеваний. Этот животный продукт имеет низкий риск трансмиссии TSE (губчатого энцефалита). В качестве консерванта используется азид натрия (в конечной концентрации 0,1%). Кроме того, реагент immuClone® (2) Anti-e содержит материал, взятый от свиней.

Данные реагенты предназначены для использования без дополнительного разведения и добавок.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для профессионального применения, диагностики in vitro.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылился в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать и не подвергать воздействию высоких температур.

При помутнении выбрасывать.

Во время использования реагентов не допускать их контаминации. Контаминация отрицательно сказывается на активности реагентов на протяжении их срока годности. Помутнение реагента может означать его контаминацию или разложение. Не использовать контаминированные реагенты. Не использовать реагенты с явлениями преципитации либо инородными включениями во флаконах. Не использовать реагенты из флаконов с нарушенной герметичностью. Не использовать реагенты из немаркированных флаконов.

С реагентами следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом. Все материалы, использованные для производства реагентов, тестировались на отсутствие инфекций HIV, HCV, HBs, EBV и вируса МАР (вирус продукции антител мышей). Тем не менее, ни один из существующих в настоящее время тестов не дает полной гарантии инфекционной безопасности.

Внимание:

Не раскапывать реагенты при помощи рта.

Упаковка реагента включает сухую резиновую грушу.

Не использовать реагент после истечения срока годности. Формат маркировки срока годности: год-месяц-число. Например, 28 мая 2008 года будет промаркировано как 2008-05-28.

Взятие образцов для исследования

Взять образец крови из вены путем стандартной венепункции.

Для мануальных методик можно брать кровь в пробирки, содержащие гепарин, ЭДТА, ACD, CPD, CPD-A, CP2D или в сухие пробирки без антикоагулянта.

Для автоматических или полуавтоматических методик может потребоваться кровь, заготовленная на антикоагулянте. Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, обусловленных неправильными условиями хранения или контаминацией взятых образцов крови, образцы рекомендуется исследовать как можно быстрее после заготовки. Хранение образцов при неправильной температуре (например, более высокой, чем следует), повторное

замораживание и размораживание ведет к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Образцы, предназначенные для исследования в течение ближайших 24 часов после заготовки, должны храниться при температуре 2-8°C. Не использовать образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, в этом случае могут иметь место ложноположительные результаты. Образцы, взятые на ЭДТА, могут исследоваться в течение 10 дней; образцы, взятые в сухие пробирки – до 21 дня. Образцы, взятые на гепарин, ACD, CPD, CPD-A, CP2D могут быть исследованы в сроки, указанные для соответствующих антикоагулянтов.

Процедура исследования

Состав упаковки

Реагенты immuClone® Anti-D rapid, immuClone® (1) Anti-C, immuClone® (2) Anti-C, immuClone® (1) Anti-e, immuClone® (2) Anti-e, immuClone® (1) Anti-E, immuClone® (2) Anti-E, immuClone® (1) Anti-e, immuClone® (2) Anti-e и immuClone® (1) Anti-K во флаконах, готовые для использования (с пипеткой для мануальных методик).

Дополнительные материалы

Для всех мануальных методик

1. Эритроциты донора или пациента
2. Маркеры
3. Изотонический раствор NaCl или изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15mM), pH 6,5 – 7,5

Метод исследования в пробирках

1. Пипетки
2. Пробирки 10x75мм или 12x75мм, штатив для пробирок
3. Центрифуга
4. Таймер

Метод исследования на микропланшетах (мануальный)

1. Пипетки или распыляющие системы (например, ABS Precis, Hamilton Microlab AT, Packard Multiprobe 104/204)
2. Микропланшеты
3. Микропланшетная центрифуга (например, Sorvall T6000, IEC Centra-8, Jouan C422, Hettich 30F, Heraeus Labofuge 400)
4. Механический микропланшетный шейкер (например, Titramax 3101)
5. Микропланшетный ридер (например, I-STAR)

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Метод исследования на плоскости

1. Стеклопластиковая планшета
2. Маркер
3. Аппликаторные палочки (для стеклянной поверхности)
4. Таймер
5. Пипетки

Ответственность за определение пригодности дополнительного оборудования для проведения исследований лежит на пользователе.

