



## ODCZYNNIKI MONOKLONALNE DO BADAŃ GRUPOWYCH KRWI

### INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA

**ODCZYNNIKI MONOKLONALNE ANTY-A, ANTY-B I ANTY-A,B:** do oznaczania metodą probówkową, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, mikroplytkową i szkiełkową.

#### PODSUMOWANIE

W 1900 roku Landsteiner odkrył, że surowica niektórych ludzi wywołuje aglutynację czerwonych krwinek innych osób. Obecnie rozpoznawane są cztery zasadnicze fenotypy: O, A, B i AB. Od tego czasu zidentyfikowano podgrupy A i B.

Na podstawie czerwonych krwinek			Na podstawie surowicy				Fenotyp ABO	% rasy białej <sup>1</sup>
A	B	A,B	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B	O		
+	0	+	0	0	+	0	A	43
0	+	+	+	+	0	0	B	9
0	0	0	+	+	+	0	O	44
+	+	+	0	0	0	0	AB	4

#### PRZEZNACZENIE

Odczynnik ABO to odczynnik do grupowania krwi przeznaczony do jakościowego określania obecności lub braku antygenów A i/lub B na czerwonych krwinkach dawców krwi lub pacjentów wymagających transfuzji krwi, jeżeli badania są wykonywane zgodnie z zalecanymi metodami opisanymi w niniejszej instrukcji użytkownika.

#### ZASADA DZIAŁANIA

Odczynnik zawiera przeciwciała przeciwko odpowiedniemu antygenowi A i/lub B na ludzkich czerwonych krwinkach i powodują bezpośrednią aglutynację (zlepianie) czerwonych krwinek, które zawierają stosowny antygen ABO. Brak aglutynacji oznacza zwykle brak odpowiedniego antygeny ABO na ludzkich czerwonych krwinkach (patrz **Ograniczenia**).

#### ODCZYNNIKI

Odczynnik monoklonalny IgM do badań grupowych ABO krwi firmy Lorne zawiera mysie przeciwciała monoklonalne rozcieńczone w buforze fosforanowym zawierającym chlorek sodu, EDTA i albuminę bydlęcą. Odczynnik nie zawiera ani nie składają się z substancji CMR, substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego ani substancji, które mogą powodować uczulenie lub reakcję alergiczną u użytkownika. Każdy odczynnik jest dostarczany w optymalnym stężeniu dla wszystkich zalecanych metod wymienionych poniżej, bez konieczności dalszego rozcieńczenia lub dodawania. Numer referencyjny partii i data ważności znajdują się na **etykiecie fiołki**.

Produkt	Linia komórkowa/klon	Kolor	Użyty barwnik
Anty-A	9113D10	Błękitny	Błękit patentowy
Anty-B	9621A8	Żółty	Tartrazyna
Anty-A,B	152D12 + 9113D10 + ES15	Bezbarwny	Brak

#### PRZECHOWYWANIE

Po otrzymaniu fiołki z odczynnikami należy przechowywać w temperaturze 2 - 8°C. Długotrwałe przechowywanie w temperaturach poza tym zakresem może spowodować przyspieszony spadek reaktywności odczynnika. Odczynnik został poddany badaniom stabilności podczas transportu w temperaturze 37°C i -25°C, zgodnie z wytycznymi BS EN ISO 23640:2015.

#### POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Próbki krwi mogą być konserwowane w antykoagulantach EDTA, cytrynianie, CPDA lub jako próbka skrzepnięta. Próbkę należy zbadać jak najszybciej po pobraniu. Jeśli wystąpi opóźnienie w badaniu, próbkę należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Próbkę wykazującą znaczny stopień hemolizy lub zanieczyszczenie mikrobiologiczne nie powinny być wykorzystywane do badań. Próbkę krwi wykazującą oznaki lizy mogą dawać niewiarygodne wyniki. Przed badaniem zaleca się (ale nie jest to konieczne) przemywanie wszystkich próbek krwi roztworem PBS lub izotonicznym roztworem soli.

#### ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Odczynnik jest przeznaczony wyłącznie do diagnostycznego użytku *in vitro*.
- Jeśli fiołka z odczynnikami jest pęknięta lub nieszczelna, należy natychmiast wyrzucić zawartość.
- Nie należy używać odczynników po upływie daty ważności (patrz **etykieta fiołki**).
- Nie należy używać odczynników, jeżeli wytrącił się osad.
- Podczas pracy z odczynnikami należy nosić odzież ochronną, taką jak rękawiczki jednorazowe i fartuch laboratoryjny.

