|  |  |
| --- | --- |
|  | **ЗАТВЕРДЖУЮ**  **директор ПП «ГРУПОТЕСТ»**  /підписано/ С.М. Іванов.  20.09.2021 р. Версія 01-005 |

**Інструкція для медичного застосування**

Діагностичні реагенти «ГРУПОТЕСТ»® для визначення групи крові людини

за системами АВ0, Rhesus, Kell та імунних антитіл ТУ У 21.2-36816271-005:2021.

**Діагностичний моноклональний реагент анти - D/DVI IgM/IgG**

**Назва** Діагностичний моноклональний реагент анти - D/DVI IgM/IgG.

**Склад** Діагностичний моноклональний реагент анти - D/DVI IgM/IgG для визначення групи крові людини за системою Rhesus містить людські моноклональні анти-D-антитіла IgM та людські моноклональні IgG проти антигену D еритроцитів людини, клони P3X61 IgM, P3X35 IgG, P3X21223B10 IgM, P3X290IgG.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CLONE** | **TYPE** | **D Partials** | | | | | | | | | | |
| **II** | **IIIa**  **IIIb**  **IIIc** | **IVa** | **IVb** | **Va** | **VI** | **VII** | **DFR** | **DBT** | **RoHar** | **HMi** |
| **P3X61** | **IgM** | **+** | **+** | **+** | **+** | **+** | **-** | **+** | **±** | **+** | **+** | **+** |
| **P3X35** | **IgG** | **+** | **+** | **+** | **+** | **-** | **-** | **+** | **-** | **-** | **-** | **+** |
| **P3X21223B10** | **IgM** | **-** | **+** | **-** | **-** | **+** | **+** | **+** | **+** | **-** | **-** | **+** |
| **P3X290** | **IgG** | **+** | **+** | **±** | **-** | **+** | **±** | **+** | **+** | **-** | **-** | **+** |

**Призначення */* експлуатаційні характеристики**

Анти-D - людський моноклональний IgM та анти-D - людський моноклональний IgG отримані з різних клонів (див. Склад). Це дозволяє проводити визначення широкого спектру D антигену еритроцитів людини (як «нормального» D антигену так і його слабкі варіанти і категорії). Типи парціального (слабкого) D антигену, які можна визначити за допомогою моноклонального реагенту анти - D/DVI IgM/IgG, такі: II, IIIa, IIIb, IIIc, IVa, IVb, Va, VI, VII тощо.

Діагностичний моноклональний реагент анти-D/DVI IgM/IgG призначений для визначення D антигену еритроцитів людини (в тому числі слабких його варіантів і категорій) за допомогою реакції прямої аглютинації в будь-якій її модифікацій (на площині, в пробірках, мікроплатах та гелевих картах), непрямим антиглобуліновим тестом (непрямим тестом Кумбса) та реакцією конглютинації із застосуванням желатину розчину. Кожний з цих методів можна використовувати як самостійний так і в комплексі залежно від мети дослідження.

Враховуючи, що діагностичний моноклональний реагент анти-D/DVI IgM/IgG містить моноклональні антитіла IgG, рекомендовано для визначення D антигену людини використовувати тест в пробірках або непрямий метод Кумбса (найбільш чутливий). Для утворення видимих аглютинатів деяких слабких категорій антигену D з антитілами класу IgG необхідно додати до реакційної суміші поліспецифічний антилюдський глобулін анти - С3d IgM/IgG або діагностичний антилюдський глобулін анти-Ig G для проби Кумбса (антиглобулінову сироватку) або желатину розчин. Тому, у випадку отримання негативного або сумнівного результату з використанням реагенту анти-D/DVI IgM/IgG за допомогою реакції прямої аглютинації рекомендовано продовжити дослідження непрямим тестом Кумбса або реакцією конглютинації із застосуванням желатину розчину (див. Спосіб застосування).