Проведение исследования

А. Метод исследования в пробирках

1. Промаркировать по одной пробирке для каждого используемого в исследовании реагента
2. Внести по 1 капле (примерно 50мкл) реагента в соответствующие пробирки
3. Добавить по 1 капле (примерно 50мкл) 2-5% суспензии исследуемых эритроцитов, разведенных в физиологическом растворе. (Перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть). Содержимое пробирок перемешать, затем центрифугировать.*
4. Осторожно встряхнуть пробирки, чтобы ресуспендировать осадок. Оценить наличие агглютинации.
5. Фиксировать результаты исследования.

* Рекомендуемый режим центрифугирования: 15-30 секунд при 900-1000G или режим, рекомендованный для данной центрифуги, обеспечивающий наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющий возможность легкого ресуспендирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая

«пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых редких фенотипов антигенов может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5–60 минут при температуре 18-30°C.

В. Метод исследования на микропланшетах

1. Промаркировать микропланшеты.
2. Внести по 1 капле реагентов (примерно 50мкл) в соответствующие промаркированные лунки микропланшет.
3. Приготовить 2-4% суспензию исследуемых эритроцитов в физиологическом растворе (перед ресуспендированием в физиологическом растворе эритроциты можно отмыть).
4. Добавить по 1 капле суспензии исследуемых эритроцитов (примерно 50мкл) в каждую лунку микропланшет.
5. Тщательно перемешать реакционную смесь либо покачивая микропланшеты вручную, либо используя шейкер.*
6. Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, обеспечивающем оптимальную реакцию.**
7. Встряхнуть микропланшеты для ресуспендирования неагглютинированных эритроцитов вручную, либо с помощью микропланшетного встряхивателя. Оценить агглютинацию в каждой лунке. Для этой цели может быть также использовано зеркало или микропланшетный ридер.
8. Фиксировать результаты.

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении некоторых редких фенотипов антигенов может быть необходима инкубация эритроцитов с реагентами в течение 5–60 минут при температуре 18-30°C.

* Предполагаемое время работы для механического шейкера: 1) Перемешивание: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности. 2) Ресуспендирование: 10-30 секунд при работе прибора на средней мощности или время и скорость, рекомендованное для данного прибора производителем. Режим должен обеспечивать полное ресуспендирование, но не разрушать агглютинаты эритроцитов.

** Центрифугировать микропланшеты при 100-250G в течение 40-60 секунд или в другом режиме, рекомендованном для данной центрифуги, обеспечивающем наиболее сильное взаимодействие антигенов эритроцитов с соответствующими антителами и при этом оставляющем возможность легкого ресуспендирования осадка. При центрифугировании должен получаться чистый супернатант и четкая «пуговица» осадка эритроцитов, который, однако, должно быть возможно легко ресуспендировать.

Невозможно рекомендовать единую скорость или длительность центрифугирования для всех типов центрифуг, используемых в лабораториях. Центрифуги должны калиброваться индивидуально с тем, чтобы режим центрифугирования соответствовал требованиям, изложенным выше.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

С. Метод исследования на плоскости

1. Промаркировать планшеты, на которых будет проводиться исследование
2. Поместить на отдельные планшеты по одной капле (примерно 50мкл) реагентов. Не помещать планшеты на подогреваемые подсвечиваемые поверхности.
3. Добавить по одной капле исследуемой цельной крови (или 35-45% суспензии эритроцитов в физиологическом растворе или совместимой сыворотке или плазме) к каждому реагенту.
4. Отдельными палочками перемешать реагенты и образцы крови с тем, чтобы получились овальные капли примерно 20x40 мм. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию производителя.
5. Наблюдать появление макроскопически регистрируемой агглютинации. На стеклянной поверхности при медленной ротации агглютинация появляется максимум в течение 2 минут. Если используются пластиковые планшеты, см. инструкцию

производителя. Не помещать планшеты на подогреваемые и подсвечиваемые поверхности.

