

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор ООО «ГЕМ»

/ С. А. Гольдберг
_____ 2008г.

М.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению реагента для определения
резус-принадлежности крови человека на основе
моноклональных антител «Анти-D Супер ЦОЛИКЛОН»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Анти-D Супер Цоликлон - жидкий диагностический реагент для определения резус-принадлежности крови человека - предназначен для качественного выявления в эритроцитах человека Rh(D)-антигена системы «резус». Применяется в учреждениях службы крови, клинико-диагностических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 1000 определений при расходе по 0,1 мл реагента на 1 анализ.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Основным принципом метода типирования крови при помощи моноклональных антител является реакция антиген-антитело. Активные центры антител определенной специфичности связываются с мембранными антигенами эритроцитов крови, что вызывает агглютинацию (склеивание) эритроцитов, легко наблюдаемое визуально.

Наличие агглютинации эритроцитов исследуемой крови человека под действием моноклональных антител определенной специфичности однозначно свидетельствует о том, что данные эритроциты несут антиген данной специфичности.

3. СОСТАВ РЕАГЕНТА

Реагент Анти-D Супер Цоликлон, представляет собой раствор анти-D моноклональных антител в 0,2 % растворе NaCl с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина, 7 % глюкозы и азида натрия (0,1%) в качестве консерванта.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАГЕНТА

Анти-D Супер Цоликлон - жидкий диагностический реагент для определения резус-принадлежности крови человека - представляет собой раствор полных антител, относящихся к иммуноглобулинам класса М (IgM-антитела), специфичности анти-D.

Титр (концентрация) антител в реагенте Анти-D Супер Цоликлон соответствует значению 1 : 256 в прямой реакции агглютинации с D-положительными эритроцитами в микроплате при титровании 2% раствором бычьего сывороточного альбумина (титр 1 : 32 в прямой реакции агглютинации D-поло-жительных эритроцитов на плоскости). Авидность (гемагглютинирующая активность) - 60 секунд. В реакции используется по 0,1 мл реагента и примерно 0,05 - 0,01 мл крови или эритроцитов.

Воспроизводимость результатов резус-типирования крови человека реагентом Анти-D Супер Цоликлон - 100 %. Результат типирования не зависит от форм антигена D в исследуемых эритроцитах (сильные или слабые).

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Анализ может проводиться с образцами нативной крови или эритроцитов, полученных из венозной, артериальной или капиллярной крови, как взятой в консервант, так и без консерванта.

Следует избегать загрязнения анализируемого образца эритроцитами из другой пробы, т.к. вследствие высокой чувствительности реагентов сравнительно небольшое количество иммуноактивных загрязнений может привести к ложно-положительной реакции.

Срок пригодности образцов крови человека для их типирования с помощью Цоликлонов ограничен 7 сутками хранения при температуре $+2^{\circ}\dots+8^{\circ}\text{C}$.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Компоненты реагента Анти-D Супер Цоликлон в используемых концентрациях не токсичны и не требуют соблюдения специальных мер безопасности при работе с ними.

Работа с образцами крови требует использования одноразовых пластиковых или резиновых перчаток, т. к. исследуемые образцы могут содержать вирусы гепатитов, ВИЧ или другой гемоконтактной инфекции (Приказ № 408 Минздрава СССР от 12 июля 1989 года).

7. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С РЕАГЕНТОМ

- Керамические пластинки (плитка облицовочная) однотонные, светлые с чистой сухой обезжиренной поверхностью; возможно использование различных типов планшетов* для определения групп крови;
- круглодонные микропланшеты для иммунологических реакций;
- пипетки вместимостью 0,1 мл;
- пробирки стеклянные или пластиковые с анализируемыми образцами крови, маркированные, в штативе;
- одноразовые пастеровские пипетки пластиковые или стеклянные для нанесения на пластинку капель типизируемых образцов крови;
- палочки стеклянные для смешивания реагента с образцом исследуемой крови;
- водяная баня или термостат, поддерживающие температуру $+45^{\circ}\dots+50^{\circ}\text{C}$;
- физиологический раствор;
- раствор желатина 10 %

* Использование применявшихся ранее специальных шариков в планшетах для определения групп крови человека не рекомендуется.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА ДЛЯ АНАЛИЗА

Реагент полностью готов к работе и специальной подготовки не требует.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

На проведение одного анализа резус-принадлежности крови человека (типирование 1 образца) расходуется примерно 0,1 мл Анти-D Супер Цоликлона. При использовании неградуированных пипеток 0,1 мл - 1 полная капля.

