



UA.TR.098

Інструкція
з використання моноклонального реагенту анти-D Мікс
для визначення груп крові людини за системою Rhesus
анти-D Мікс Ig M/Ig G

IN VITRO

Зберігати при 2-8°C

Тільки для професійного використання.

Резус-належність (Rh+ або rh-) визначається наявністю або відсутністю антигену D, який є найбільш імуногенним із усіх еритроцитарних антигенів.

Характерною особливістю антигену D системи Rhesus є його поліморфізм, що зумовлює наявність великої кількості різновидів даного антигену. Різні зразки D+ еритроцитів не завжди демонструють однакову силу реакції з анти-D-реагентом. Більшість D+ еритроцитів вступають у пряму реакцію аглютинації з анти-D Ig M реагентом, тому сумнівів у їх позитивній резус-належності немає.

У випадках, коли зразок еритроцитів дає нечітку, сумнівну реакцію аглютинації з анти-D Ig M реагентом або не дає її зовсім, для встановлення резус-належності необхідно застосовувати додаткові дії, наприклад, подовжити термін інкубації з анти-D Ig M реагентом або додати антиглобуліновий реагент після сенсibilізації еритроцитів анти-D Ig G (керуючись інструкцією виробника). При наявності аглютинації такі клітини відносять до D+.

Принцип методу

Моноклональний реагент анти-D Мікс являє собою суміш моноклональних антитіл класу Ig M і Ig G, що дозволяє з його допомогою виявляти як нормальний антиген D, так і його слабкі варіанти і категорії.

Визначення антигену D системи Rhesus проводять за загальноприйнятими методами виявлення антигенів еритроцитів і можуть використовуватись в будь-якій модифікації реакції прямої аглютинації: в пробірках, на площині, в мікроплатах.

Враховуючи, що реагент анти-D Мікс містить моноклональні антитіла класу Ig G, рекомендуються визначення D антигену групи крові людини за системою Rhesus проводити в два етапи: перший – метод прямої аглютинація в пробірках; другий - непрямий антиглобуліновий тест або конглоїтинації з желатином. Непрямий антиглобуліновий тест є найбільш чутливим методом виявлення антигену D і його слабких варіантів.

Призначення

Виявлення клінічно важливих антигенів еритроцитів людини по системам Rhesus, сенсibilізація до яких призводить до тяжких посттрансфузійних ускладнень.

При застосуванні моноклонального реагенту анти-D Мікс для визначення груп крові людини за системою Rhesus слід керуватися даною Інструкцією, а також «Інструкцією з визначення груп крові за системами АВ0, резус та імунних антитіл» (наказ МОЗ України №164 від 05.07.1999 р.)

Аналітичні характеристики

Реагент строго специфічен.

1. Моноклональний реагент анти-D Мікс містить суміш моноклональних антитіл класів Ig M (в реакції прямої аглютинації в пробірках титр $\geq 1:128$) і Ig G (в реакції непрямой аглютинації в антиглобуліновому тесті (НАГТ) титр $\geq 1:256$).

2. Моноклональний реагент анти-D Мікс має високу гемаглютинуючу активність і надійно виявляє відповідний антиген на еритроцитах як гомо-, так і гетерозиготних фенотипів протягом не пізніше 120 с (с) (в прямій реакції на площині). Моноклональний реагент анти-D Мікс специфічний і не дає перехресних реакцій з невідповідними антигенами.

Для отримання надійних результатів необхідно дотримання інструкції по призначенню набору.

Відтворюваність результатів складає 100%.

Матеріал для дослідження

Нативна кров без консерванту або кров стабілізована з використанням консервантів (глюгіцер, цитроглюкофосфат, гепарин та ін.). Рекомендовано проводити дослідження в крові стабілізованій ЕДТА, відмитих та невідмитих еритроцитах.

Зразки отриманої крові повинні бути досліджені якомога скоріше, не пізніше 24-48 h (год) від часу забору від пацієнта. Якщо дослідження затримуються, зразки повинні зберігатися при температурі 2-8°C. Обмеження: не можна аналізувати гемолізовані зразки крові, а також зразки з наявністю згустків.

Умови проведення досліджень.

Визначення груп крові проводиться в приміщенні з достатнім освітленням при кімнатній температурі 18-25°C.

Для кожного реагенту (пацієнту) використовуйте окрему промарковану піпетку. Бажано користуватися одноразовими допоміжними матеріалами (планшетами, мікроплатами, пробірками, паличками для перемішування та ін.)