6. Фиксировать результаты.

Стабильность реакции

Все результаты должны фиксироваться тотчас после окончания исследования. В дальнейшем может иметь место диссоциация комплексов антиген-антитело, что приведет к получению ложноотрицательных (или, как минимум, ложных «слабых») результатов. Результаты исследования на плоскости также должны оцениваться незамедлительно во избежание высыхания планшет и ошибочной интерпретации таких результатов, как положительных. Результаты исследования в микропланшетах должны оцениваться тотчас после встряхивания планшеты после центрифугирования. В противном случае возможна ошибочная интерпретация результатов как вследствие диссоциации агглютинатов, так и вследствие повторного оседания эритроцитов.

Контроль качества

Для контроля активности реагентов immuClone® Anti-C, Anti-c, Anti-D rapid, Anti-E, Anti-e, Anti-K, рекомендуется ежедневно проверять эти реагенты с антиген-положительными и антиген-отрицательными эритроцитами, например, Immucor corQC Extend. Если реагенты удовлетворительно реагируют с антиген-положительными эритроцитами и не реагируют с антиген-отрицательными, они считаются пригодными для работы.

Для проведения исследования с микропланшетами, предназначенными для автоматических приборов, см. инструкции к соответствующим приборам.

Интерпретация результатов

Положительная реакция: агглютинация эритроцитов

Отрицательная реакция: агглютинация эритроцитов отсутствует

Ограничения

Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при бактериальной или химической контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования, нарушении режима центрифугирования или условий хранения материалов. Многие человеческие моноклональные IgM против антигенов системы Rh имеют также холодовую анти-I/I активность, особенно с образцами пуповинной крови или эритроцитами, обработанными протеолитическими ферментами. Эта активность может проявляться, если исследование проводится при температуре, ниже рекомендованной.

Эритроциты, положительные в прямом антиглобулиновом тесте, могут давать ложноположительные результаты. Для исключения подобных ошибок рекомендуется использовать реагент immuClone® Rh-Hr Control.

При использовании микропланшетного метода новые, не бывшие в употреблении пластиковые планшеты могут пассивно сорбировать на свою поверхность клетки и сывороточные протенины. Эта неспецифическая абсорбция может приводить к искажению результатов.⁵ Каждая получаемая партия микропланшетов должна валидироваться пользователем на предмет пригодности для использования. При необходимости микропланшеты можно обрабатывать до использования для предотвращения неспецифической абсорбции. В качестве блокирующих реагентов могут применяться БСА (1-2%) или 1% желатин. Раствор следует инкубировать в лунках в течение 10 мин при 18-30°C, затем промыть лунки дистиллированной или деионизированной водой. После промывания максимально удалить воду из лунок и дать микропланшетам полностью высохнуть перед использованием.

Недостаточное или избыточное центрифугирование могут также приводить к ложноотрицательным и ложноположительным результатам.

Не следует использовать данные моноклональные реагенты для непрямого антиглобулинового теста с использованием антиглобулинового реагента.

Антитела, активные при комнатной температуре, могут приводить к ошибкам при определении фенотипа эритроцитов. Предсказать существование этих антител до проведения теста невозможно. Они могут вызывать неспецифическую агглютинацию аутоэритроцитов, если определение фенотипа проводится без предварительного отмывания эритроцитов или ресуспензирование эритроцитов после отмывания проводилось в плазме или сыворотке. Для исключения подобных ошибок рекомендуется использовать реагент immuClone® Rh-Hr Control.

Реагент immuClone® Anti-D rapid взаимодействует с большинством образцов D^{WEAK} и D^{PARTIAL}, но не взаимодействует с вариантом антигена D^{VI} (в соответствии с рекомендациями руководств по обследованию пациентов). Для определения антигена D^{VI} следует провести антиглобулиновый тест с реагентами immuClone® Anti-D Duo IgM/IgG или Novaclone® Anti-D

IgM/IgG. Не следует использовать моноклональный реагент immuClone® Anti-D rapid для непрямого антиглобулинового теста с применением антиглобулинового реагента против антигенов человека.