Призначено для діагностики in vitro. При застосуванні діагностичного моноклонального реагенту для визначення групи крові людини за системою Rhesus анти - D/DVI IgM/IgG слід керуватися даною Інструкцією, інструкцією виробника гелевих карт, а також «Інструкцією з визначення груп крові за системами АВ0, Резус та імунних антитіл», затвердженої наказом МОЗ України від 05.07.1999 р. № 164.

**Форма випуску** Діагностичний моноклональний реагент у рідкому вигляді.

**Обладнання та матеріали (не входять до поставки)**

- холодильник;

- термостат (37 ºС)

***Визначення на площині, в пробірках, в мікроплаті Визначення в гелевих картах***

- центрифуга лабораторна/для мікроплат; - центрифуга для гелевих карт;

- мікроскоп (за потребою); - штатив для гелевих карт;

- планшети для визначення груп крові/круглодонні мікроплати - карти з нейтральним гелем;

- піпетки Пастера; - дозатори на 10 мкл, 25 мкл, 50 мкл; 1000 мкл;

- палички для перемішування; - одноразові наконечники для дозаторів;

- секундомір або пісочний годинник - Ділюент «ГРУПОТЕСТ»®

- пробірки лабораторні та штативи для них - пробірки для приготування суспензії еритроцитів;

- 20% суспензія стандартних еритроцитів «ГРУПОТЕСТ»® - 0,8% суспензія стандартних еритроцитів «ГРУПОТЕСТ»®

- желатину розчин 10%

- LISS «ГРУПОТЕСТ»®

**Вимоги до зразка крові**

***Увага!*** *Кожна лабораторія**самостійно встановлює процедуру заготівлі зразка крові та підготовки його до дослідження.*

* Для визначення групи крові за системою Rhesus за допомогою діагностичного моноклонального реагенту анти-D/DVI IgM/IgG використовувати зразки венозної або капілярної крові.
* Зразки крові можуть бути заготовлені як з використанням консервантів так і без них.
* У випадку використання пуповинної крові необхідно запобігти утворенню «вартонова студня» шляхом встановлення процедури заготівлі зразка крові та/або використання попередньо відмитих еритроцитів.
* Для заготівлі зразка крові використовувати пробірки без наповнювача або з наповнювачем ЕДТА. Можливо використання пробірок з іншими наповнювачами, які призначені для проведення імуногематологічних досліджень згідно інструкції виробника*.* ***Увага!*** *Не використовувати пробірки з активатором згортання, гелем або іншими субстанціями, призначеними для прискорення процесу згортання або розділення крові на плазму/сироватку та формені елементи.*
* У разі визначення групи крові у зразку крові, взятої з пальця або взятої без консерванту, необхідно забезпечити достатньо велику кількість еритроцитів (без надмірної кількості сироватки).
* Термін придатності зразків крові для досліджень, незалежно від способу заготівлі, не більше 48 годин. ***Увага!*** *Експресія ряду антигенів може знижуватись під час зберігання зразка крові, що може вплинути на результат дослідження (отримання хибнонегативних результатів).*
* Зразки крові зберігати за температури від 2 ˚С до 8 ˚С.
* Донорська кров, заготовлена у відповідні контейнери з консервантом, може бути використана для дослідження протягом терміну придатності еритроцитовмісного компоненту крові.
* Не використовувати зразки крові з ознаками гемолізу, бактеріального проросту та зразки крові з високим ступенем згортання. ***Увага!*** *При проведенні дослідження в гелевих картах не використовувати вкрай ліпемічні зразки! Це може вплинути на достовірність результату внаслідок забруднення гелю.*

**Особливості застосування**

Кожна нова партія або поставка діагностичних моноклональних реагентів підлягає верифікації та/або валідації функціональних характеристик, які можуть вплинути на якість досліджень. Валідацію проводять відповідно до параметрів Аналітичного паспорту, який додається до кожної партії діагностичного моноклонального реагенту, використовуючи методи, викладені в цій Інструкції. Дослідження проводять за допомогою стандартних еритроцитів (Rh+поз. CcDEe, Rh+ поз. CcDVIee, Rh-нег. ccdee). Стандартні еритроцити мають бути призначені для методу, який використовує лабораторія. ***Увага!*** *Кожна лабораторія**самостійно встановлює процедуру верифікації/валідації.*

**Необхідні застереження /заходи безпеки**

Вихідний матеріал, з якого отримані клітинні лінії, був тестований та дав негативну реакцію на НІV, HbsAg та HCV.

