

Anti-D (IgM/IgG)

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ

Тестирование пробирочным методом, в пробирках типа DiaMed-ID, микропланшетным методом и методом на слайде.

Торговая форма

REF

Cont.

B05408 1x10 мл Anti-D (IgM/IgG), моноклональные

B08408 1x1000 мл Anti-D (IgM/IgG), моноклональные

Только для профессиональной диагностики

КРАТКОЕ ВВЕДЕНИЕ

Резус-фактор Системы групп крови был обнаружен в 1940 году. D антиген помимо своей роли в переливании крови, системы резус-фактора групп крови, в частности антиген D, является важной причиной гемолитической желтухи новорождённых или эритробластоза плода, для предотвращения этих заболеваний ключевым фактором является профилактика резус-конфликта. Риск резус-конфликта при беременности возникает у пар с резус-отрицательной матерью и резус-положительным отцом.

Anti-D	Фенотип	Кавказцы %	Афро-американцы %
+	Rh-positiv	85	72
0	Rh-negativ	15	28

Таб. 1 Частота каждого антигена в популяции.

ПРИНЦИП

Принцип действия реагента для определения резус-фактора основан на реакции геммагглютинации.

Реагенты вызывают прямую агглютинацию (слипание) тестовых эритроцитов, которые несут D антиген и косвенное агглютинацию тестируемых эритроцитов, которые содержат частичный вариант антигена D - D^{VI} в антиглобулиновой фазе тестирования. Если отсутствует агглютинация это обычно указывает на отсутствие D антигена (см ОГРАНИЧЕНИЯ).

РЕАГЕНТЫ

Dialab моноклональные анти-D (IgM / IgG) системы групп крови являются низкомолекулярным белком смешанным реагентом, содержащим человеческие моноклональные IgM и IgG anti-D, разбавленные в фосфатном буфере, содержащем хлорид натрия (0,9 г%), бычий альбумин (3 г%) и высокомолекулярные потенциаторы. При вводе образца пациента, этот реагент будет непосредственно агглютинировать с Rh D-положительными клетками, включая большинство вариантов (но не D^{VI}) и с большей долей слабого D (D^U) фенотипа при использовании рекомендуемых методов. Реагент поставляется в оптимальной форме разбавления для использования на образцах пациентов всеми рекомендуемыми методами, которые указаны ниже, и не требующие дополнительного разбавления. Номер лота и дату окончания срока действия см. этикетке флакона.

IgM/IgG	Клеточная линия/Клон
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

Таб.2 Используемые клеточные линии/клоны

СЛАБОВЫРАЖЕННЫЙ ANTI-D И ОБЩЕЕ ПОНЯТИЕ O D^U

Широко используется для описания эритроцитов, которые обладают ослабленным выражением D антигена, чем обычно. Термин - ослабленный D обозначает, что люди, у которых ослабленные значения антигена D объединяются (в лабораторной практике) в особую группу Du с частотой около одного процента. Реципиенты с содержанием антигена Du относятся к категории резус отрицательных. Им должна переливаться только кровь резус отрицательной группы, так как антиген D вызывает у этих людей иммунную реакцию. Доноры с содержанием антигена Du принадлежат к резус положительным, так как их кровь несовместима с кровью резус отрицательных реципиентов.

Dialab Anti-D (IgM / IgG) реагент обнаруживает большинство случаев с частичным и ослабленным D по прямой агглютинации, но не обнаруживает D^{VI} клетки. Этот реагент может обнаруживать D^{VI} и частичные D в фазе IAT.

ХРАНЕНИЕ

Не замораживать. Флаконы с реагентами следует хранить при температуре 2 - 8°C. Длительное хранение при температуре вне указанного диапазона может привести к ускоренной потере реакционной активности реагента.

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Могут исследоваться образцы крови как с антикоагулянтом (EDTA, CPDA, цитрат натрия), так и без антикоагулянта. Предпочтительно тестировать свежие образцы.