Не рекомендуется применять тест на плоскости для определения слабых или вариантных форм антигена D.

Существует редкая форма антигена K, описанная как KEL2, и являющаяся мутантной аллелью. Эта форма может давать переменные реакции с различными анти-K реагентами. Стабильность взаимодействия с эритроцитами этого типа не гарантируется.

Несоблюдение настоящих правил может приводить к снижению активности реагентов. Исследование на плоскости может быть недостаточно чувствительным для достоверного определения антигенов со сниженной экспрессией. Модификации, вносимые пользователем в методики, требуют дополнительной валидации.

Характеристики реагентов

Результаты, полученные при изучении активности реагентов immuClone® Anti-D rapid, immuClone® (1) Anti-C, immuClone® (2) Anti-C, immuClone® (1) Anti-c, immuClone® (2) Anti-c, immuClone® (1) Anti-E, immuClone® (2) Anti-E, immuClone® (1) Anti-e, immuClone® (2) Anti-e и immuClone® (1) Anti-K показали, что данные реагенты позволяют безопасно и эффективно определять соответствующие антигены.

Метод определения	immuClone® Anti-D rapid			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Определение в пробирке	968	99,9%	237	100%
Определение на плоскости	493	99,9%	126	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	902	99,9%	226	100%
Определение в микропланшете (автоматической метод)	434	100%	86	100%

Метод определения	immuClone® (1) Anti-C			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Определение в пробирке	528	100%	343	100%
Определение на плоскости	73	100%	39	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	70	100%	42	100%
Определение в микропланшете (автоматической метод)	112	100%	51	100%

Метод определения	immuClone® (1) Anti-c			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Определение в пробирке	178	100%	34	100%
Определение на плоскости	92	100%	20	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	178	100%	34	100%
Определение в микропланшете (автоматической метод)	133	100%	30	100%

Метод определения	immuClone® (1) Anti-E			
	n	Чувствительность	n	Специфичность
Определение в пробирке	54	100%	158	100%
Определение на плоскости	31	100%	81	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	54	100%	158	100%
Определение в микропланшете	58	100%	105	100%

(автоматической метод)				
------------------------	--	--	--	--

Метод определения	immuClone® (1) Anti-e			
	п	Чувствительность	п	Специфичность
Определение в пробирке	227	100%	5	100%
Определение на плоскости	109	100%	3	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	227	100%	5	100%
Определение в микропланшете (автоматический метод)	162	100%	1	100%

Метод определения	immuClone® (2) Anti-C			
	п	Чувствительность	п	Специфичность
Определение в пробирке	265	100%	175	100%
Определение на плоскости	419	100%	201	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	330	100%	169	100%
Определение в микропланшете (автоматический метод)	112	100%	51	100%

Метод определения	immuClone® (2) Anti-c			
	п	Чувствительность	п	Специфичность
Определение в пробирке	386	100%	74	100%
Определение на плоскости	469	100%	151	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	414	100%	86	100%
Определение в микропланшете (автоматический метод)	133	100%	30	100%

Метод определения	immuClone® (2) Anti-E			
	п	Чувствительность	п	Специфичность
Определение в пробирке	146	100%	416	100%
Определение на плоскости	340	100%	779	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	167	100%	337	100%
Определение в микропланшете (автоматический метод)	58	100%	105	100%

Метод определения	immuClone® (2) Anti-e			
	п	Чувствительность	п	Специфичность
Определение в пробирке	488	100%	8	100%
Определение на плоскости	1101	100%	18	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	441	100%	33	100%
Определение в микропланшете (автоматический метод)	162	100%	1	100%

Метод определения	immuClone® (1) Anti-K			
	п	Чувствительность	п	Специфичность
Определение в пробирке	9	100%	189	100%

Определение на плоскости	10	100%	158	100%
Определение в микропланшете (ручной метод)	6	100%	162	100%

Тестирование реагентов проводилось в параллели с лучшими существующими на сегодняшний день реагентами и результаты исследования в 100% случаев совпадали.
Определение взято из Common Technical Specification (CTS).
Диагностическая Чувствительность: Вероятность, с которой тест дает положительный результат при исследовании образца, содержащего объект поиска.
Диагностическая Специфичность: Вероятность, с которой тест дает отрицательный результат при исследовании образца, не содержащего объекта поиска.

