Утверждена руководителем Департамента Государственного контроля лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники Минздрава РФ 25 марта 2003г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора диагностических моноклональных антител для выявления антигенов систем ABO(H), MNSs в крови и слюне в судебно-медицинской практике

(ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН СМ)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН СМ» предназначен для выявления антигенов H, A и B системы ABO(H), и M и N системы MNSs в крови и слюне человека с помощью методов прямой агглютинации и ингибирования реакции агглютинации.

Набор предназначен для проведения 50 определений каждого антигена при расходе 0,1 мл соответствующего Цоликлона на один анализ. Цоликлоны СМ могут использоваться как в наборе, так и по отдельности.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В основе работы набора лежит реакция прямой агглютинации эритроцитов соответствующими Цоликлонами СМ на плоскости, в пробирках или в 96-луночном планшете для иммунологических реакций и реакция ингибирования агглютинации в 96-луночном планшете для иммунологических реакций. Результаты реакции учитываются невооруженным глазом.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят:

- Цоликлон СМ анти-A - 1 флакон (5,0 мл);
- Цоликлон СМ анти-B -1 флакон (5,0 мл);
- Цоликлон СМ анти-M -1 флакон (5,0 мл);
- Цоликлон СМ анти-$H_{аб}$ - 1 флакон (5,0 мл);
- Цоликлон СМ анти-$H_{кра}$ - 1 флакон (5,0 мл).
- Цоликлон СМ анти-A_1 - 1 флакон (5,0 мл);
- Цоликлон СМ анти-$A_{сл}$ -1 флакон (5,0 мл);
- Цоликлон СМ анти-N - 1 флакон (5,0 мл);
- Цоликлон СМ анти-$H_{н/аб}$ - 1 флакон (5,0 мл);

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Цоликлоны СМ строго специфичны.

Цоликлон анти-А выявляет антигены A_1 и A_2. Цоликлон анти-A_1 выявляет только антиген A_1, а Цоликлон анти-$A_{сл}$ помимо антигенов A_1 и A_2 выявляет более слабые варианты антигена А - A_3, A_x. Применение этих трех Цоликлонов позволяет дифференцировать варианты антигена А. Цоликлон анти-В выявляет антиген В и его слабые варианты.

Цоликлоны анти-$H_{аб}$ и анти-$H_{кра}$ выявляют антиген Н на эритроцитах и в слюне, Цоликлон анти-$H_{н/аб}$ выявляет антиген Н только на эритроцитах; при этом степень выраженности агглютинации этих Цоликлонов с эритроцитами убывает в ряду фенотипов $O(I)>A_2(II)>B(III)>A_1(II)>A_2B(IV)>A_1B(IV)$. Цоликлон анти-$H_{аб}$ одинаково реагирует с эритроцитами всех групп.

Цоликлон анти-$H_{кра}$ выявляет антиген Н в слюне с помощью реакции ингибирования агглютинации (количественной реакции абсорбции).

Цоликлоны анти-М и анти-N выявляют соответствующие антигены эритроцитов в реакции агглютинации, причем степень выраженности агглютинации снижена в гетерозиготных образцах (MN) по сравнению с гомозиготными (MM и NN).

Воспроизводимость результатов составляет 100%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Меры предосторожности – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови и слюны человека следует рассматривать, как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита и других вирусных инфекций.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- микроскоп инвертированный;
- пластина плоская белая для агглютинации;
- планшет 96-луночный круглодонный для иммунологических реакций;
- секундомер;
- палочки стеклянные;
- пробирки центрифужные вместимостью 5 и 10 мл;
- пробирки круглодонные вместимостью 2,0 – 5,0 мл;
- пипетки вместимостью 5,0 мл или 10 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,01; 0,05 и 0,1 мл;
- термостат, поддерживающий температуру +37-+52°С;
- центрифуга настольная на 1000-3000 об/мин;
- 0,9% раствор хлористого натрия (физиологический раствор);
- перчатки резиновые или пластиковые;
- эритроциты стандартные групп O(I), A_1(II), A_2(II), B(III) фенотипов MM и NN;
- слюна доноров-выделителей групп O(I), A(II), B(III).