Перелік необхідного устаткування

- пластина або планшет, білий плоский для аглютинації;
- секундомір;
- палочки скляні або пластикові;
- пробірки центрифужні місткістю 5.0-10.0 ml (мл);
- пробірки круглодонні місткістю 2.0-5.0 ml (мл);
- піпетки місткістю 5.0 ml (мл) або 10.0 ml (мл);
- піпетки напівавтоматичні одноканальні зі змінюваними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми рідини 0.01, 0.05 і 0.1 ml (мл);
- водяна баня або термостат, який підтримує температуру 37-48°C;
- центрифуга настільна на 3000 г/мін (об/хв);
- 0.9% фізіологічний розчин;
- рукавички гумові;
- контрольні еритроцити + і - фенотипу для кожного реагенту.

Підготовка реагентів для аналізу

Реагент готовий до застосування.

Підготовка еритроцитів.

Стандартні еритроцити, що зберігаються в консерванті. Відмийте тричі 0.9% фізіологічним розчином. Реакція з використанням анти-D Мікс проводиться з відмитими досліджуваними еритроцитами.

Приготування 5% суспензії еритроцитів. До 1 ml (мл) 0.9% фізіологічного розчину додайте 2 краплі крові або 1 краплю осаду еритроцитів.

Проведення аналізу**1. Перший етап. Реакція прямої аглютинація в пробірках**

1.1. Внесіть 1 краплю моноклонального реагенту анти-D Мікс в круглодонну центрифужну пробірку обсягом 10 ml (мл). Додайте 1 краплю 5% суспензії досліджуваних еритроцитів і ретельно перемішайте струшуванням.

1.2. Центрифугуйте пробірку протягом 1 min (хв) при 1500 г/мін (об/хв) при кімнатній температурі.

1.3. Обережно струшуючи пробірку, відокремте осад від дна.

1.4. Оцініть результат реакції візуально на наявність або відсутність аглютинації.

Оцінка результатів

При негативному результаті осад еритроцитів розбивається і утворює гомогенну непрозору суспензію.

При позитивному результаті осад залишається у вигляді одного або декілька великих аглютинатів на тлі прозорої рідини.

Позитивний результат свідчить про наявність антигену D. При негативному або сумнівному результаті слід продовжити дослідження і перейти до другого етапу.

2. Другий етап. Проведення реакції непрямої аглютинації за допомогою антиглобулінової сироватки.

2.1. Внесіть 100 µl (мкл) 2-5% суспензії еритроцитів в промарковану круглодонну пробірку або 50 µl (мкл) до лунки круглодонного планшету.

2.2. Додайте в пробірку 2 краплі (100 µl (мкл)), а до лунки - 1 краплю (50 µl (мкл)) моноклонального реагенту анти-D Мікс з флакона-крапельниці і змішайте.

2.3. Інкубуйте суміш 45-60 min (хв) при 37°C, якщо еритроцити розведені в ФР, і 15 min (хв), якщо еритроцити розведені в розчині LISS.

- 2.4. Відмийте суміш один раз ФР, щоб повністю зняти супернатант після відмивання.
- 2.5. До осаду в пробірці додайте 2 краплі (100 μ l (мкл)), а до лунки планшету 1 краплю (50 μ l (мкл)) антиглобулінової сироватки і ретельно змішайте.
- 2.6. негайно центрифугуйте пробірку або планшет 1 min (хв) при 1500 г/min (об/хв).
- 2.7. М'яко похитуючи пробірку, відокремте осад від дна і визначте наявність аглютинації. При нечіткому результаті проінкубуйте пробірку або планшет 10-15 min (хв) при кімнатній температурі, після чого повторіть центрифугування 1 min (хв) при 1500 г/min (об/хв), знову м'яко похитуйте пробірку або планшет і визначте наявність аглютинації.

3. Другий етап. Проведення реакції конглоїтинації з желатином.

- 3.1. У круглодонну пробірку внесіть 1 краплю (50 μ l (мкл)) відмитих еритроцитів.
- 3.2. Додайте 1 краплю (50 μ l (мкл)) моноклонального реагенту анти-D Мікс.
- 3.3. Додайте 2 краплі 10% розчину желатину, попередньо підігрітого при 45-50°C до розрідження.
- 3.4. Суміш ретельно перемішайте та інкубуйте 10-15 min (хв) на водяній бані при 48°C або 30 min (хв) в термостаті.
- 3.5. Додайте в пробірку 5-6 ml (мл) ФР і після обережного перевертання пробірки візуально оцініть наявність аглютинатів у вигляді, як правило, декількох щільних грудочок або суспензії дрібних аглютинатів.