Перед выпуском в продажу каждый лот реагентов immuClone® Anti-D rapid, immuClone® (1) Anti-C, immuClone® (2) Anti-C, immuClone® (1) Anti-c, immuClone® (2) Anti-c, immuClone® (1) Anti-E, immuClone® (2) Anti-E, immuClone® (1) Anti-e, immuClone® (2) Anti-e и immuClone® (1) Anti-K проходят контроль качества с панелью антиген-положительных и антиген-отрицательных стандартных эритроцитов для подтверждения активности. Активность продукта соотносится с методами исследования, описанными в настоящей инструкции. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукор по телефону (+49) 6074 8420-10 или по электронной почте tech.support.eu@immucor.com

Библиография

1. Brecher ME, ed. Technical manual. 14-th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
2. Issit P.D and Anstee D.J. Applied Blood Group Serology 4-th Edition, Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1998, Chapter 12
3. Daniels, G. Human Blood Groups, Blackwell Science Ltd, 1995, Chapter 5
4. Guidelines for Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 5-th Edition 2001. The Stationary Box
5. Crawford MN, Gottman FE, Gottman CA, Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion 1970;10:258

REF	Описание
0007117; 0007127	immuClone® Anti-D rapid IgM
0066008; 0066085	immuClone® Anti-D rapid Galileo IgM
0007206; 0007204; 0007216; 0007214	immuClone® (1) Anti-C IgM
0066011	immuClone® (1) Anti-C Galileo IgM
0007306; 0007304; 0007316; 0007314	immuClone® (1) Anti-c IgM
0066013	immuClone® (1) Anti-c Galileo IgM
0007406; 0007404; 0007416; 0007414	immuClone® (1) Anti-E IgM
0066015	immuClone® (1) Anti-E Galileo IgM
0007506; 0007504; 0007516; 0007514	immuClone® (1) Anti-e IgM
0066017	immuClone® (1) Anti-e Galileo IgM
0007207; 0007205; 0007217; 0007215	immuClone® (2) Anti-C IgM
0066012	immuClone® (2) Anti-C Galileo IgM
0007307; 0007305; 0007317; 0007315	immuClone® (2) Anti-c IgM
0066014	immuClone® (2) Anti-c Galileo IgM
0007407; 0007405; 0007417; 0007415	immuClone® (2) Anti-E IgM
0066016	immuClone® (2) Anti-E Galileo IgM
0007507; 0007505; 0007517; 0007515	immuClone® (2) Anti-e IgM
0066018	immuClone® (2) Anti-e Galileo IgM
0008016; 0008026	immuClone® (1) Anti-K (Kell) IgM
0066020	immuClone® (1) Anti-K (Kell) Galileo IgM



Реагент Субстанция Gamma P1

Для идентификации антиэритроцитарных антител

- **IVD** In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature Limitation
Discard if markedly left of
-  Consult Instructions for Use
-  Harmful, Preservative 0.1% Sodium Azide



Назначение: Субстанция Gamma P1 предназначена для помощи при идентификации антиэритроцитарных антител путем нейтрализации антител анти-P1 в сыворотке или плазме.

Общая информация

Для подтверждения установленной специфичности антиэритроцитарных антител в некоторых случаях используется возможность нейтрализации антител растворимыми субстанциями. Примером таких антител являются анти-P1 антитела, вырабатываемые P1-отрицательным индивидом при трансфузии P1-положительных эритроцитов. Добавление в исследуемый образец, предположительно содержащий антитела анти-P1, растворимой P1 субстанции позволяет убедиться в правильности поставленного диагноза, а также провести дальнейшие исследования для идентификации этих антител, содержащихся в образце без использования панели эритроцитов, не содержащих антигена P1. Источником приготовления субстанции P1 является белок яиц индейки.