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Цельная кровь, взятая без консерванта; кровь, взятая с консервантом; отмытые и неотмытые эритроциты, слюна.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

Реагенты готовы к использованию.

Определение антигенов А (и его вариантов), В, М, N и Н в эритроцитах производится с помощью Цоликлонов СМ с использованием метода реакции агглютинации на плоскости, в пробирках, в микроплате. Определение антигенов А, В и Н в слюне производится с помощью реакции ингибирования агглютинации.

Реакция агглютинации на плоскости. На пластину для агглютинации нанести каплю (около 0,1 мл) соответствующего Цоликлона и каплю (около 0,02 мл) исследуемой крови или эритроцитов и перемешать с помощью стеклянной палочки. Четко выраженная агглютинация наступает через 30-60 сек после смешивания ингредиентов при покачивании пластины. Результаты реакции следует учитывать визуально по истечении 3 мин.

Результат считается положительным, если наблюдается агглютинация (склеивание) эритроцитов. Результат считается отрицательным, если суспензия осталась гомогенной и агглютинаты визуально не обнаруживаются.

Реакция агглютинации в пробирках. Приготовить из отмытых исследуемых эритроцитов 3% суспензию в 0,9% растворе хлористого натрия.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внести в круглодонную пробирку вместимостью 2,0-5,0 мл 0,1 мл соответствующего Цоликлона СМ и 0,05 мл 3 % суспензии исследуемых эритроцитов. Содержимое пробирки перемешать встряхиванием и центрифугировать при 1000-1500 об/мин при комнатной температуре (+18-25°С) в течение 30 сек. Затем осторожным встряхиванием отделить осадок ото дна и оценить результат реакции визуально по наличию или отсутствию агглютинатов. При отрицательном результате осадок эритроцитов разбивается и образует гомогенную непрозрачную суспензию, при положительном он остается в виде одного или нескольких крупных агглютинатов на фоне прозрачной жидкости.

При проведении реакции агглютинации как на плоскости, так и в пробирках для контроля агглютинирующей активности используемого Цоликлона СМ в каждом исследовании необходимо использовать стандартные эритроциты, несущие соответствующий антиген (положительные эритроциты), а для контроля специфичности необходимо применять стандартные эритроциты, не несущие соответствующий антиген (отрицательные эритроциты). Результаты учитывают только в случае правильной реакции соответствующего Цоликлона СМ со стандартными эритроцитами.

Реакция агглютинации в микроплате. В три лунки 96-луночного планшета внести по 0,05мл Цоликлона СМ нужной специфичности, затем в первую лунку добавить 0,05мл 3% взвеси исследуемых эритроцитов в 0,9% растворе хлористого натрия, во вторую - 0,05мл 3% взвеси стандартных положительных эритроцитов, а в третью – 0,05мл 3% взвеси стандартных отрицательных эритроцитов (положительный и отрицательный контроли), и инкубировать при комнатной температуре в течение 40-60 мин. После завершения инкубации визуально оценить реакцию агглютинации по рисунку осадка эритроцитов на дне лунки. При отрицательном результате осадок эритроцитов представляет собой четко очерченный, равномерно окрашенный круг небольшого диаметра. При положительном результате осадок имеет большой диаметр, занимая все дно лунки, края осадка неровные, иногда завернуты внутрь.