Анализы следует проводить в помещении с хорошим освещением и температурой $+15^{\circ}\dots+30^{\circ}\text{C}$.

Моноклональные анти-D IgM антитела Анти-D Супер Цоликлона могут быть использованы для выявления D - антигена системы резус в любых модификациях прямой реакции агглютинации: на плоскости, в пробирке, в микроплате. Тестирование резус-принадлежности крови человека любым из этих методов не требует дополнительной перепроверки и позволяет надежно выявлять даже слабые формы D - антигена системы резус. В случае выявления данным

реагентом резус-отрицательного донора можно провести подтверждение полученного результата тем же реагентом в реакции конгломинации с желатином, изоиммунной сывороткой или цоликлоном анти-D производства ООО «Гематолог» или фирм «BIOTEST AG» (Германия), «Ortho Diag.» (США). Это позволит гарантированно избежать случайных ошибок учета результата при тестировании методом прямой реакции агглютинации на плоскости в редких случаях особо слабых форм D - антигена, при которых агглютинация может быть выражена слабо (т.н. «песочная агглютинация») или развиваться медленнее, чем за 3 минуты. Заключение о присутствии D - антигена в исследуемых эритроцитах делают по наличию положительной реакции агглютинации.

Прямая реакция агглютинации

На плоскости:

На смачиваемую (обезжиренную) поверхность светлой керамической пластинки нанести одну каплю (0,1 мл) Анти-D Супер Цоликлона. Рядом поместить маленькую (10 мкл) каплю исследуемой крови и смешать каплю Цоликлона с каплей крови индивидуальной чистой стеклянной палочкой. Реакция агглютинации развивается уже через 30 секунд при мягком покачивании пластинки, практически полностью реакция проходит за 60 секунд. Результаты учитываются через 3 минуты после смешивания капель, поскольку реакция агглютинации эритроцитов, несущих слабую форму D - антигена протекает медленнее.

Положительный результат тестирования выражается в появлении агглютинации (склеивания) эритроцитов, которую можно наблюдать невооруженным глазом, поскольку капля быстро просветляется, а эритроциты образуют крупные, хорошо различимые ярко-алые агрегаты (см. Рис. 1).



Рис 1. Положительный результат:
хорошо видны агглютинаты
в просветлившемся поле реакции



Рис 2. Отрицательный результат:
агглютинация не наблюдается,
поле реакции равномерно окрашено

При отрицательном результате гемагглютинация не развивается, капля продолжает оставаться равномерно окрашенной в красный свет, агрегаты в ней не обнаруживаются (см. Рис. 2).

В пробирке:

В пробирку вносят 2 капли (по 0,1 мл) реагента Анти-D Супер Цоликлона и добавляют к нему 1 каплю 5 % взвеси отмытых в физиологическом растворе эритроцитов исследуемой крови. Содержимое пробирки тщательно перемешивают встряхиванием и инкубируют в течение 30 - 45 минут при комнатной температуре (+ 18 °...+ 25 ° С). Затем пробирку центрифугируют при 1500-2000 об./мин. в течение 1 минуты. Осадок мягко взвешивают, покачивая пробирку, и по наличию агглютинатов, выявляемых визуально и под микроскопом, делают заключение о присутствии D - антигена.

В микропланшете:

В лунку круглодонного микропланшета вносят 50 мкл Анти-D Супер Цоликлона и 50 мкл 2 % взвеси отмытых в физиологическом растворе эритроцитов исследуемой крови, перемешивая пипетированием. Через 45-60 минут инкубации при комнатной температуре визуально учитывают реакцию агглютинации по характеру осадка эритроцитов на дне лунки : при отрицательном результате осадок эритроцитов на дне лунки имеет вид точки с четко очерченными краями, при положительном - устилает все дно лунки, край имеет неровный, часто - завернутый внутрь.