Робота із зразками крові, що досліджуються діагностичним моноклональним реагентом потребує дотримання заходів безпеки, які передбачені для роботи з необстеженою кров´ю. Відходи, що утворюються під час роботи із зразками крові відносяться до відходів категорії В. Поводження з відходами категорії В проводити відповідно до процедур, затверджених у закладі.

**Кваліфікаційні вимоги до виконавців**

Визначення групи крові людини за системою Rhesus проводять фахівці з повною вищою освітою (спеціаліст, магістр) або неповною вищою освітою (молодший спеціаліст) відповідного напрямку, які пройшли підготовку з питань імуногематології та мають відповідний сертифікат. Оцінку результату дослідження - висновок про групу крові за системою Rhesus - проводять тільки фахівці з повною вищою освітою.

**Умови проведення досліджень** Визначення групи крові проводити у приміщенні з достатнім освітленням за температури від 18 ºС до 25 ºС. Діагностичні реагенти «ГРУПОТЕСТ»® не слід зберігати відкритими, тому що при висиханні їх активність знижується. Не слід користуватися реагентами, якщо вони мають осад, помутніння або ознаки бактеріального проросту.

***Увага!*** *Після розкриття флакону реагент можна використовувати до закінчення терміну придатності при відсутності змін, що можуть виникнути в процесі використання реагенту − помутніння, утворення осаду, бактеріального забруднення.*

Для кожного реагенту (в разі необхідності) використовувати окрему одноразову піпетку або окремий одноразовий наконечник для дозатора. Перед проведенням досліджень діагностичні реагенти «ГРУПОТЕСТ»® витримати 15 хвилин на лабораторному столі за температури від 18 ºС до 25 ºС.

**Спосіб застосування**

Визначення антигену D системи Rhesus проводять загальноприйнятими методами виявлення антигенів еритроцитів.

Діагностичний моноклональний реагент анти - D/DVI IgM/IgG для визначення групи крові людини за системою Rhesus містить людські моноклональні анти-D-антитіла класів IgM та IgG проти антигену D еритроцитів людини. Тому визначення антигену D еритроцитів людини за допомогою даного реагенту рекомендовано проводити в два етапи.

Перший етап: визначення антигену D («нормального») реакцією прямої аглютинації будь-якої модифікації - на площині (п.1), в пробірках (п.2), в мікроплатах (п.3), в гелевих картах (п.4).

Другий етап (при отриманні негативного або сумнівного результату на першому етапі): визначення слабких варіантів і категорій антигену D за допомогою хоча б одного з методів – непрямий антиглобуліновий тест в пробірках (п.5.1), непрямий антиглобуліновий тест в гелевих картах (п.5.2), реакція конглютинації із застосуванням желатини (п.6).

При проведенні реакції прямої аглютинації в пробірках або на площині одиницею виміру реагентів і зразка крові є крапля. З метою отримання правильного співвідношення реагент-кров (реагент-еритроцити) рекомендовано для отримання краплі використовувати однакові прилади (одноразові піпетки Пастера, мікродозатори, тощо). В разі неможливості використання однакових приладів необхідно забезпечити візуально ідентичний розмір крапель, що має бути відповідним чином задокументовано. ***Увага!*** *При використанні одноразових піпеток Пастера, діаметр вихідного отвору має бути однаковим.*

***Процедура визначення антигену D (в тому числі слабких його варіантів та категорій)***

1 НА ПЛОЩИНІ

1.1 На планшет для визначення групи крові нанести дві краплі діагностичного моноклонального реагенту анти-D/DVI IgM/IgG.