Реакция ингибирования агглютинации. Развести в пробирке соответствующие Цоликлоны 0,9% раствором хлористого натрия в 20 раз. Внести в первую лунку первого ряда и в первую лунку второго ряда 96-луночного планшета по 0,05 мл соответствующего разведенного Цоликлона СМ. В первую лунку первого ряда добавить 0,05 мл 0,9% раствора хлористого натрия (контроль). В первую лунку второго ряда добавить 0,05 мл слюны, разведенной 1:10 0,9% раствором хлористого натрия. Инкубировать планшет в течение 45-60 мин при температуре +37°С. После завершения инкубации в обоих рядах приготовить серии двукратных разведений, для чего внести в следующие 11 лунок этих рядов по 0,05 мл 0,9% раствора хлористого натрия. Затем 0,05 мл Цоликлона СМ из первой лунки перенести во вторую лунку ряда, хорошо перемешать и перенести 0,05 мл смеси в следующую лунку, перемешать и перенести 0,05 мл смеси в следующую лунку и т.д. до конца ряда. То же проделать во втором ряду. Затем в оба ряда разведений Цоликлона анти-А внести по 0,05 мл 3% взвеси эритроцитов группы А(II) , в оба ряда разведений Цоликлона СМ анти-В – по 0,05 мл 3% взвеси эритроцитов группы В(III), в оба ряда разведений Цоликлона СМ анти-$Н_{кра}$ – по 0,05 мл 3 % взвеси эритроцитов группы 0(I). Планшеты инкубировать в течение 45-60 мин при комнатной температуре (+18-25°С) и учесть результаты реакции под инвертированным микроскопом. Отсутствие агглютинации или снижение титра Цоликлона СМ не менее, чем на 2 разведения в ряду со слюной по сравнению с результатами в ряду без слюны (контрольном) означает ингибирование реакции агглютинации исследуемой слюной, то есть наличие в ней искомого антигена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Положительная реакция агглютинации Цоликлона СМ с исследуемыми эритроцитами на плоскости, в пробирках или микроплате означает наличие в них соответствующего антигена. Трудности в интерпретации результатов возникают при желании дифференцировать варианты антигена А. Чтобы дифференцировать варианты антигена А – $А_1$, $А_2$, $А_3$, ...$А_x$, необходимо вначале исследовать эритроциты с Цоликлоном анти-$А_{сл}$; положительная реакция агглютинации исследуемых эритроцитов с Цоликлоном анти-$А_{сл}$ свидетельствует о наличии антигена А. Далее эти эритроциты исследуют с помощью Цоликлонов анти-А и анти-$А_1$. При положительном результате с Цоликлонами анти-А и анти-$А_1$ эритроциты принадлежат к варианту $А_1$. При положительном результате с Цоликлоном анти-А и отрицательном с анти-$А_1$ они принадлежат к варианту $А_2$. При отрицательной реакции с Цоликлонами анти-А и анти- $А_1$ и положительной реакции с анти-$А_{сл}$ эритроциты принадлежат к более слабой, чем $А_2$ подгруппе ($А_3$...$А_x$).

Возможные результаты реакции агглютинации исследуемых эритроцитов с Цоликлонами СМ анти-А, анти-$А_1$ и анти-$А_{сл}$ и их интерпретация представлены в таблице.

ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОНЫ	Варианты антигена А			
	$А_1$	$А_2$	$А_3$	$А_x$
Анти-А	▓	▒		
Анти-$А_1$	▓			
Анти-$А_{сл}$	▓	▒	▒	▒

Примечания: ▓ - сильная агглютинация (++++);

▒ - вариабельная агглютинация (++/++++);

▫ - слабая агглютинация (++/+);

□ - отсутствие агглютинации.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Хранение набора должно производиться в упаковке предприятия-изготовителя в темном месте при температуре +(2-8)°С в течение всего срока годности набора. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 дней.

Срок годности набора – 1 год.

Вскрытые флаконы можно хранить в темном месте при температуре +2-8°С не более 1 мес.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества Набора ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН СМ, следует обращаться на предприятие-изготовитель ООО «ГЕМАТОЛОГ» по адресу: 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, д.4, стр. 1,

Тел.: 8-800-777-07-72, (495) 504-90-98

e.mail: hematologltd@yandex.ru. **Internet: www.gematolog.com**

ТУ 9398-271-27575295-2003. **Рег.уд. № ФСР 2008/02421**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru