

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Председателя
Комитета контроля качества и
безопасности товаров и услуг
Министерства здравоохранения
Республики Казахстан

от « ____ » _____ 20__ г.
№ _____

Инструкция по медицинскому применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

1. Наименование медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор диагностических моноклональных антител для выявления антигенов систем АВО (Н), MNSs в крови и слюне в судебно-медицинской практике (ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН СМ).

2. Состав и описание медицинского изделия

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

В состав набора входят:

1. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-А - 1 флакон (5,0 мл);
2. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-В - 1 флакон (5,0 мл);
3. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-Н_{аб} - 1 флакон (5,0 мл);
4. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-Н_{н/аб} - 1 флакон (5,0 мл);
5. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-Н_{кра} - 1 флакон (5,0 мл);
6. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-М - 1 флакон (5,0 мл);
7. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-N - 1 флакон (5,0 мл);
8. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-А₁ - 1 флакон (5,0 мл);
9. ЭРИТРОТЕСТ™ - ЦОЛИКЛОН СМ анти-А_{сл} - 1 флакон (5,0 мл).

Вспомогательное 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 5,0 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 от +37 до +52°C;
- центрифуга настольная на 1000-3000 об/мин;
- 0,9 % раствор хлористого натрия (физиологический раствор);
- перчатки резиновые или пластиковые;
- эритроциты стандартные групп O(I), A₁(II), A₂(II), B(III) фенотипов MM и NN;
- слюна доноров-выделителей групп O(I), A(II), B(III).

3. Назначение медицинского изделия для диагностики *in vitro*:

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.

Цоликлоны СМ строго специфичны.

Цоликлон анти-A выявляет антигены A₁ и A₂. Цоликлон анти-A₁ выявляет только антиген A₁, а Цоликлон анти-A_{сл} помимо антигенов A₁ и A₂ выявляет более слабые варианты антигена A - A₃, A_x. Применение этих трех Цоликлонов позволяет дифференцировать варианты антигена A.

Цоликлон анти-B выявляет антиген B и его слабые варианты.

Цоликлоны анти-H_{аб} и анти-H_{кра} выявляют H на эритроцитах и в слюне, Цоликлон анти-H_{н/аб} выявляет антиген H только на эритроцитах; при этом степень выраженности агглютинации этих Цоликлонов с эритроцитами убывает в ряду фенотипов O(I) > A₂(II) > B(III) > A₁(II) > A₂B(IV) > A₁B(IV). Цоликлон анти-H_{аб} одинаково реагирует с эритроцитами всех групп.

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

Цоликлоны анти-M 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%.

Выявление антигена производится в цельной крови, взятой без консерванта; крови, взятой с консервантом; в отмытых и не отмытых эритроцитах и слюне.

Потенциальным потребителем является медицинский персонал судебно-медицинской лаборатории

4. Информация для идентификации медицинских изделий с целью получения безопасной комбинации и (или) информация об известных ограничениях по совместному использованию медицинских изделий

Информации об известных ограничениях по совместному использованию медицинских изделий не известно.

5. Информация о сроке и условиях хранения медицинского изделия:

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

Срок годности 1 год. Не применять после истечения срока годности

6. Информация о специальных условиях транспортирования;

Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C.

Допускается транспортирование набора при температуре до +25°C не более 5 дней.

7. Информация для пользователей (предупреждения, меры предосторожности, ограничения при использовании медицинского изделия для диагностики in vitro):

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

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

8. Предупреждение и (или) специальные меры предосторожности в отношении безопасной утилизации медицинского изделия

Отходами являются растворы, которые остаются после промывки, установки и фильтрования. Не содержат токсичных веществ. Отходы,

содержащие кровь и ее компоненты, должны утилизироваться. Утилизация производится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации изделия медицинского назначения.

9. Информация об условиях, необходимых для сбора, обработки и подготовки образцов, данные по стабильности анализируемых образцов, в том числе условия и длительность хранения, условия транспортировки, ограничения по циклам заморозки (размораживания)

Для определения берется цельная кровь, взятая без консерванта; кровь взятая с консервантом; отмытые и неотмытые эритроциты, слюна. Забор образцов производится в стерильных условиях. Ограничения: нельзя анализировать гемолизированную кровь, а также образцы с наличием сгустков.

Подготовка эритроцитов.

Поместить по 3,0-5,0 мл типированных по системам АВО и MN эритроцитов (каждого фенотипа отдельно) в центрифужные пробирки, долить до верха пробирки 0,9 % раствор хлористого натрия. Центрифугировать пробирки при 3000 об/мин при комнатной температуре (18-25оС) в течение 5 мин и удалить супернатант. Такую процедуру повторить трижды, используя во всех дальнейших реакциях осадок отмытых таким образом эритроцитов.

Приготовить из отмытых эритроцитов каждого фенотипа 2 % суспензию следующим образом: к 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (ФС 42-25-95) добавить 0,2 мл осадка эритроцитов.

Подготовка слюны.

Слюну доноров групп О(I), А(II), В(III), АВ(IV) прогреть в водяной бане при температуре 100оС в течение 10 мин, отцентрифугировать при 3000 об/мин в течение 10 мин и для исследования использовать надосадочную жидкость, разведенную 1:10 0,9 % раствором натрия хлорида (ФС 42-25-95).

10. Подробная информация о подготовке к использованию медицинского изделия для диагностики *in vitro*:

ЭРИТРОТЕСТ™-ЦОЛИКЛОН СМ готовы к применению.

11. Рекомендации в отношении процедур контроля качества

Внешний вид компонентов набора контролируют визуально

Проведение контроля.

Определение специфичности. Определяется в реакции прямой агглютинации на плоскости следующим образом: на белую фарфоровую или любую другую пластину со смачиваемой поверхностью нанести в две точки по 100 мкл каждого Цоликлона СМ, рядом с первой каплей нанести 10 мкл эритроцитов положительных по данному антигену, а рядом со второй – 10 мкл эритроцитов отрицательных по данному антигену; смешать

ингредиенты отдельно в каждой капле. Наблюдение за реакцией следует вести в течение 3 мин. Положительная реакция агглютинации Цоликлона СМ с эритроцитами, несущими соответствующий антиген и отрицательная реакция агглютинации с эритроцитами, не несущими соответствующий антиген, свидетельствует о специфичности Цоликлона СМ.

Определение гемагглютинирующей способности. На белую фарфоровую или любую другую пластину со смачиваемой поверхностью нанести по 100 мкл каждого Цоликлона СМ, рядом нанести по 10 мкл эритроцитов, положительных по данному антигену, смешать ингредиенты стеклянной палочкой и засечь с помощью секундомера время наступления четкой агглютинации, отсчитываемой от момента смешивания, которая выражается в склеивании эритроцитов в отчетливо видимые аггломераты и просветлении поля реакции.

Положительная реакция агглютинации Цоликлона СМ: анти-А с эритроцитами группы А1(II), Цоликлона СМ анти-А1 с эритроцитами группы А1(II) и Цоликлона СМ анти-В с эритроцитами группы В(III) должна появляться не позднее 30 сек. Положительная реакция агглютинации Цоликлона анти-Асл с эритроцитами А1(II) не позднее 30 сек, а с эритроцитами группы А2(II) - не позднее 180 сек, Цоликлона СМ анти-М с эритроцитами фенотипа ММ и Цоликлона СМ анти- N с эритроцитами фенотипа NN не позднее 60 сек.

Положительная реакция агглютинации Цоликлонов СМ анти-Наб, анти-Нн/аб и анти-Нкра с эритроцитами группы О(I) с должна появляться не позднее 120 сек после смешивания. Выраженность реакции агглютинации Цоликлонов анти-Нн/аб и анти-Нкра с эритроцитами должна уменьшаться в ряду фенотипов: О(I), А2(II), А2В(IV), В(III), А1(II), А1В(IV).

Определение титра.

Титр Цоликлонов СМ анти-А, анти-А1, анти-Асл, анти-В, анти-М, анти-Н, анти-Наб, анти-Нн/аб и анти-Нкра учитывают в реакции агглютинации в 96-луночном планшете.

