АНТИ-D (IgG/IgM), МОНОКЛОНАЛЬНИЙ РЕАГЕНТ

Anti-D (IgG/IgM), monoclonal

Кат. №: ***LUA-BG.4O8*** *Дата випуску інструкції:* ***2022-07-11***
Версія ***1***

Кат. №	Вміст
LUA-BG.4O8	1 x 10 мл (ml) анти-D (IgM/IgG), моноклональний

Тільки для професійного використання в діагностиці in vitro

ПРИЗНАЧЕННЯ

Реагент Анти-D – це реагент для визначення групи крові, призначений для якісного визначення наявності або відсутності антигену резус-фактору D на еритроцитах донорів крові або пацієнтів, які потребують переливання крові, під час тестування відповідно до рекомендованих методів, зазначених у цій Інструкції, а також відповідно до «Інструкції з визначення резус-належності крові», затвердженої наказом Міністерства охорони здоров'я України від 05.07.1999 р. № 164.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Реагенти, що містять антитіла до антигену D на еритроцитах людини, викличуть пряму аглютинацію (злипання) еритроцитів людини, які несуть антиген D, і непряму аглютинацію еритроцитів людини категорії D^{VI} на антиглобуліновій фазі тестування. Відсутність аглютинації (немає злипання) зазвичай свідчить про відсутність антигену D на еритроцитах людини.

СКЛАД РЕАГЕНТУ

Реагент анти-D (IgM/IgG), моноклональний для визначення груп крові - це змішаний реагент з низьким вмістом білка, що містить людський моноклональний IgM і IgG анти-D, розведений у фосфатному буфері, що містить хлорид натрію (0.9 г% (g%)), бичачий альбумін (2.0 г% (g%)) та макромолекулярні потенціатори (1.5 г% (g%)). Під час додавання зразків пацієнта цей реагент безпосередньо аглютинує Rh-D-позитивні клітини, включаючи більшість варіантів (але не D^{VI}) і значну частку слабких фенотипів D (D^{u}) при використанні рекомендованих методів. Реагенти не містять і не складаються з канцерогенних, мутагенних чи репротоксичних речовин, котрі здатні порушувати роботу ендокринної системи, або які можуть призвести до сенсибілізації чи алергічної реакції у користувача.
Референсний номер партії та термін придатності див. на етикетці флакону.

IgM/IgG	Лінії клітин/Клони
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

Ослаблена експресія антигену Rh D:
Збірний термін D^{u} широко використовується для опису еритроцитів, які мають меншу експресію антигену D, ніж звичайні. Термін "слабкий D" позначає осіб зі зменшеною кількістю повних ділянок антигену D на еритроцит. Термін "частковий D" позначає осіб з відсутніми епітопами антигену D. D^{VI} є категорією часткового D, в якій відсутні більшість епітопів D. Моноклональний реагент анти-D (IgM/IgG) виявляє більшість прикладів часткових і слабких еритроцитів D шляхом прямої аглютинації, але не виявляє клітини D^{VI}. Цей реагент виявить D^{VI} та клітини часткового D у антиглобуліновій фазі тестування.

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ

- Ізотонічий розчин (pH 6.5 - 7.5) або розчин фосфатно-сольового буфера (pH 6.8 - 7.2)
- Піпетки (дозатори)
- Палички для перемішування
- Пробірки та штативи для їх розміщення
- Пластинки, планшети для визначення груп крові
- Валідовані мікропланшети з «U»-подібним дном
- Центрифуга для пробірок
- Центрифуга для мікропланшетів
- Шейкер для мікропланшетів
- Автоматичний зчитувач для мікропланшетів
- Позитивні (рекомендовано - R1r) та негативні (rr) контрольні еритроцити

Специфічно для виявлення категорії D^{VI}:
- Реагент антилюдського глобуліну, наприклад реагент анти-HG
- IgG сенсибілізовані еритроцити
- Водяна баня або інкубатор сухого тепла з температурою до 37 °C (°C) ± 2 °C (°C)
- Вошер клітин Кумбса

Специфічно для методу гелевих ID-карт Bio-Rad:
- ID-картки Bio-Rad (NaCl, ферментний тест і холодові аглютиніни або картки Кумбса)
- ID-центрифуга Bio-Rad
- Bio-Rad ID-CellStab або ID-розчинник 2
- Bio-Rad ID-інкубатор з температурою до 37 °C (°C) ± 2 °C (°C)

Специфічно для методу касет Ortho BioVue:
- Касети для системи Ortho BioVue (нейтральні або касети Кумбса)
- Центрифуга системи Ortho BioVue
- Розчинник для еритроцитів Ortho 0.8 %
- Теплоблок системи Ortho BioVue з температурою до 37 °C (°C) ± 2 °C (°C)

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТУ

Реагент готовий до використання.
Перед використанням дайте реагенту нагрітися до кімнатної температури. Після використання, знову зберігайте реагент при 2-8 °C (°C).