S:\pm\all\inserts_pm_dialab_word\blood grouping\anti-abab_TUEV-CE_engl_rev02.doc

Образцы с EDTA или цитратом должны быть протестированы в течение 48 часов. Образцы, собранные с ACD, CPD или CPDA-1 могут быть протестированы в течение 35 дней со дня забора крови. Все образцы крови следует промывать не менее двух раз до проведения тестирования. Образцы с высокой степенью гемолиза не использовать, т.к. можно получить не достоверные результаты. Если образцы не исследуются немедленно, их следует хранить при температуре 2...8°C.

РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1.) Рекомендуется использовать положительный (в идеале R₁ клетки) и отрицательный (в идеале rr клетки) контроли и реактив отрицательного контроля реактива параллельно с каждой тестируемой серией образцов. Испытания должны быть признаны недействительными, если контроли не показали ожидаемых результатов
- 2.) При работе с эритроцитами пациента важно, чтобы в реакцию был включен отрицательный контроль, так как высокомолекулярные потенциаторы реагента могут вызывать ложноположительные реакции с клетками, покрытых IgG, например в случаях AIHA или HDN.
- 3.) Тестируйте образцы для определения категории D^{VI} только непрямыми методами с использованием слайдов, микротитровальных планшетов или геля карт плохо обнаруживаются. Желательно, чтобы данные пробы были повторно проверены с использованием пробирочного метода.
- 4.) Образцы крови с слабовыраженным или частичным D, при тестировании методами с использованием слайдов, микротитровальных планшетов или геля карт плохо обнаруживаются. Желательно, чтобы данные пробы были повторно проверены с использованием пробирочного метода.
- 5.) Метод антиглобулинового теста может рассматриваться только в случае, если все негативные тесты реагируют положительно с IgG сенсibilизированными эритроцитами.
- 6.) По рекомендованной технологии один объем составляет около 50 мкл при условии использования пипетки флакона на 10мл.
- 7.) Работа с реагентами и интерпретация результатов должны проводиться специально обученным и квалифицированным персоналом в соответствии с требованиями той страны, в которой реагенты в используются.
- 8.) Пользователь должен определить пригодность данных реагентов для использования другими методами.

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- Anti-human глобулиновый реагент или Анти-IgG
- Палочки для перемешивания
- Автоматический считыватель (reader) пластины
- Промыватель клеток (washer) для метода по Кумбсу
- DiaMed ID-карты (LISS / Кумбс)
- DiaMed ID-карты (Обычные)
- DiaMed ID-центрифуга
- DiaMed ID-разбавитель: например ID-Cellstab
- DiaMed ID-инкубатор с температурой до 37°C ± 2 °C
- Предметные стекла для микроскопа
- Пробирки стеклянные (10 x 75 мм или 12 x 75 мм)
- IgG сенсibilизированные эритроциты
- Микропланшетная центрифуга
- Орто BioVue Системные Кассеты (CГ / Кумбс)
- Орто BioVue Системные Кассеты (Обычные)
- Орто BioVue системная Центрифуга
- Орто BioVue системный нагревательный блок с температурой до 37°C ± 2 °C
- Орто 0,8% Red Cell Разбавитель
- Микроплащечный шейкер
- Забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS): NaCl 0,9%, pH 7,0 ± 0,2 при 22 °C ± 1 °C
- Положительный (в идеале группа R₁) и отрицательный (группа rr) контрольные эритроциты.
- Центрифужные пробирки.
- Планшеты с «U»образным дном
- Пипетки с переменным объемом.
- Водяная баня или инкубатор с температурой до 37°C ± 2 °C

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

A. Метод в пробирке:

1. Приготовьте 2-3% суспензию отмытых физиологическим раствором эритроцитов
2. Поместите в маркированную пробирку: 1 объем Dialab Anti-D (IgM / IgG) реагента и 1 объем тестируемой эритроцитарной клеточной суспензии (1:1)
3. Тщательно перемешайте и центрифугируйте все пробирки в течение 20 секунд при 1000 оборотах или с альтернативной силой и временем.
4. Аккуратно возьмите каплю эритроцитарной суспензии и микроскопически оцените наличие агглютинации.
5. Пробирки, которые показывают отрицательный или сомнительный результат, (который может быть интерпретирован как D^U или слабый D), необходимо инкубировать в течение 15 минут при комнатной температуре.
6. После инкубации, повторите шаги 4 и 5.