Приготовить по одному ряду двукратных разведений каждого Цоликлона СМ (а Цоликлона СМ анти-Асл 2 ряда) в планшете следующим образом: в первую лунку 96-луночного круглодонного планшета поместить 100 мкл соответствующего Цоликлона СМ, а в следующие лунки ряда (по 12-ый включительно) - по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Из первой лунки во вторую с помощью полуавтоматической пипетки со сменными наконечниками перенести 50 мкл жидкости, тщательно перемешать, пипетированием, перенести 50 мкл в следующую лунку и повторить процедуру до последней лунки, из которой 50 мкл удалить. Титровать необходимо до 12-ой лунки (один ряд). Затем в каждую лунку внести по 50 мкл 2% суспензии эритроцитов соответствующей группы и фенотипа: в ряды разведений Цоликлонов СМ анти-А, анти-А1 и первого ряда разведений анти-Асл добавить по 50 мкл 2 % суспензии эритроцитов группы А1(II), во 2-ой ряд Цоликлона анти-Асл – по 50 мкл 2 % взвеси

эритроцитов А2(II), в ряд разведений Цоликлона СМ анти-В – по 50 мкл 2 % взвеси эритроцитов группы В(III), в ряд разведений Цоликлона СМ анти-М – по 50 мкл 2% взвеси эритроцитов фенотипа О(I) ММ, в ряд разведений Цоликлона СМ анти-N - по 50 мкл 2 % взвеси эритроцитов фенотипа О(I) NN, в ряды разведений Цоликлонов СМ анти-Наб, анти-Нн/аб и анти-Нкра – по 50 мкл 2 % взвеси эритроцитов группы О(I).

Планшеты инкубировать при комнатной температуре(18-25оС) в течение 45 мин, после чего оценить результат реакции визуально по форме осадка на дне лунки. За титр принимают последнее разведение, при котором осадок имеет большой диаметр и широко распределен по дну лунки. При отрицательном результате эритроциты собираются на дне лунки в точку с ровными краями.

Определение абсорбции Цоликлонов СМ антигенами слюны.

Определение абсорбции Цоликлонов СМ антигенами слюны. проводят в реакции ингибирования реакции агглютинации следующим образом. Развести Цоликлоны 0,9% раствором натрия хлористого (ГОСТ 4233-77) до титра 1:32 (в 5-10 раз), затем приготовить по 2 ряда двукратных разведений каждого Цоликлона СМ в 96-луночных планшетах так же, как это проводится при определении титра (см. п. 4.2.3.3.). Затем в каждую лунку планшета 1-го ряда с разведениями Цоликлона СМ анти-А добавить по 50 мкл слюны донора-выделителя группы А(II), разведенной 1:10 0,9 % раствором натрия хлористого; в каждую лунку планшета 1-го ряда с разведениями Цоликлона анти-В – по 50 мкл слюны донора-выделителя группы В(III), разведенной 1:10 0,9 % раствором натрия хлористого, в каждую лунку планшета 1-го ряда с разведениями Цоликлонов анти-Наб, анти-Нн/аб и анти Нкра - по 50 мкл слюны донора-выделителя группы О(I), разведенной 1:10 0,9 % раствором натрия хлористого. Во второй ряд разведений каждого соответствующего Цоликлона слюну не добавляют - он является контрольным.

Инкубировать планшет в течение 45-60 мин при температуре 37оС. После инкубации в каждую лунку добавить: в оба ряда разведений Цоликлона анти-А - по 50 мкл 2 % взвеси эритроцитов группы А(II), в оба ряда разведений Цоликлона анти-В – по 50 мкл

2 % взвеси эритроцитов группы В(III), в оба ряда разведений Цоликлона анти-Наб, анти-Нн/аб и анти-Нкра – по 50 мкл 2 % взвеси эритроцитов группы О(I). Планшеты инкубировать в течение 45-60 мин при комнатной температуре (18-25оС) и оценить результаты реакции. Отсутствие агглютинации или снижение титра Цоликлона анти-А с эритроцитами группы А(II), Цоликлона анти-В(III) с эритроцитами группы В(III) и Цоликлонов анти-Наб и анти-Нкра с эритроцитами группы О(I) по сравнению с контролем означает ингибирование, то есть абсорбцию Цоликлона СМ соответствующими антигенами слюны. В ряду разведений Цоликлона анти-Нн/аб должна наблюдаться агглютинация эритроцитов,

свидетельствующая об отсутствии абсорбции Цоликлона анти-Нн/аб антигеном Н слюны.