СТАБІЛЬНІСТЬ І ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТУ

Після отримання, флакони з реагентами слід зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Тривале зберігання при температурах поза цим діапазоном може призвести до прискореної втрати реакційної здатності реагенту. Термін придатності реагенту становить 30 місяців від дати виготовлення. Цей реагент пройшов дослідження стабільності при транспортуванні при 37 °C (°C) та -25 °C (°C), як описано в документі EN ISO 23640:2015.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Реагент призначений лише для діагностики *in vitro*.
- Якщо ємність для реагенту тріснула або протікає, негайно утилізуйте вміст.
- Не використовуйте реагент після закінчення терміну придатності (див. етикетку флакону).
- Не використовуйте реагент, якщо є осад.
- Під час роботи з реагентами слід носити захисний одяг, наприклад одноразові рукавички та лабораторний халат.
- Реагент був відфільтрований через капсулу 0.2 мкм (µm), щоб зменшити біологічне навантаження, але не постачається стерильним. Після відкриття флакону, вміст повинен залишатися стабільним до закінчення терміну придатності, доки немає помітного помутніння, що може свідчити про погіршення або забруднення реагенту.
- Регент містить < 0.1% азиду натрію. Азид натрію може бути токсичним при попаданні всередину і може вступати в реакцію зі свинцевими та мідними трубами, утворюючи вибухонебезпечні азиди металів. Після утилізації змити великою кількістю води.
- Матеріали, використані для виробництва реагенту, були протестовані та дали негативний результат на антитіла до ВІЛ 1+2 та ВГС та HBsAg за допомогою затверджених мікробіологічних тестів.
- Жодні відомі тести не можуть гарантувати, що продукти людського або тваринного походження, не містять інфекційних агентів. Необхідно бути обережними при використанні та утилізації кожного флакону та його вмісту.

ЗАБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

Нативна кров без консерванту або кров стабілізована з використанням консервантів.
Зразки слід протестувати якомога швидше після збору. Якщо зразки не вдається одразу протестувати, то їх слід зберігати при 2-8 °C (°C). Зразки, які демонструють сильний гемоліз або мікробне забруднення, не слід використовувати для тестування. Зразки крові, що показують ознаки лізису, можуть дати недостовірні результати. Перед тестуванням бажано (але не обов'язково) промити всі зразки крові розчином фосфатно-сольового буфера (PBS) або ізотонічним фізіологічним розчином.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

УВАГА!
Одна крапля становить приблизно 50 мкл (µL), якщо використовувати піпетку, що постачається з флаконом.

1. Техніка визначення антигенів системи резус за допомогою моноклональних антитіл відповідно до «Інструкції з визначення резус-належності крові», затвердженої наказом Міністерства охорони здоров'я України від 05.07.1999 р. № 164

Реакцію з моноклональними анти-резус-тест-реагентами можна ставити в пробірках, на площині та в мікроплатах.

1.1. Реакція аглютинації на площині *(!найбільш прийнятна в лабораторній практиці)*
1. На скляну площину зі змочуваною поверхнею нанесіть 0.1 мл (ml) (дві краплі піпеткою, що постачається з флаконом), 1 краплю досліджуваної крові (0.05 мл (ml)) і ретельно змішайте.
2. Через 20 - 30 секунд почніть погойдувати площину. Чітка аглютинація починається і спостерігається досить чітко за 60 секунд.
3. Результат реакції слід враховувати через 3 хвилини, уникаючи висихання краплини.

1.2. Тест в пробірках
1. Одну краплю 3-5% завису еритроцитів сполучіть з краплею моноклонального рідкого тест-реагенту.
2. Пробірки струшуйте до повного перемішування реагентів, після чого центрифугуйте при швидкості ротора 1000 обертів/хвилину протягом 1 хвилини.
   Допускається попередня (перед центрифугуванням) інкубація при кімнатній температурі або при температурі 37 °C (°C) протягом 30 хвилин.
3. Обережно струшуйте осад у пробірках.
   У разі негативного результату осад еритроцитів легко розбивається, створюючи гомогенну непрозору суспензію.
   Якщо результат позитивний, осад не розбивається, залишаючись у вигляді одного або декількох великих аглютинатів на тлі прозорої рідини.