1.2 Поруч нанести краплю крові, що досліджується.

1.3 Реагенти та кров ретельно змішати сухою паличкою та спостерігати за реакцією при слабкому похитуванні пластинки протягом 5 хвилин, тому що з еритроцитами, які несуть слабкий D-антиген, реакція відбувається повільніше.

1.4 Провести облік результатів. Результат реакції в кожній краплі може бути негативним або позитивним.

Позитивний результат (від 4+ до +) виражається в аглютинації (склеюванні) еритроцитів. Аглютинацію можна спостерігати неозброєним оком у вигляді дрібних червоних агрегатів, які швидко зливаються, утворюють великі пластівці або один великий аглютинат. Негативний результат (-): крапля залишається рівномірно забарвленою у червоний колір, аглютинати в ній не спостерігаються. ***Увага!*** *При отриманні сумнівного результату реакцією аглютинації на площині рекомендовано повторити дослідження реакцією аглютинації в пробірках, в мікроплаті або в гелевих картах.*

2 В ПРОБІРКАХ

2.1 Приготувати 2-3 % суспензію досліджуваних еритроцитів.

2.1.1 Помістити 0,5 мл розчину натрію хлориду 0,9% або LISS «ГРУПОТЕСТ»® в чисту пробірку (Розчин низької іонної сили - LISS «ГРУПОТЕСТ»® - збільшує рівень взаємодії антитіл і, таким чином, посилює реакцію аглютинації (антиген/антитіло).

2.1.2 Додати 10,0-15,0 мкл досліджуваних еритроцитів.

2.1.3 Обережно перемішати.

2.2 Провести визначення

2.2.1 В чисту, позначену пробірку помістити одну краплю 3-5% суспензії досліджуваних еритроцитів, додати краплю діагностичного моноклонального реагенту анти-D/DVI IgM/IgG.

2.2.2 Пробірку обережно струсити до повного перемішування реагентів.

2.2.3 Центрифугувати при 500g протягом 60 секунд.

2.2.4 Обережно струсити осад в пробірці.

2.2.5 Провести облік результатів. Негативний результат: осад еритроцитів легко розбивається, створюючи гомогенну непрозору суспензію. Позитивний результат: осад не розбивається, залишаючись у вигляді одного або декількох великих аглютинатів на тлі прозорої рідини.

3 В МІКРОПЛАТІ

3.1 У лунку мікроплати додати краплю діагностичного моноклонального реагенту анти-D/DVI IgM/IgG та краплю 3-5% суспензії еритроцитів (п.2.1), що досліджуються, ретельно перемішати.

3.2 Центрифугувати при швидкості 500g протягом 60 секунд. Допускається попередня (перед центрифугуванням) інкубація 30 хвилин за температури від 20 ˚С до 25 ˚С.

3.3 Обережно струсити мікроплату. Провести облік результату у прохідному світлі з дзеркалом або з використанням спеціального обладнання, наприклад, апарату автоматичного обліку мікроплат.

Негативний результат: осад розбивається, спостерігається рівномірне забарвлення рідини. Позитивний результат: осад залишається у вигляді великих аглютинатів.

4 В ГЕЛЕВИХ КАРТАХ

4.1 Приготувати 0,8 % суспензію досліджуваних еритроцитів.

4.1.1 Додати 1,0 мл Ділюенту «ГРУПОТЕСТ»® в чисту пробірку.

4.1.2 Додати 10,0-12,5 мкл досліджуваних еритроцитів.

4.1.3 Обережно перемішати. ***Увага!*** *Готову суспензію використати протягом 10-20 хвилин.*

4.2 Позначити мікропробірку символом а-D/DVI, вказати серію реагенту (за потребою).

4.3 Позначити на карті номер або ПІБ пацієнта/донора

4.4 Зняти фольгу з мікропробірки.