12. Процедура тестирования, включая расчеты и интерпретации *результатов тестирования, и при необходимости информация о целесообразности проведения подтверждающих тестов;*

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.

1. 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.

2. Реакция агглютинации в пробирках.

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

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°C) в течение 30 сек. Затем осторожным встряхиванием отделить осадок от 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.

3. Реакция агглютинации в микроплате.

В три лунки 96-луночного планшета внести по 0,05 мл Цоликлона СМ нужной специфичности, затем в первую лунку добавить 0,05 мл 3% взвеси исследуемых эритроцитов в 0,9% растворе хлористого натрия, во вторую - 0,05 мл 3% взвеси стандартных положительных эритроцитов, а в третью - 0,05 мл 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 агглютинацию 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.

4. 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°C. 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 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°C) 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.

5. 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 –

$A_1, A_2, A_3, \dots, A_x$, необходимо вначале исследовать эритроциты с Цоликлоном анти- $A_{сл}$; положительная реакция агглютинации исследуемых эритроцитов с Цоликлоном анти- $A_{сл}$ свидетельствует о наличии антигена А. Далее эти эритроциты исследуют с помощью Цоликлонов анти-А и анти- A_1 . При положительном результате с Цоликлонами анти-А и анти- A_1 эритроциты принадлежат к варианту A_1 . При положительном результате с Цоликлоном анти-А и отрицательном с анти- A_1 они принадлежат к варианту A_2 . При отрицательной реакции с Цоликлонами анти-А и анти- A_1 и положительной реакции с анти- $A_{сл}$ эритроциты принадлежат к более слабой, чем A_2 , подгруппе (A_3, \dots, A_x).

Возможные результаты реакции агглютинации исследуемых эритроцитов с Цоликлонами СМ анти-А, анти- A_1 и анти- $A_{сл}$ и их интерпретация представлены в таблице.

ЭРИТРОТЕСТ™- ЦОЛИКЛОНЫ	Варианты антигена А			
	A_1	A_2	A_3	A_x
Анти-А	■	■	□	□
Анти- A_1	■	□	□	□
Анти- $A_{сл}$	■	■	■	■

Примечания: ■ - сильная агглютинация (+++); ■ - вариабельная агглютинация (+/+++); ■ - слабая агглютинация (+/+); □ - отсутствие агглютинации.

13. В отношении медицинского изделия для диагностики *in vitro*, предназначенного для самотестирования пользователем или тестирования вблизи пользователя,

Данное медицинское изделие не может использоваться для самотестирования пользователя.

14. Сведения о производителе медицинского изделия для диагностики *in vitro* и его уполномоченном представителе:

ООО «ГЕМАТОЛОГ», Российская Федерация
Москва, 125167, Новый Зыковский проезд, д.4, стр.1
Тел.: (495) 504-90-98, тел/факс: (495) 614-40-51

Представительство ООО «Гематолог» в РК ТОО «AG Medical Company»
РК, 050042, г.Алматы, ул.Пятницкого 79А
Тел./факс: 8(727) 250-17-88, 250-10-21
e-mail: inform@hematolog.kz
web: www.hematolog.kz

*Наименование и контактные данные (телефон, факс, электронная почта) организации, принимающей претензии (предложения) по медицинскому изделию для диагностики *in vitro* от потребителей и организации, ответственной за пострегистрационное наблюдение за*

безопасностью медицинского изделия для диагностики in vitro на территории Республики Казахстан

ТОО «AG Medical Company» Представительство ООО «Гематолог» в РК, расположенное по адресу: 050042, г.Алматы, ул.Пятницкого, 79А, тел./факс: 8(727) 250-17-88, 250-10-21.

15. Данные о выпуске или последнем пересмотре инструкции по применению.

Март 2020 г.