Принцип

После добавления в определенных пропорциях субстанции P1 в образец сыворотки или плазмы, содержащий антитела анти-P1 последующее тестирование образца с P1-положительными эритроцитами приведет к отрицательному результату. Таким образом, можно подтвердить результат идентификации антител, если провести параллельное исследование образца, в который добавлена субстанция и образца, в который субстанция не добавлена. Если в образце присутствуют дополнительные антитела, нейтрализация анти-P1 антител может облегчить их идентификацию. Эффект разведения образца при этом будет минимальный, поскольку субстанция добавляется к образцу в пропорции 1:10, но и этого искажения можно избежать, если добавить к параллельно исследуемому образцу изотонический раствор в той же пропорции 1:10.

Реагент

Реагент Субстанция Gamma P1 представляет собой стандартизованный раствор птичьей субстанции P1 в фосфатно-солевом буфере. Содержит 0,1% азид натрия в качестве консерванта.

Предупреждения

Реагенты предназначены только для диагностики in vitro. Хранить при температуре -10°C. Не замораживать. Не использовать при выраженном помутнении. Не использовать после истечения срока годности. Стараться избегать контаминации реагента.



Данные реагенты содержат 0,1% азид натрия и классифицируются как опасные (Xn).
Опасны при проглатывании (R22).

Предупреждение: Азид натрия может взаимодействовать с медными деталями с образованием взрывоопасных веществ. Если реагент вылили в раковину, ее необходимо промыть большим количеством воды во избежание взаимодействия азид натрия с водопроводными трубами.

Обращаться с реагентом, как с потенциально инфицированным материалом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: УПАКОВКА ВКЛЮЧАЕТ ГРУШУ ИЗ НАТУРАЛЬНОЙ РЕЗИНЫ.

Формат маркировки срока годности: год-месяц-число.

Взятие образцов для исследования

Для проведения теста пригодны образцы, заготовленные для определения и идентификации антиэритроцитарных антител. Если количество образца

недостаточно для проведения параллельного исследования, взять новый образец, руководствуясь правилами, изложенными в инструкции к тест-эритроцитам.

Процедура

Состав упаковки

Реагент субстанция Gamma P1.

Дополнительные материалы

Тестовые пробирки (12x75 мм или 10x75мм), пипетки, изотонический фосфатно-солевой буфер (примерно 15 mM) pH 6,5-7,5, таймер, центрифуга, лупа или микроскоп.

Проведение исследования

1. Внести исследуемую сыворотку или плазму в необходимых объемах в две тестовые пробирки. Объем образца должен быть достаточен для последующих исследований, а также должен быть учтен для последующего добавления субстанции. Например, 10 капель образца может быть в дальнейшем подвергнуто только ограниченному исследованию, в то время как 1 мл может быть достаточен для проведения исследования с панелью эритроцитов.
2. Пробирки промаркировать и добавить в них:
 - в первую пробирку – субстанцию Gamma P1 в пропорции 1:10 к объему образца (например, 1 каплю субстанции на 10 капель образца или 0,1 мл субстанции на 1,0 мл образца).
 - во вторую пробирку добавить аналогичное количество изотонического раствора.

Примечание: Субстанцию следует вносить непосредственно в образец, а не на стенку пробирки.
3. Содержимое пробирок хорошо перемешать и оставить пробирки при комнатной температуре (23±3°C) на 5 минут. Инкубация в течение более длительного времени может усилить нейтрализацию.
4. Снова перемешать содержимое пробирок и провести параллельно предполагаемые исследования с панелями эритроцитов в соответствии с инструкциями к тест-эритроцитам. В состав панели должен входить как минимум один образец эритроцитов, дававших ранее положительную реакцию с образцом.
5. Интерпретировать и фиксировать результат.

