

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от «11» июля 2007 г.
№ ФСР 2007/00345

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ФЕМИДАСЕРА®

**Сывороток анти-А и анти-В адсорбированных диагностических,
полученных иммунизацией животных слюной человека, для судебно-медицинских целей
(Сыворотки анти-А и анти-В слюнные), раствор для диагностических целей**

Состав. Действующее начало обеих сывороток - иммунные гемагглютинины анти-А и анти-В соответственно, вступающие в реакцию гемагглютинации с антигенами А и В системы АВО крови человека.

Назначение. Выявление антигенов А и В в жидкой крови, пятнах крови и слюны человека.

Описание. Сыворотка представляет собой прозрачную или слабо опалесцирующую жидкость от светло-желтого до красновато-бурого цвета, допускается наличие мутности, устраняемой центрифугированием в течение (30 ± 1) мин при 3000 об/мин.

Фармакотерапевтическая группа. МИБП диагностические препараты.

Код АТХ. V04.

Способ применения.

Специфическая активность. Включает в себя гемагглютинирующую активность, титр и авидность.

Гемагглютинирующая активность. Сыворотка анти-А слюнная должна агглютинировать эритроциты группы A_1 в течение 15 сек, группы A_2 – в течении 20 сек с образованием агглютината, четко различимого невооруженным взглядом. Сыворотка анти-В слюнная должна агглютинировать эритроциты группы В в течении 15 сек с образованием агглютината, четко различимого невооруженным взглядом.

Титр сывороток анти-А и анти-В слюнных должен быть не ниже 1:64 при определении на плоскости и не ниже 1:128 при определении пробирочным методом.

Авидность. Сыворотки анти-А и анти-В слюнные должны быть авидны к гомологичному антигену крови и слюны в пятнах на марле и иметь следующие показатели авидности в реакции адсорбции агглютининов (РАА)

Сыворотка анти-А слюнная с пятнами крови и слюны группы A_1 должна давать не менее 4 ступеней поглощения, причем с половиной образцов не менее 5 ступеней, с пятнами крови и слюны группы A_1B – не менее 3 ступеней поглощения.

Сыворотка анти-В слюнная с пятнами крови и слюны группы $B(Se)$ должна давать не менее 4 ступеней поглощения, причем с половиной образцов не менее 5 ступеней, с пятнами крови и слюны группы A_1B – не менее 3 ступеней поглощения.

Сыворотки анти-А и анти-В слюнные в РАА не должны давать ни одной ступени поглощения с образцами марли-носителя, пятнами крови и слюны группы О, с пятнами крови с слюны группы В для сыворотки анти-А слюнной и группы А для сыворотки анти-В слюнной. Гемагглютинирующую активность, титр и специфичность сывороток анти-А и анти-В слюнных определяют в реакции гемагглютинации (РГА).

Методика определения гемагглютинирующей активности

В качестве антигена используют осадок эритроцитов, однократно отмытых натрия хлорида раствором 0,9 % (ГОСТ 4233-77, х.ч.). На фарфоровую плоскость (тарелку) наносят 200 мкл сыворотки и 10 мкл осадка гомологичных эритроцитов, затем смешивают стеклянной палочкой. Плоскость постоянно покачивают и отмечают по секундомеру время появления агглютинации. Учет результатов реакции проводят невооруженным глазом при ярком электрическом освещении.

Для контроля на плоскость наносят 200 мкл натрия хлорида раствора 0,9% и 10 мкл осадка эритроцитов. В контроле эритроциты не должны агглютинироваться в течение 5 мин. Учет результатов проводят при помощи 7 кратной лупы при ярком электрическом освещении.

Для проверки гемагглютинирующей активности, титра, специфичности и авидности сывороток используют эритроциты стандартных микродоноров

Подбор стандартных микродоноров.

Кровь микродонора берут из пальца в пробирку (ГОСТ 25336-82Е) с 10 мл натрия хлорида раствора 0,9%, центрифугируют (5 ± 1) мин. при 1000 об./мин. $g=250$ для получения осадка эритроцитов. Далее проводят РГА. Если эритроциты агглютинируются сывороткой анти-А и не агглютинируются сывороткой анти-В – они относятся к группе А. Если эритроциты агглютинируются сывороткой анти-В и не агглютинируются сывороткой анти-А – они относятся к группе В. Если эритроциты агглютинируются сыворотками анти-А и анти-В – они относятся к группе АВ. Эритроциты, которые не агглютинируются ни сывороткой анти-А, ни сывороткой анти-В относятся к группе О.