1.3. Реакція аглютинації в мікроплатах (мікропланшетах)
1. В комірку мікроплати (мікропланшета) капніть одну краплину тест-реагенту анти-резус і додайте до неї одну краплю 3-5% завису еритроцитів. Ретельно перемішайте вручну або шейкером для мікроплат (мікропланшетів).
2. Центрифугуйте при швидкості обертання ротора 1000 обертів/хвилину протягом 1 хвилини або попередньо інкубуйте 30 хвилин при кімнатній (від 20 до 27 °C (°C)) температурі.
3. Злегка струсіть мікроплату (мікропланшет).
   Якщо результат негативний, осад розбивається у вигляді рівномірного забарвлення рідини.
   У разі позитивного результату осад залишається у вигляді великих аглютинатів.
4. Відчитування результатів необхідно проводити у прохідному світлі з дзеркалом або з використанням спеціального обладнання, наприклад, апарату автоматичного обліку мікроплат (автоматичного зчитувача мікропланшетів).

2. НЕ КАТЕГОРІЯ D^{VI}:
2.1. Метод пробірок
1. Приготуйте суспензію еритроцитів (2-3%) у ізотонічному розчині або фосфатно-сольовому буфері (PBS).
2. Помістіть в марковану пробірку: 1 краплю моноклонального реагенту анти-D (IgM/IgG) і 1 краплю суспензії еритроцитів.
3. Ретельно перемішайте та центрифугуйте всі пробірки протягом 20 секунд при 1000 RFC (відносне прискорення центрифуги) або за відповідний альтернативний час та силу.
4. Акуратно струсіть пробірку, щоб перемішати еритроцити і огляньте макроскопічно на наявність аглютинації.
5. Будь-які пробірки, які показують негативний або сумнівний результат (що може статися з D^u або слабкими D зразками), слід інкубувати протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.
6. Після інкубації повторіть пункти 3 і 4.

2.2. Метод пластинок (на площині)
1. Приготуйте 35-45% суспензію еритроцитів у сироватці, плазмі або фосфатно-сольовому буфері (PBS) чи ізотонічному розчині, або використовуйте цільну кров (у власній плазмі) з антикоагулянтами.
2. Помістіть на мічені пластинки: 1 краплю моноклонального реагенту анти-D (IgM/IgG) і 1 краплю суспензії еритроцитів.
3. За допомогою чистої палички змішайте реагент і клітини на поверхні розміром приблизно 20 x 40 мм (mm).
4. Повільно нахиляйте пластинки вперед-назад протягом 30 секунд, періодично перемішуючи протягом 1 хвилини, підтримуючи пластинки при кімнатній температурі.
5. Оцініть макроскопічно через 1 хвилину під розсіяним світлом. Не сприймайте фібринові нитки як аглютинацію.
6. Будь-які слабкі реакції слід повторити за допомогою методу пробірок.

2.3. Метод гелевих ID-карт Bio-Rad
1. Приготуйте 0.8% суспензію еритроцитів в ID-CellStab або ID-розчиннику 2.
2. Зніміть алюмінієву фольгу з необхідної кількості мікропробірок.
3. Помістіть у відповідну мікропробірку: 50 мкл (µL) суспензії еритроцитів і 25 мкл (µL) моноклонального реагенту анти-D (IgM/IgG).
4. Центрифугуйте ID-картку (-и) в центрифузі для гелевих карток Bio-Rad.
5. Оцініть макроскопічно на наявність аглютинації.

2.4. Метод касет Ortho BioVue
1. Приготуйте 0.8 % суспензію еритроцитів у 0.8 % Ortho розчиннику еритроцитів.
2. Зніміть алюмінієву фольгу з необхідної кількості реакційних камер.
3. Помістіть у відповідну реакційну камеру: 50 мкл (µL) суспензії еритроцитів і 40 мкл (µL) моноклонального реагенту анти-D (IgM/IgG).
4. Центрифугуйте касету (-и) в центрифузі системи Ortho BioVue.
5. Оцініть макроскопічно на наявність аглютинації.