Контроль качества

Методика проведения исследования предполагает учитывать возможный эффект разведения образца, которое происходит от добавления 1 части субстанции к 10 частям образца, включением параллельного теста с разведением образца изотоническим раствором. Важно, чтобы это параллельное исследование проводилось с тем же самым образцом. В случае, если с обоими образцами получен отрицательный результат с теми же эритроцитами, с которыми ранее был получен положительный результат, это может означать, что или наблюдается эффект разведения, сделавший невозможным выявление очень слабых антител, или условия проведения исследования не были идентичными в первый и второй раз. Например, если в первый раз исследование проводилось с эритроцитами, которые были только что вынуты из холодильника, а второй – после того, как эритроциты успели согреться, то первый тест мог быть более чувствительным, поскольку антитела анти-P1 более активны при низкой температуре. Другая возможность заключается в том, что первое и второе исследование могли быть проведены с образцами, взятыми в разное время. Для контроля эффективности методики рекомендуется периодически проводить исследования с сыворотками, содержащими известные антитела анти-P1 (например, с реагентом Gamma-clone Anti-P1).

Интерпретация результатов

Если сыворотка, обработанная субстанцией P1, не вызывает агглютинации P1-положительных эритроцитов, а сыворотка, в которую был добавлен изотонический раствор, агглютинацию вызывает, присутствие антител анти-P1 в образце можно считать доказанным.

Если образец, обработанный субстанцией и образец, субстанцией не обработанный, дают одинаковые и равные по силе и специфичности результаты, это говорит о том, что антитела, присутствующие в образце, субстанцией инактивированы не были. В большинстве случаев это означает, что данные антитела имеют иную специфичность, отличную от анти-P1. В редких случаях особенно активные антитела анти-P1 при добавлении субстанции P1 могут быть или не нейтрализованы, или нейтрализованы только частично. В таких случаях между двумя образцами может наблюдаться разница в силе реакции 1+ и более. Если предполагается наличие частичной нейтрализации, исследование следует

повторить, увеличив соотношение субстанции и образца до 1:5 или даже до соотношения 1:1, также добавляя эквивалентное количество изотонического раствора в параллельный образец.

В случае наличия нескольких антител характер реакции с образцом, обработанным субстанцией P1, будет соответствовать ожидаемому результату для нескольких антител. Удаление из образца антител анти-P1 облегчит идентификацию остальных антител, поскольку не будет необходимости использовать P1-отрицательные эритроциты. Также процедура удаления из образца антител анти-P1 может быть полезна для определения группы крови ABO. В случае отсутствия в образце других антител, активных при данных условиях, удаление из образца антител анти-P1 позволит подтвердить результаты, полученные при типировании эритроцитов.

Ограничения

Как и во всех серологических тестах, ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут иметь место при контаминации материалов, неадекватном времени инкубации или температуре исследования и нарушении техники проведения исследования. Кроме того:

1. Антитела анти-P1, имеющие особенно высокую активность, могут быть только частично нейтрализованы при использовании рекомендованного количества субстанции.
2. Особо слабые антитела могут перестать определяться при добавлении субстанции и изотонического раствора в соотношении 1:10.
3. Кроме антител анти-P1 данный продукт может нейтрализовать также антитела анти-P^K. Эти антитела часто вырабатываются вместе с антителами анти-P1 индивидами, имеющими фенотип Tja-). Если образец содержит антитела анти-P, анти-P1 и анти-P^K то антитела анти-P1 и анти-P^K будут нейтрализованы, а антитела анти-P – не будут.

Характеристики реагентов

Было показано, что реагент Gamma P1 ингибирует агглютинацию P1-положительных эритроцитов антителами анти-P1 при титре антител в сыворотке не менее 1:8. Субстанция не ингибирует другие обычно идентифицируемые антитела (к антигенам групп MNSs, Rh, Lutheran, Lewis, Duffy, Kidd). При правильном использовании продукт помогает при идентификации антиэритроцитарных антител. Эффективность реагента зависит от соблюдения правил проведения исследований. Дополнительная информация относительно тестирования при производстве реагентов или при контроле качества может быть предоставлена по запросу Технической службой Иммукоп по телефону 800-492-BLUD(2853) или 770-441-2051.

Библиография

1. Francois-Gerard CH, Brocteur J. Description of P1-like antigen present in turtle-dove eggs. Abstract of a poster presented at XV Congress of the international Society of Blood Transfusion, Paris 1978.



Утверждено
директор и инструкцией
содержит и расхождение
содержит Интисок. П.С.

[Signature]
01.08.2011