В образцах крови группы А можно определить степень выраженности антигена А. Для этого сыворотку анти-А слюнную титруют эритроцитами испытуемого образца и параллельно тест-эритроцитами подгрупп А₁ и А₂.

Методика определения титра

Сыворотку разводят натрия хлорида раствором 0,9% в 2, 4, 8 и т.д. раз до разведения, превышающего на одну ступень титр, указанный на этикетке.

Для этого в каждую пробирку помещают по 200 мкл натрия хлорида раствора 0,9%, затем в первую пробирку добавляют 200 мкл исследуемой сыворотки, жидкости смешивают и переносят последовательно по 200 мкл в каждую пробирку до последнего разведения.

По 200 мкл каждого разведения переносят на плоскость, добавляют к каждому разведению по 10 мкл однократно отмытых натрия хлорида раствором 0,9 % эритроцитов группы А для сыворотки анти-А слюнной и группы В для сыворотки анти-В слюнной, перемешивают. Плоскость непрерывно покачивают и результат учитывают через 5 мин. при помощи 7-кратной лупы при ярком электрическом освещении.

Титром сыворотки считают последнее разведение, которое обуславливает агглютинацию не менее, чем 2 плюса.

Методика определения титра пробирочным методом.

Сыворотки разводят в агглютинационных пробирках натрия хлорида раствором 0,9% в 2, 4, 8, 16 и т.д. раз до разведения, превышающего на одну ступень титр, указанный на этикетке. Для этого во все пробирки помещают по 3 капли натрия хлорида раствора 0,9%. Этой же пипеткой в первую пробирку добавляют 3 капли сыворотки, жидкости смешивают и переносят последовательно по 3 капли в каждую пробирку до последнего разведения. Из последней пробирки 3 капли удаляют. В каждую пробирку добавляют по 1 капле 2% взвеси однократно отмытых натрия хлорида раствором 0,9% эритроцитов стандартных микродоноров (для сыворотки анти-А слюнной – группы А, для сыворотки анти-В слюнной – группы В). Пробирки центрифугируют (5 ± 1) мин при 1500 мин $g=350$. После центрифугирования пробирки встряхивают и учитывают результат макро- и микроскопически на предметном стекле под покровным (окуляр 10^x, объектив 9^x).

Титром сыворотки считают последнее разведение, которое обуславливает агглютинацию эритроцитов, оцениваемую не менее, чем 1 плюс при учете реакции под микроскопом.

Методика определения специфичности на плоскости

На фарфоровую плоскость (тарелку) наносят 2 капли по 200 мкл сыворотки анти-А слюнной, к одной капле добавляют 10 мкл осадка однократно отмытых натрия хлорида раствором 0,9% эритроцитов группы В, к другой – 10 мкл осадка эритроцитов группы О, перемешивают стеклянной палочкой. Плоскость постоянно покачивают в течение 5 мин. Отсутствие агглютинации к указанному сроку в обеих каплях свидетельствует о специфичности сыворотки анти-А слюнной. Результаты учитывают при помощи 7-кратной лупы при ярком электрическом освещении.

Определение специфичности сыворотки анти-В слюнной проводят аналогично, только в качестве антигена используют эритроциты групп А и О.

Методика определения специфичности пробирочным методом

В 2 пробирки помещают по 3 капли сыворотки анти-А слюнной. В одну из них добавляют 1 каплю 2% взвеси однократно отмытых натрия хлорида раствором 0,9% эритроцитов группы В, в другую – 1 каплю 2% взвеси однократно отмытых натрия хлорида раствором 0,9% эритроцитов группы О. Пробирки центрифугируют в течении (5±1) мин при 1500 об/мин $g=350$. Пробирки встряхивают, результат учитывают при помощи микроскопа (окуляр 10^x, объектив 9^x).

Определение специфичности сыворотки анти-В слюнной, а также учет результатов реакции проводят аналогично, только в качестве антигена используют осадок однократно отмытых натрия хлорида раствором 0,9% эритроцитов групп А и О.

Методика определения авидности.

Контроль сывороток анти-А и анти-В слюнных на авидность проводят в реакции адсорбции агглютининов в количественной модификации (РАА).