2.5. Метод мікропланшетів з «U»-подібним дном
1. Приготуйте суспензію еритроцитів в ізотонічному розчині або фосфатно-сольовому буфері (PBS).
2. Помістіть у відповідну лунку: 1 краплю моноклонального реагенту анти-D (IgM/IgG) і 1 краплю тестової суспензії еритроцитів.
3. Ретельно перемішайте, бажано за допомогою шейкера для мікропланшетів, обережно, щоб уникнути перехресного забруднення.
4. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 15 хвилин (час залежить від користувача).
5. Центрифугуйте мікропланшет протягом 1 хвилини при 140 RFC (відносне прискорення центрифуги) або за альтернативний час та силу.
6. Повторно розчиніть згустки клітин, використовуючи контрольоване перемішування на шейкері для мікропланшетів.
7. Оцініть макроскопічно або за допомогою валідованого автоматичного зчитувача.
8. Будь-які слабкі реакції слід повторити за допомогою методу пробірок.

3. ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КАТЕГОРІЇ D^{VI}:
3.1. Непрямий антиглобуліновий тест
1. Приготуйте 2-3% суспензію еритроцитів у ізотонічному розчині або фосфатно-сольовому буфері (PBS).
2. Помістіть у марковану пробірку: 1 краплю моноклонального реагенту анти-D (IgM/IgG) та 1 краплю суспензії еритроцитів.
3. Ретельно перемішайте та інкубуйте при 37 °C (°C) протягом 15 хвилин.
4. Промийте еритроцити принаймні один раз фосфатно-сольовим буфером або ізотонічним фізіологічним розчином, злийте фізіологічний розчин між промиваннями та повторно розчиніть кожен згусток клітин після кожного промивання. Після останнього промивання повністю злийте фізіологічний розчин.
5. Додайте 2 краплі реагенту анти-HG або анти-IgG на кожен сухий згусток клітин.
6. Ретельно перемішайте та центрифугуйте всі пробірки протягом 20 секунд при 1000 RFC (відносне прискорення центрифуги) або за відповідний альтернативний час та силу.
7. Повторно розчиніть кожен згусток клітин та огляньте макроскопічно.
8. Підтвердіть правильність усіх негативних реакцій за допомогою сенсибілізованих IgG еритроцитів.

3.2. Метод гелевих ID-карт Bio-Rad (LISS/Картки Кумбса)
1. Приготуйте 0.8% суспензію еритроцитів в ID-CellStab або ID-розчиннике 2.
2. Зніміть алюмінієву фольгу з необхідної кількості мікропробірок.
3. Помістіть у відповідну мікропробірку: 50 мкл (µL) суспензії еритроцитів і 25 мкл (µL) моноклонального реагенту анти-D (IgM/IgG).
4. Інкубуйте ID-картку (-и) протягом 15 хвилин при 37 °C (°C).
5. Центрифугуйте ID-картку(и) у центрифузі в центрифузі для гелевих карток Bio-Rad.
6. Оцініть макроскопічно на наявність аглютинації.

3.3. Метод касет Ortho BioVue (АНG/Касети Кумбса)

1. Приготуйте 0.8% суспензію еритроцитів у 0.8% розчиннику еритроцитів Ortho.
2. Зніміть алюмінієву фольгу з необхідної кількості реакційних камер.
3. Помістіть у відповідну реакційну камеру: 50 мкл (µL) досліджуваної суспензії еритроцитів і 40 мкл (µL) Л моноклонального реагенту анти-D (IgM/IgG)
4. Інкубуйте касету (-касети) протягом 15 хвилин при 37 °C (°C).
5. Центрифугуйте касету (-и) у центрифузі системи Ortho BioVue.
6. Оцініть макроскопічно на наявність аглютинації.

ПРИМІТКА:

- При роботі методом пластинок оцінку результатів слід провести не пізніше як через одну хвилину, щоб забезпечити специфічність та уникнути ймовірності негативного результату, який можна інтерпретувати як позитивний через висихання реагенту.
- При роботі методом пробірок чи методом мікропланшетів оцінку результатів слід провести одразу після центрифугування.
- Здійснюйте етапи промивання без перерви, центрифугуйте та зчитуйте тести одразу після додавання анти-людського глобуліну, оскільки затримки можуть призвести до дисоціації комплексів антиген-антитіло, що призведе до хибнонегативних або слабких позитивних реакцій.
- Слід бути обережним при інтерпретації результатів тестів, проведених при температурах, що відрізняються від рекомендованих.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. **Позитивний:** Аглютинація еритроцитів є позитивним результатом тесту і в межах прийнятих обмежень процедури тестування вказує на наявність антигену D у досліджуваних еритроцитах.
2. **Негативний:** Відсутність аглютинації еритроцитів є негативним результатом і в межах прийнятих обмежень процедури тестування вказує на відсутність антигену D на досліджуваних еритроцитах.
3. Результати тесту клітин, які аглютинували за допомогою реагенту негативного контролю, слід виключити, оскільки аглютинація, швидше за все, спричинена дією макромолекулярних потенціаторів на сенсибілізовані клітини у реагенті.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