Реакция конгломинации с желатином.

В пробирку вносят 1 каплю (0,1 мл) отмытых эритроцитов. Затем добавляют 2 капли (0,2 мл) 10 % раствора желатина, предварительно прогретого в бане или термостате до разжижения при

температуре $+45...+50^{\circ}\text{C}$, и одну каплю (0,1 мл) Анти-D Супер Цоликлона. Смесь тщательно перемешивают, инкубируют 10-15 минут на водяной бане или в течение 30 минут в термостате при температуре $+48^{\circ}\text{C}$, прибавляют 5 - 6 мл физиологического раствора. Наличие агглютинации определяют визуально после осторожного переворачивания пробирки. Агглютинация эритроцитов свидетельствует о наличии в них D-антигена.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Срок хранения реагента - 2 года при температуре $+2^{\circ}...+8^{\circ}\text{C}$. При температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ компоненты набора устойчивы в течение месяца в закрытом виде. Вскрытый флакон в закрытом виде можно хранить при температуре $+2^{\circ}...+8^{\circ}\text{C}$ в течение месяца.

По вопросам, касающимся качества реагента «Анти-D Супер Цоликлон» следует обращаться в ООО «ГЕМ» по адресу: 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4-А, ООО «ГЕМ». Директору ООО «ГЕМ» С.А. Гольдбергу.

Телефоны: (495) 612-43-12, 613-86-63, тел./факс (495) 612-40-81

Мастер производства



Жеребцова Л. В.

« УТВЕРЖДАЮ »

Руководитель Департамента государственного
контроля качества, эффективности и
безопасности лекарственных средств
и медицинской техники МЗ РФ

“ 21 ”

Р. У. Хабриев
1999 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению реагента для определения
резус-принадлежности крови человека на основе
моноклональных антител «Анти-D Супер ЦОЛИКЛОН»**

Рекомендована к утверждению экспертной комиссией по лабораторным
реагентам Комитета по новой медицинской технике Минздрава РФ
(протокол № 8 от 28 декабря 1998 г.)

НАЗНАЧЕНИЕ

Анти-D Супер Цоликлон - жидкий диагностический реагент для определения резус-принадлежности крови человека - предназначен для качественного выявления в эритроцитах человека Rh(D)-антигена системы «резус». Применяется в учреждениях службы крови, клиничко-диагностических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 1000 определений при расходе по 0,1 мл реагента на 1 анализ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Основным принципом метода типирования крови при помощи моноклональных антител является реакция антиген-антитело. Активные центры антител определенной специфичности связываются с мембранными антигенами эритроцитов крови, что вызывает агглютинацию (склеивание) эритроцитов, легко наблюдаемое визуально.

Наличие агглютинации эритроцитов исследуемой крови человека под действи-

Инструкция составлена М.С. Орловой - зав. производством ТОО «Гем»,
А.Г. Башлай - зав. лабораторией Московской го-
родской станции переливания крови

ем моноклональных антител определенной специфичности однозначно свидетельствует о том, что данные эритроциты несут антиген данной специфичности.

СОСТАВ РЕАГЕНТА

Реагент Анти-D Супер Цоликлон, представляет собой раствор анти-D моноклональных антител в 0,2 % растворе NaCl с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина, 7 % глюкозы и азида натрия (0,1%) в качестве консерванта.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАГЕНТА

Анти-D Супер Цоликлон - жидкий диагностический реагент для определения резус-принадлежности крови человека - представляет собой раствор полных антител, относящихся к иммуноглобулинам класса М (IgM-антитела), специфичности анти-D.

Титр (концентрация) антител в реагенте Анти-D Супер Цоликлон соответствует значению 1 : 256 в прямой реакции агглютинации с D-положительными эритроцитами в микроплате при титровании 2% раствором бычьего сывороточного альбумина (титр 1 : 32 в прямой реакции агглютинации D-положительных эритроцитов на плоскости). Авидность (гемагглютинирующая активность) - 60 секунд. В реакции используется по 0,1 мл реагента и примерно 0,05 - 0,01 мл крови или эритроцитов.