4.5 Помістити 50 мкл моноклонального реагенту анти-D/DVI IgM/IgG.

4.6 Додати 50 мкл 0,8 % суспензії досліджуваних еритроцитів. ***Увага!*** *Гелеву карту тримати вертикально!*

4.7 Інкубувати карту 5 хвилин за температури від 18 ºС до 25 ºС.

4.8 Центрифугувати карту.

4.9 Провести облік результатів. Позитивний результат (від 4+ до +): аглютиновані клітини утворюють червону лінію на поверхні гелю або аглютинати розсіяні в гелі. Негативний результат (-): компактний осад клітин на дні мікропробірки.

5 НЕПРЯМИЙ АНТИГЛОБУЛІНОВИЙ ТЕСТ (НЕПРЯМИЙ МЕТОД КУМБСА)

5.1 В ПРОБІРКАХ ***Увага!*** *Розчин низької іонної сили - LISS «ГРУПОТЕСТ»® - збільшує рівень взаємодії антитіл і, таким чином, посилює реакцію аглютинації (антиген/антитіло).*

5.1.1 Відмити еритроцити, які досліджуються, у розчині натрію хлориду 0,9% або розчині LISS «ГРУПОТЕСТ»® три рази.

5.1.2 Приготувати 5% суспензію еритроцитів у тому розчині, в якому були відмиті еритроцити (у розчині натрію хлориду 0,9% або у розчині LISS «ГРУПОТЕСТ»®).

5.1.3 Помістити дві краплі діагностичного моноклонального реагенту анти-D/DVI IgM/IgG в пробірку і додати дві краплі приготованої суспензії еритроцитів. Обережно струсити пробірку.

5.1.4 Інкубувати за температури 37 °С (термостат) протягом 30 хв. (якщо суспензія приготована на розчині натрію хлориду 0,9%) або 15 хв. (якщо суспензія приготована у розчині LISS «ГРУПОТЕСТ»®).

5.1.5 Промити розчином натрію хлориду 0,9% або розчином LISS «ГРУПОТЕСТ»® три рази. Після кожного промивання злити промивну рідину.

5.1.6 До осаду еритроцитів додати дві краплі діагностичного поліспецифічного антилюдського глобуліну анти - С3d IgM/IgG або діагностичного антилюдського глобулін анти-Ig G.

5.1.7 Змішати осад з реагентом і центрифугувати при 500 g протягом 60 секунд.

5.1.8 Обережно струсити пробірку та негайно оцінити результат реакції.

Негативний результат: осад еритроцитів легко розбивається, створюючи гомогенну непрозору суспензію.

Позитивний результат: осад не розбивається, залишаючись у вигляді одного або декількох великих аглютинатів на тлі прозорої рідини.

5.2 В ГЕЛЕВИХ КАРТАХ

5.2.1 Діяти, як вказано в п.п.4.1-4.4

5.2.2 Помістити 50 мкл 0,8 % суспензії досліджуваних еритроцитів у відповідну мікропробірку.

5.2.3 Додати 25 мкл діагностичного моноклонального реагенту анти-D/DVI IgM/IgG у ту саму мікропробірку. ***Увага!*** *Гелеву карту тримати вертикально!*

5.2.4 Інкубувати карту 15 хвилин за температури 37 °С (термостат).

5.2.5 Додати у відповідну мікропробірку 50 мкл діагностичного поліспецифічного антилюдського глобуліну анти - С3d IgM/IgG або діагностичного антилюдського глобулін анти-Ig G.

5.2.6 Центрифугувати карту.

5.2.7 Провести облік результатів

Позитивний результат (від 4+ до +): аглютиновані клітини утворюють червону лінію на поверхні гелю або аглютинати розсіяні в гелі. Негативний результат (-): компактний осад клітин на дні мікропробірки.