Количество образцов пятен крови и слюны не менее 9 каждого. Для сыворотки анти-А слюнной количество пятен крови по группам: А₁- 4, А₁В – 2, В – 2, О – 1; количество пятен слюны по группам: А₁Se – 3, А₁se – 1, А₁BSe- 2, OSe – 1, BSe – 2. Для сыворотки анти-В слюнной количество пятен крови по группам: В – 4, А₁В – 1, А₂В – 1, А – 2, О – 1; количество пятен слюны по группам: BSe – 3, Bse – 1, А₁BSe – 2, А₁Se – 1, OSe – 2.

Исследуемую сыворотку разводят натрия хлорида раствором 0,9 % до титра 1:32. Материал из каждого пятна, а также из контрольного образца марли-носителя измельчают ножницами и приготавливают навески по 50 мг. Навески помещают в пробирки, в каждую добавляют по 0,3 мл исследуемой сыворотки, тщательно перемешивают, закрывают пробками и оставляют на 20-22 ч при температуре от 2 до 8 °С. Затем сыворотку отсасывают, переносят в другие пробирки, центрифугируют в течение 15 мин при 1500 об/мин, $g=350$ и готовят разведения кратные 2 до титра 1:64(см. раздел «Методика определения титра»).

По 200 мкл каждого разведения, начиная с наибольшего, переносят на плоскость, добавляют по 10 мкл однократно отмытых натрия хлорида раствором 0,9% стандартных эритроцитов гомологичной группы, перемешивают. Плоскость непрерывно покачивают, результат учитывают через 5 мин. при помощи 7-кратной лупы при ярком электрическом освещении.

Таким же образом титруют исходную сыворотку, не находившуюся в контакте с образцами крови (слюны) на марле.

Титры сывороток, адсорбированных кровью или слюной, сравнивают с титром исходной сыворотки. Результат реакции выражают в степенях поглощения. Степенью поглощения считают снижение титра адсорбированной кровью (слюной) сыворотки на одно разведение по сравнению с титром исходной сыворотки.

Выраженность агглютинации на плоскости при определении гемагглютинирующей активности, титра, специфичности и авидности сыворотки регистрируют по системе четырех плюсов:

- 4 плюса - крупнолепестковая агглютинация, четко различимая невооруженным глазом;
- 3 плюса - пескообразная агглютинация, четко различимая невооруженным глазом;
- 2 плюса - агглютинация, четко различимая с помощью 7-кратной лупы;
- 1 плюс – агглютинация, слабо различимая с помощью 7-кратной лупы;
- минус - отсутствие агглютинации.

Методика определения антигенов А и В в пятнах крови (РАЭ)

Титр сывороток должен быть не ниже 1:128. 3 ниточки по 5-6 мм, взятые из разных мест каждого пятна, помещают в короткие круглодонные пробирки, добавляют 0,08 мл сыворотки, закрывают ватными пробками и оставляют на 20-22 ч при температуре от 2 до 8 °С. Затем ниточки отмывают 6 раз охлажденным натрия хлорида раствором 0,9%, переносят в чистые пробирки, добавляют по 3 капли 0,5% взвеси стандартных эритроцитов гомологичной группы и помещают в термостат при температуре (50-55) °С на (25±1) мин и далее на 1 ч при температуре (20-22) °С. Пробирки центрифугируют в течение (5±1) мин при 1500 об/мин, энергично встряхивают и учитывают результаты реакции под микроскопом (окуляр 10^x, объектив 9^x) на предметном стекле под покровным.

Методика определения антигенов А и В в пятнах слюны (РАЭ)

Титр сыворотки должен быть не ниже 1:128. Кусочки исследуемых пятен помещают в химические стаканчики и заливают 50 мл кипящей очищенной воды с рН 7,4 на 10 мин., затем объекты извлекают и подсушивают на фильтровальной бумаге. Из каждого объекта берут по 3 ниточки длиной 5-6 см и дальнейшее исследование, а также учет результатов реакции проводят так, как описано в разделе «Методика определения антигенов в пятнах крови (РАЭ)»

Форма выпуска. По 1,0 мл сыворотки в ампуле. По 1, 2, 3 или 5 ампул в контурной упаковке или по 5 или 10 ампул вместе с инструкцией по применению и скарификатором ампульным в коробку или пачку из картона. При упаковке ампул с насечками, кольцами и точками излома скарификаторы ампульные не вкладывают.

Условия хранения и транспортирования. Сыворотки хранят в соответствии с СПЗ.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С в сухом месте.

Транспортирование осуществляют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности. 1 год. Препарат с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Рекламации направлять в адрес предприятия - изготовителя: Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства (198320. Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52, тел.: (812) 741-10-58. факс: (812) 741-28-95, www.spbniiivs.ru).