B. DiaMed-ID микрометод

1. Подготовьте 0,8% суспензию отмытых эритроцитов в ID-разбавителе.
2. В необходимом количестве микропробирок удалите фольгу по мере необходимости.
3. В соответствующую микропробирку: внести 50 мкл тестируемой клеточной суспензии и 25 мкл Dialab Anti-D (IgM / IgG) реагента.
4. Центрифугируйте DiaMedgel карты в центрифуге.
5. Считайте микроскопически наличие агглютинации.

C. Ortho BioVue метод

1. Подготовьте 0,8% суспензию отмытых эритроцитов в 0,8% Ortho Red Cell дилуенте

- Удалите алюминиевую фольгу из реакционных камер по мере необходимости.
- Внесите в соответствующую реакционную камеру: 50 мкл суспензии тестируемых эритроцитов и 40 мкл Dialab ANTI-D (IgM/IgG) реагента.
- Центрифугируйте кассету (ы) в Орто BioVue центрифуге.
- Считайте микроскопически наличие агглютинации.

D. Метод тестирования в микропланте с "U" ячейками

- Приготовьте 2-3% суспензию отмытых эритроцитов физиологическим раствором.
- В каждую ячейку микропланшета внести соответственно: 1 объем Dialab Анти-D (IgM / IgG) реагента и 1 объем суспензии эритроцитов (1:1).
- Тщательно перемешайте, желательно с использованием шейкера, во избежание cross- контаминации.
- Инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут.
- Центрифугируйте микропланшет в течение 1 минуты при 140 оборотах или с подходящей альтернативой времени и силы.
- Осторожно ресуспендируйте сгустки клеток используя микропланшетный шейкер с программным управлением
- Считайте микроскопически наличие агглютинации или с подтверждением автоматического считывателя.
- Любые слабые реакции следует повторить с помощью пробирочного метода 1.

E. Метод тестирования на слайде

- Приготовьте 35-45 %-ную суспензию тестируемых эритроцитов в сыворотке, плазме или физиологическом растворе.
- Нанесите на маркированное стекло: 1 объем ДИАЛАБ Анти-D (IgM / IgG)реагента и 1 объем тестируемой клеточной суспензии (1:1).
- Используйте чистый аппликатор, смешайте реагент и клетки на площади 20x40мм.
- Медленно наклоняя, скользящими движениями назад и вперед покачивайте стекло в течение 30 секунд, общее время перемешивания составляет 2 минуты, сохраняя слайд при комнатной температуре.
- Считайте микроскопически через 2 минуты над рассеянным светом агглютинацию, не путая фибриновые волокна с агглютинацией .
- Любые слабые реакции должны быть повторены пробирочным методом 1.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Положительный результат:** агглютинация испытуемых эритроцитов является показателем положительного результата теста, и с учетом ограничений, принятых (описанных) в процедуре, свидетельствует о наличии D антигена на тестируемых эритроцитах.
- Отрицательный результат:** Отсутствие агглютинации исследуемых эритроцитов является показателем отрицательного результата теста, с учетом ограничений, принятых (описанных) в процедуре и указывает на отсутствие D антигена на испытуемых эритроцитах.
- Результаты исследований, где элементы, агглютинируются при использовании реагента отрицательного контроля должны быть исключены, так как агглютинация, скорее всего, обусловлена эффектом макромолекулярных усилителей реагента на сенсибилизированных клетках.

СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

- Считайте все результаты в пробирке и на микропланшете сразу после центрифугирования.
- Выполните этапы промывания без перерыва, центрифугируйте и считывайте результаты сразу после добавления анти-человеческого глобулина, поскольку задержка может привести к диссоциации комплексов антиген-антитело, что приведет к ложноотрицательным или слабо положительным реакциям
- Слайд тесты должны быть интерпретированы в течение двух минут, чтобы обеспечить специфичность и во избежание возможности получения неправильного результата, который может быть интерпретирован как положительный в следствие высыхания реагента.
- Следует проявлять осторожность в интерпретации результатов тестирования проведенных в других температурных режимах, отличных от рекомендованных.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Реагент Dialab Anti-D (IgM / IgG) не подходит для работы с клетками, которые были подвергнуты обработке ферментом, или клетки, которые были суспендированы в LISS.
- Длительно хранящиеся образцы крови могут дать более слабые реакции, чем свежие образцы.
- Ложное срабатывание агглютинации может рассматриваться при тестировании IgG сенсибилизированных клеток.
- Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут также возникнуть из-за:
 - Загрязнения испытуемого материала
 - Неправильного хранения, неправильной концентрации клеток, времени инкубации или температуры
 - Неправильного или чрезмерного центрифугирования
 - Отклонения от рекомендуемых методов.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