6 РЕАКЦІЯ КОНГЛЮТИНАЦІЇ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ЖЕЛАТИНУ РОЗЧИНУ (В ПРОБІРКАХ)

6.1 Одну краплю 3-5% суспензії досліджуваних еритроцитів (п.2.1) змішати з краплею діагностичного моноклонального реагенту анти-D/DVI IgM/IgG.

6.2 Додати 2 краплі желатину розчину 10%. Пробірку струсити до повного перемішування реагентів.

6.3 Штатив з пробіркою розмістити у водяну баню за температури від 46 °С до 48 °С на10 хвилин або в сухо – повітряній термостат за температури від 46 °С до 48 °С на 30 хвилин.

***Увага!*** *Желатину розчин 10% необхідно попередньо підігріти до розчинення на водяній бані за температури від 46 °С до 48 °С.*

6.4 Забрати пробірки з водяної бані або з термостату, додати до них 5-8 мл 0,9% розчину натрію хлориду.

6.5 Перемішати вміст пробірок шляхом 1-2-кратного перевертання та переглянути пробірки на світлі неозброєним оком.

6.6 Провести облік результатів.

Позитивний результат: аглютинати легко розрізняються у вигляді червоних грудочок на прозорому, майже знебарвленому тлі рідини. Негативний результат (-): в пробірці видно рівномірно забарвлену в світло – червоний колір, дещо опалесцюючу рідину. ***Увага!*** *Для точного обліку результату рекомендовано використовувати мікроскоп.*

**Контроль специфічності реакції**

Обовʾязковим є щоденний контроль функціональних характеристик діагностичних моноклональних реагентів з використанням Наборів стандартних еритроцитів (включати стандартні D+позитивні, D-негативні еритроцити та зразок зі слабко вираженими властивостями антигену D: Rh+ поз. CcDEe, Rh - нег. ccdee, Rh+ поз. CcDVIеe). Контроль проводити методами, які використовуються для проведення досліджень.

**Умови зберігання та транспортування** Зберігати в сухому захищеному від світла місці за температури від 2 °С до 8 °С.

Транспортувати з дотриманням вимог «холодового ланцюга» у спеціальних термоконтейнерах або у контейнерах з термоізоляцією, які здатні підтримувати температуру зберігання. Допускається зберігання та/або транспортування при температурі до 25 °С за умови загальної витримки за цієї температури не більше 10 діб.

**Термін придатності –** не менше 2 років (24 місяців).

**Пакування** Діагностичний моноклональний реагент анти-D/DVI IgM/IgG розлитий по 5 або 10 мл у флакони, які герметично перекриті ковпачками. Флакони з реагентами разом з інструкцією для медичного застосування вкладені в коробку з картону.

**Виробник** ПП «ГРУПОТЕСТ» Україна, Харків.

**Сертифікат № UA.SM.221-21 про відповідність системи управління якістю ДСТУ EN ISO 13485:2018**

**ТУ У 21.2-36816271-005:2021**

**Місце знаходження виробництва: Україна, 62572, Харківська обл., Чугуївський р-н, с. Хотімля, вул. Підлісна, буд.13; телефон офісу: +380 (57) 717 50 44.**

 **UA.TR.099**

**ОПИС СИМВОЛІВ**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | «ВИРОБНИК» назва та адреса виробника |  | «ВИКОРИСТАТИ ДО» рік, місяць | **UA.TR.099** | знак відповідності Технічному регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro, затвердженому постановою Кабінету Міністрів України 02.10.2013 № 754 |
|  | «КОД ПАРТІЇ» |  | «МЕДИЧНИЙ ВИРІБ ДЛЯ  ДІАГНОСТИКИ  IN VITRO» |  | «ОЗНАЙОМЛЕННЯ З ІНСТРУКЦІЯМИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ» |
|  | «ДАТА ВИГОТОВЛЕННЯ» |  | «ТЕМПЕРАТУРНЕ ОБМЕЖЕННЯ» |  | «ЗАСТОРОГА! ОЗНАЙОМИТИСЯ ІЗ СУПРОВІДНИМИ ДОКУМЕНТАМИ» |