Воспроизводимость результатов резус-типирования крови человека реагентом Анти-D Супер Цоликлон - 100 %. Результат типирования не зависит от форм антигена D в исследуемых эритроцитах (сильные или слабые).

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Анализ может проводиться с образцами нативной крови или эритроцитов, полученных из венозной, артериальной или капиллярной крови, как взятой в консервант, так и без консерванта.

Следует избегать загрязнения анализируемого образца эритроцитами из другой пробы, т.к. вследствие высокой чувствительности реагентов сравнительно небольшое количество иммуно-активных загрязнений может привести к ложноположительной реакции.

Срок пригодности образцов крови человека для их типирования с помощью Цоликлонов ограничен 7 сутками хранения при температуре +2°...+8°С.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ



Компоненты реагента Анти-D Супер Цоликлон в используемых концентрациях не токсичны и не требуют соблюдения специальных мер безопасности при работе с ними.

Работа с образцами крови требует использования одноразовых пластиковых или резиновых перчаток, т. к. исследуемые образцы могут содержать вирусы гепатитов, ВИЧ или другой гемоконтактной инфекции (Приказ № 408 Минздрава СССР от 12 июля 1989 года).

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Керамические пластинки (плитка облицовочная) однотонные, светлые с чистой сухой обезжиренной поверхностью; возможно использование различных типов планшетов* для определения групп крови;
- круглодонные микропланшеты для иммунологических реакций;
- пипетки вместимостью 0,1 мл;
- пробирки стеклянные или пластиковые с анализируемыми образцами крови, маркированные, в штативе;
- одноразовые пастеровские пипетки пластиковые или стеклянные для нанесения на пластинку капель типизируемых образцов крови;
- палочки стеклянные для смешивания реагента с образцом исследуемой крови;
- водяная баня или термостат, поддерживающие температуру $+ 45^{\circ} \dots + 50^{\circ} \text{C}$;
- физиологический раствор;
- раствор желатина 10 %

* Использование применявшихся ранее специальных шариков в планшетах для определения групп крови человека не рекомендуется.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА ДЛЯ АНАЛИЗА

Реагент полностью готов к работе и специальной подготовки не требует.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

На проведение одного анализа резус-принадлежности крови человека (типирование 1 образца) расходуется примерно 0,1 мл Анти-D Супер Цоликлона. При использовании неградуированных пипеток 0,1 мл - 1 полная капля.

Анализы следует проводить в помещении с хорошим освещением и температурой $+ 15^{\circ} \dots + 30^{\circ} \text{C}$.



Моноклональные анти-D IgM антитела Анти-D Супер Цоликлона могут быть использованы для выявления D - антигена системы резус в любых модификациях прямой реакции агглютинации : на плоскости, в пробирке, в микроплате. Тестирование резус-принадлежности крови человека любым из этих методов не требует дополнительной перепроверки и позволяет надежно выявлять даже слабые формы D - антигена системы резус. В случае выявления данным реагентом резус-отрицательного донора можно провести подтверждение полученного результата тем же реагентом в реакции конгломинации с желатином, изоиммунной сывороткой или цоликлоном анти-D производства ООО «Гематолог» или фирм «BIOTEST AG» (Германия), «Ortho Diag.» (США). Это позволит гарантированно избежать случайных ошибок учета результата при тестировании методом прямой реакции агглютинации на плоскости в редких случаях особо слабых форм D - антигена, при которых агглютинация может быть выражена слабо (т.н. «песочная агглютинация») или развиваться медленнее, чем за 3 минуты.

Заключение о присутствии D - антигена в исследуемых эритроцитах делают по наличию положительной реакции агглютинации.