- Рекомендується тестувати позитивний контроль (в ідеалі клітини R_1r), негативний контроль (в ідеалі клітини rr) та реагент негативного контролю паралельно з кожною партією тестів. Тести повинні вважатися недійсними, якщо контроль не показує очікуваних результатів.
- Під час додавання еритроцитів від пацієнта, у якого діагностовано захворювання, яке призводить до того, що еритроцити покриваються антитілами або іншими білками (наприклад, гемолітична хвороба новонароджених, аутоімунна гемолітична анемія), важливо перевірити еритроцити пацієнта за допомогою анти-D негативного контролю. Тести слід вважати недійсними, якщо еритроцити аглютинуються анти-D негативним контролем.
- Тестуйте зразки для визначення категорії D^{VI} тільки за допомогою непрямого антиглобулінового тесту, методів Кумбса Bio-Rad-ID і Кумбса Ortho BioVue.
- Слабкі та змінні антигени D погано виявляються за допомогою методів пластин, мікропланшетів, гелевих карт чи касет. Рекомендується перевіряти слабкі та часткові варіанти за допомогою методу пробірок.
- Метод антиглобулінової пробірки може вважатися дієвим, лише якщо всі негативні тести позитивно реагують на сенсибілізовані IgG еритроцити.
- Використовувати реагенти та інтерпретувати результати повинні підготовлені та кваліфіковані працівники відповідно до вимог країни, де використовуються реагенти.
- Користувач повинен визначити придатність реагентів для використання в інших методах.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Контроль якості реагенту проводився з використанням еритроцитів із фенотипами, які були підтверджені центром переливання крові Великобританії та були промиті перед використанням розчином фосфатно-сольового буфера (PBS) або ізотонічним сольовим розчином.
- Специфічність вихідних моноклональних антитіл демонструється за допомогою панелі антиген-негативних клітин.

ВІДСТЕЖУВАНІСТЬ

Ефективність реагенту була протестована відповідно до референсного стандарту мінімальної ефективності, отриманого від Національного інституту біологічних стандартів та контролю (NIBSC): Анти-D референсний стандарт 99/836.

ОБМЕЖЕННЯ

- Виробник не несе відповідальність за використання реагентів будь-яким іншим методом, крім тих, що зазначені в ПРОЦЕДУРІ ТЕСТУВАННЯ.
- Виробник не несе відповідальність за будь-які відхилення від ПРОЦЕДУРИ ТЕСТУВАННЯ.
- Реагент Анти-D (IgM/IgG), моноклональний не підходить для використання з клітинами, які оброблені ферментами, або клітинами, суспендованими в LISS (розчині з низькою іонною силою).
- Використання розчинів для приготування суспензії еритроцитів, що відрізняються від тих, які описані в розділі ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ в документі, має бути перевірено перед використанням. Деякі розчини можуть викликати хибнопозитивні або хибнонегативні реакції.
- Консервована кров може давати більш слабкі реакції, ніж свіжа.
- При тестуванні сенсибілізованих IgG клітин можна спостерігати хибнопозитивну аглютинацію.
- Помилково позитивні або помилково негативні результати також можуть виникати через:
  - Забруднення тест-матеріалів
  - Неправильне зберігання, концентрацію клітин, час інкубації або температуру
  - Неправильне або надмірне центрифугування
  - Відхилення від рекомендованих методів

ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Інформацію про утилізацію реагенту та знезараження місця розливу див. у **Паспорті безпеки хімічних матеріалів**, який доступний за запитом.

СИМВОЛИ

REF	Кат. номер продукту		Температура зберігання
IVD	Реагенти для діагностики *in vitro*		Дивіться інструкцію з використання
LOT	Номер партії		Виробник
	Термін придатності	Cont.	Вміст флакону
UA.TR.116	Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером призначеного органу з оцінки відповідності, який був залучений на етапі контролю виробництва		

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки відповідності. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови відповідності технічним регламентам та критеріям прийнятності.

ВИРОБНИК:
ТОВ «ЛАБЮЕЙ»
Україна, 76018
м. Івано-Франківськ, вул. Петлюри, 25
Моб.: +38 (067) 000-20-22
E-mail: info@labua.com.ua

UA.TR.116