Оцінка результатів

Результат реакції може бути позитивним або негативним.

В пробірці при позитивному результаті еритроцити утворюють один або кілька грудочок (аглютинатів) на тлі просвітленої рідини. При негативному результаті - спостерігається гомогенна непрозора суспензія еритроцитів.

У планшеті при позитивному результаті еритроцити вистилають все дно лунки, при негативному - збираються на дні лунки у вигляді маленької чіткої точки.

Позитивний результат свідчить про наявність на еритроцитах D антигену. У сумнівних випадках вдаються до допомоги мікроскопа. Еритроцити зі слабким варіантом антигену D (DVI) можуть давати результат у вигляді дрібної аж до пилоподібної аглютинації.

Контроль якості

Для контролю специфічності і активності препаратів (незалежно від методики дослідження) до кожної серії досліджень необхідно включати стандартні D + і D- еритроцити, а в разі використання реакції конглоїтинації з желатином також проводити контроль еритроцитів з розчином желатину без моноклонального реагенту анти-D (контроль на ауто- і панаглютинацію еритроцитів).



УВАГА!

1. ТІЛЬКИ для in vitro діагностики.
2. ТІЛЬКИ для використання **професійним медичним персоналом**, що має відповідну кваліфікацію, необхідні здобуті знання та навички.
3. Дотримуйтеся вимог інструкції з використання під час використання реагенту.
4. Якщо ви не впевнені в результаті інтерпретації проведеного дослідження, зверніться по допомогу до більш досвідченої особи, що має відповідну кваліфікацію та досвід.

Вимоги безпеки та утилізації

1. Категорично забороняється піпетування ротом. Робота із зразками крові, що досліджуються моноклональними реагентами, потребує дотримання заходів безпеки, які передбачені для роботи з необстеженою кров'ю.
2. Використовувати засоби індивідуального захисту при роботі з моноклональними реагентами.
3. Знезараження та утилізація реагентів, сироваток, тестових слайдів чи скляних пластин проводити згідно з чинним законодавством

Умови зберігання, транспортування і експлуатації

1. Транспортування реагенту повинно проводитися всіма видами критого транспорту відповідно до вимог і правил, прийнятих на даному виді транспорту при температурі 2-8°C. Допускається транспортування при температурі до 25°C не більше 5 d (доб) і при температурі до 22°C не більше 10 d (доб).
2. Зберігання моноклонального реагенту повинно проводитися в темному місці при температурі 2-8°C протягом всього терміну придатності. Допускається зберігання при температурі до 25°C не більше 5 d (доб) і при температурі до 22°C не більше 10 d (доб).

3. Розкриті флакони з моноклональним реагентом можна використовувати протягом усього зазначеного терміну придатності при відсутності змін, що виникають у процесі використання реагенту- помутніння, утворення нерозчинного осаду, бактеріального забруднення. Під час використання реагентів запобігати потрапляння прямих сонячних променів.
4. Моноклональні реагенти не слід зберігати відкритими, бо при висиханні їх активність знижується.

Ознаки погіршення

Каламутність, осад можуть свідчити про погіршення якості реагентів або забруднення. Причинами погіршення можуть бути:

1. Недотримання умов використання, зберігання, транспортування.
2. Закінчення терміну придатності виробу.
3. Невідповідна температура навколишнього середовища.
4. Падіння або удар, що призвели до пошкодження первинної упаковки виробу.
5. Забруднення реагенту шляхом недотримання умов чистоти приміщення або необхідного устаткування.








Гарантії виробника

1. Виробник гарантує відповідність якості наборів вимогам ТУ при додержанні споживачем умов зберігання.
2. Гарантійний термін зберігання становить 24 mth (міс) з дня виготовлення набору.

Примітка: Якщо вам стало відомо про будь-який інцидент, що призвів до негативних наслідків, будь ласка, повідомте про це на електронну адресу або за номером телефону гарячої лінії.

Виробник: ТОВ «Лабораторія Гранум», Україна, 61001, м. Харків, вул. Франківська, 14,
тел/факс: (057) 752-32-31, електронна адреса: granumlab@gmail.com

Символи на продукції

 Виробник	 Виріб медичний для діагностики in vitro	 Берегти від сонячного світла
 Консультуйтеся з інструкцією із використання	 Температурне обмеження	
 Засторога. Зверніться до інструкції з використання для отримання інформації щодо застережень, попереджень, запобіжних заходів		
 Знак відповідності Технічним регламентам UA.TR.XXX Ідентифікаційний код ООВ		
Виготовлено: Дата виробництва Придатно до: Термін придатності Серія: Номер серії		