Прямая реакция агглютинации

На плоскости :

На смачиваемую (обезжиренную) поверхность светлой керамической пластинки нанести одну каплю (0,1 мл) Анти-D Супер Цоликлона. Рядом поместить маленькую (10 мкл) каплю исследуемой крови и смешать каплю Цоликлона с каплей крови индивидуальной чистой стеклянной палочкой. Реакция агглютинации развивается уже через 30 секунд при мягком покачивании пластинки, практически полностью реакция проходит за 60 секунд. Результаты учитываются через 3 минуты после смешивания капель, поскольку реакция агглютинации эритроцитов, несущих слабую форму D - антигена протекает медленнее. Положительный результат тестирования выражается в появлении агглютинации (склеивания) эритроцитов, которую можно наблюдать невооруженным глазом, поскольку капля быстро просветляется, а эритроциты образуют крупные, хорошо различимые ярко-алые агрегаты (см. Рис. 1).



Рис 1. Положительный результат :
хорошо видны агглютинаты
в просветлившемся поле реакции



Рис 2. Отрицательный результат :
агглютинация не наблюдается,
поле реакции равномерно окрашено

При отрицательном результате гемагглютинация не развивается, капля продолжает оставаться равномерно окрашенной в красный свет, агрегаты в ней не обнаруживаются (см. Рис. 2).

В пробирке :

В пробирку вносят 2 капли (по 0,1 мл) реагента Анти-D Супер Цоликлона и добавляют к нему 1 каплю 5 % взвеси отмытых в физиологическом растворе эритроцитов исследуемой крови. Содержимое пробирки тщательно перемешивают встряхиванием и инкубируют в течение 30 - 45 минут при комнатной температуре ($+18^{\circ}\dots+25^{\circ}\text{C}$). Затем пробирку центрифугируют при 1500-2000 об./мин. в течение 1 минуты. Осадок мягко взвешивают, покачивая пробирку, и по наличию агглютинатов, выявляемых визуальным и под микроскопом, делают заключение о присутствии D - антигена.

В микропланшете :

В лунку круглодонного микропланшета вносят 50 мкл Анти-D Супер Цоликлона и 50 мкл 2 % взвеси отмытых в физиологическом растворе эритроцитов исследуемой крови, перемешивая пипетированием. Через 45-60 минут инкубации при комнатной температуре визуально учитывают реакцию агглютинации по характеру осадка эритроцитов на дне лунки : при отрицательном результате осадок эритроцитов на дне лунки имеет вид точки с четко очерченными краями, при положительном - устилает все дно лунки, край имеет неровный, часто - завернутый внутрь.

Реакция конглютинации с желатином.

В пробирку вносят 1 каплю (0,1 мл) отмытых эритроцитов. Затем добавляют 2 капли (0,2 мл) 10 % раствора желатина, предварительно прогретого в бане или термостате до разжижения при температуре $+45\dots+50^{\circ}\text{C}$, и одну каплю (0,1 мл) Анти-D Супер Цоликлона. Смесь тщательно перемешивают, инкубируют 10-15 минут на водяной бане или в течение 30 минут в термостате при температуре $+48^{\circ}\text{C}$, прибавляют 5 - 6 мл физиологического раствора. Наличие агглютинации определяют визуально после осторожного переворачивания пробирки. Агглютинация эритроцитов свидетельствует о наличии в них D-антигена.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРОВ

Срок хранения набора - 2 года при температуре $+2^{\circ}\dots+8^{\circ}\text{C}$. При температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ компоненты набора устойчивы в течение месяца в закрытом виде.

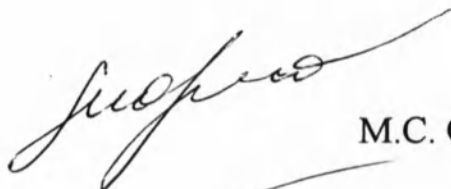


Вскрытый флакон в закрытом виде можно хранить при температуре $+2^{\circ}\dots+8^{\circ}$ С в течение месяца.

По вопросам, касающимся качества реагента « Анти-D Супер Цоликлон» следует обращаться в ТОО «Гем» по адресу: 125167 Москва, Новозыковский проезд, 4-А, ТОО «ГЕМ». Директору ТОО «ГЕМ» С.А. Гольдбергу.

Телефоны : (095) 212-43-12, 213-86-63, тел./факс (095) 212-40-81

Зав. производством



М.С. Орлова

Зав. лабораторией изосерологии Московской городской станции переливания крови



А.Г. Башлай