- Описание всех реагентов и процедур указано в разделе РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
- Перед выпуском, каждая партия Dialab реагентов анти-D (IgM / IgG) проходят проверку соответствующими РЕКОМЕНДУЕМЫМИ ТЕХНОЛОГИЯМИ против панели антиген-положительных эритроцитов, чтобы обеспечить подходящую реакционную способность.
- Реагенты группы Anti-D для D сгруппированных пациентов не должны реагировать с D⁺ клетками, при использовании рекомендуемых методов.

Последующие исследования для отрицательных результатов с использованием процедуры Антиглобулинового теста не рекомендуется.

- Специфичность исходных моноклональных антител продемонстрирована с использованием панели антиген-негативных клеток.
- Активность реагентов была протестирована против ниже приведенных референсных стандартов (эталонов) с минимальной активностью, полученных из Национального института биологических стандартов и контроля (NIBSC):
- Анти-D эталон 99/836
- Контроль качества реагентов проводили с использованием эритроцитов, которые были дважды промыты физиологическим раствором перед использованием.
- Производство реагентов производится в соответствии с рекомендациями, содержащимися в последнем выпуске Guidelines for the UK Blood Transfusions Services

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

- Пользователь несет ответственность за выполнение теста любыми другими способами, кроме тех, которые упомянуты в РЕКОМЕНДУЕМЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ.
- Любые отклонения от РЕКОМЕНДУЕМЫХ ТЕХНОЛОГИЙ должны быть проверены перед использованием.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Реагенты предназначены только для in vitro диагностики.
- Если флакон с реагентом имеет трещины или протечки, содержимое немедленно нужно утилизировать.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности (см этикетку флакона)
- Не используйте реагенты, если во флаконе присутствует осадок.
- При работе с реагентами необходимо иметь защитную одежду (лабораторный халат) и одноразовые перчатки.
- Для снижения био-нагрузки реагенты были пропущены через фильтры, поры которых составляли 0,2 мкм. После вскрытия флакона, реагент стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке, если нет заметного помутнения, которое может указывать на порчу реагентов или загрязнение.
- Реагенты содержат <0,1% азид натрия. Азид натрия может быть токсичным при контаминации и может реагировать со свинцом и медью, образуя взрывоопасные азиды металлов. В случае разлива смыть большими объемами воды.
- Материалы, используемые для изготовления реагента, были испытаны на наличие антител к ВИЧ 1 + 2 и антител к вирусу гепатита В и признаны отрицательными.
- Ни один из известных тестов не может гарантировать, что продукты, полученные из человеческих или животных источников, не являются инфицированными. Необходимо соблюдать осторожность в использовании каждого флакона и его содержимого.





УТИЛИЗАЦИЯ РЕАГЕНТОВ

Для получения информации об утилизации и обеззараживании реагента смотрите сайт **Material Safety Data Sheets**, доступный по запросу

ЛИТЕРАТУРА

- Kholer G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256, 495-497.
- Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6th Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987; Chapter 7.
- Tippett P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. Medical. Laboratory Science 1988; 45, 88-93.
- Thompson KM, Hughes-Jones NC. Production and characteristics of monoclonal anti-Rh. Bailliere's Clinical Haematology 1990; April
- Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. Transfusion Medicine 1995, 5, 171-184
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
- British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 1995, 5, 145-150.

TABLE OF SYMBOLS

LOT	IVD	REF	CONT.
Batch Number	In-vitro Diagnostic	Reference Nr.	Content
 Expiry Date	 Store At	 Manufacturer	 Read Pack Insert