- Odczynnik został przefiltrowany przez kapsułkę 0,2 µm w celu zmniejszenia obciążenia biologicznego, ale nie są dostarczane w postaci sterylnej. Po otwarciu fiołki zawartość powinna pozostać zdalna do użycia aż do upływu daty ważności, o ile nie doszło do wyraźnego zmętnienia, co może wskazywać na pogorszenie lub zanieczyszczenie odczynnika.
- Odczynnik zawiera <0,1% azotku sodu. Azotek sodu może być toksyczny w przypadku połknięcia i może reagować z ołowiem i miedzią w rurach kanalizacyjnych, tworząc wybuchowe azydki metali. Podczas usuwania spłukać dużą ilością wody.
- Zadne znane badania nie mogą zagwarantować, że produkty pochodzące od ludzi lub zwierząt są wolne od czynników zakaźnych. Podczas używania i utylizacji każdej fiołki i jej zawartości należy zachować ostrożność.

#### UTYLIZACJA ODCZYNNIKA I POSTĘPOWANIE W PRZYPADKU ROZLANIA

Informacje na temat utylizacji odczynnika i odkażania miejsca rozlania znajdują się w dostępnych na żądanie **kartach charakterystyki materiału**.

#### 1. PRÓBY KONTROLNE I PORADY

- Zaleca się badanie dodatnich i ujemnych prób kontrolnych równoległe z każdą serią badań. Badania należy uznać za nieważne, jeśli próby kontrolne nie dostarczają oczekiwanych wyników.
- Ponieważ te odczynnik nie zawierają wzmacniaczy makrocząsteczkowych, jest bardzo mało prawdopodobne, aby komórki pokryte przeciwciałami IgG wywoływały reakcje fałszywie dodatnie.
- Próbki krwi słabych podgrup A lub B (np. Ax) mogą być źródłem fałszywie ujemnych lub słabych reakcji podczas badania przy użyciu szkiełek, płytek do mikromiareczkowania lub kart żelowych. Wskazane jest ponowne przebadanie słabych podgrup metodą probówkową.
- W przypadku osób w wieku powyżej sześciu miesięcy należy potwierdzić wyniki oznaczenia grupy krwi ABO, badając surowicę lub osocze z użyciem znanych komórek grupy A<sub>1</sub> i B, zanim będzie można potwierdzić grupę krwi ABO.
- Przed użyciem należy odczekać, aż odczynnik ogrzeje się do temperatury pokojowej. Natychmiast po użyciu odczynnika należy ponownie umieścić go w temperaturze 2-8°C.
- W **zalecanych metodach** jedna część wynosi około 50 µl przy użyciu kroplomierza dołączonego do fiołki.
- Wykorzystanie odczynników i interpretacja wyników muszą zostać przeprowadzone przez odpowiednio przeszkolony i wykwalifikowany personel zgodnie z wymogami obowiązującymi w kraju, w którym odczynnik są używane.
- Użytkownik musi określić przydatność odczynników do zastosowania w innych metodach.

#### WYMAGANE ODCZYNNIKI I MATERIAŁY

- Pipety wolumetryczne
- Karty Bio-Rad ID (NaCl, test enzymatyczny i zimne aglutyniny)
- Wirówka Bio-Rad ID
- Roztwór Bio-Rad ID-CellStab lub ID-Diluent 2
- Kasety systemu Ortho BioVue (obojętne)
- Wirówka systemu Ortho BioVue.
- Płyn rozcieńczający Ortho 0,8% Red Cell Diluent
- Szkiełka mikroskopowe lub białe karty
- Aplikatory
- Szklane probówki (10 x 75 mm lub 12 x 75 mm)
- Wirówka na probówkę
- Zatwierdzone mikroplytki U-kształtne
- Wirówka na mikroplytki
- Wytrząsarka do płytek
- Roztwór PBS (pH 6,8-7,2) lub izotoniczny roztwór soli fizjologicznej (pH 6,5-7,5)
- Dodatnie i ujemne próby kontrolne czerwonych krwinek:  
Anty-A: grupa A (dodatnia próba kontrolna) i grupa O (ujemna próba kontrolna)  
Anty-B: grupa B (dodatnia próba kontrolna) i grupa O (ujemna próba kontrolna)  
Anty-A,B: grupa A i grupa B (dodatnia próba kontrolna) i grupa O (ujemna próba kontrolna)

## ZALECANE METODY

### A. Metoda probówkowa

1. Przygotować 2-3% zawiesinę krwinek czerwonych w roztworze PBS lub izotonicznymi roztworze soli fizjologicznej.
2. Umieścić w oznakowanej probówce: 1 część odczynnika Lorne Anti-ABO i 1 część zawiesiny czerwonych krwinek.
3. Dokładnie wymieszać i inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 minutę.
4. Odwirować wszystkie próbki przez 10 sekund z siłą 1000 rcf lub przez stosowny inny czas z odpowiednią siłą.
5. Delikatnie odtworzyć zawiesinę czerwonych krwinek i zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.
6. Wszelkie próbki, które wykazują wynik ujemny lub wątpliwy, należy inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
7. Po inkubacji powtórzyć kroki 4 i 5.

### B. Metoda Bio-Rad-ID (NaCl, test enzymatyczny i karty zimnych aglutynin)

1. Przygotować 0,8% zawiesinę krwinek czerwonych w roztworze ID-CellStab lub ID-Diluent 2.
2. Usunąć folię aluminiową z wymaganej liczby mikroprobówek.
3. Umieścić w odpowiedniej mikroprobówce: 50 µl zawiesiny czerwonych krwinek i 25 µl odczynnika Lorne Anti-ABO.
4. Odwirować karty ID w wirówce na karty żelowe Bio-Rad.
5. Zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.

### C. Metoda Ortho BioVue (kasety obojętne)

1. Przygotować 0,8% zawiesinę krwinek czerwonych w 0,8% roztworze Ortho Red Cell Diluent.
2. Usunąć folię aluminiową z wymaganej liczby komór reakcyjnych.
3. Umieścić w odpowiedniej komorze reakcyjnej: 50 µl zawiesiny czerwonych krwinek i 40 µl odczynnika Lorne Anti-ABO.
4. Odwirować kasetę(-y) w wirówce systemu Ortho BioVue.
5. Zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.

### D. Metoda mikroplytkowa z użyciem płytek dołkowych U-kształtnych

1. Przygotować 2-3% zawiesinę krwinek czerwonych w roztworze PBS lub izotonicznymi roztworze soli fizjologicznej.
2. Umieścić w odpowiednim dołku: 1 część odczynnika Lorne Anti-ABO i 1 część zawiesiny czerwonych krwinek.
3. Dokładnie wymieszać, najlepiej za pomocą wytrząsarki do mikroplytek, uważając, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 15 minut (czas zależny od użytkownika).
5. Odwirować mikroplytkę przez 1 minutę z siłą 140 rcf lub przez stosowny inny czas z odpowiednią siłą.
6. Odtworzyć zawiesinę krwinek przez dokładnie kontrolowane wstrząsanie na wytrząsarce do mikroplytek.
7. Zbadać makroskopowo lub za pomocą zatwierdzonego automatycznego czytnika.
8. Wszelkie słabe reakcje należy powtórzyć metodą probówkową.

### E. Metoda szkiełkowa

1. Przygotować 35-45% zawiesinę czerwonych krwinek w surowicy, osoczu, PBS lub izotonicznym roztworze soli fizjologicznej lub użyć antykoagulowanej krwi pełnej (w osoczu własnym).
2. Umieścić na szkiełku lub karcie: 1 część odczynnika Lorne Anti-ABO i 1 część zawiesiny czerwonych krwinek.
3. Używając czystego aplikatora, wymieszać odczynnik i komórki na powierzchni około 20 x 40 mm.
4. Powoli przechylać szkiełko w przód i w tył przez 30 sekund, od czasu do czasu mieszając podczas tego 1-minutowego procesu, utrzymując szkiełko w temperaturze pokojowej.
5. Zbadać makroskopowo po 1 minucie nad rozproszonym światłem, uważając, aby nie pomylić włókien fibrynowych z aglutynacją.
6. Wszelkie słabe reakcje należy powtórzyć metodą probówkową.

## INTERPRETACJA WYNIKÓW BADAŃ

1. **Wynik dodatni:** Aglutynacja czerwonych krwinek stanowi dodatni wynik badania, a przy zaakceptowanych ograniczeniach procedury testowej wskazuje na obecność odpowiedniego antygenu ABO na czerwonych krwinkach.
2. **Wynik ujemny:** Brak aglutynacji czerwonych krwinek stanowi ujemny wynik badania, a przy zaakceptowanych ograniczeniach procedury testowej wskazuje na brak odpowiedniego antygenu ABO na czerwonych krwinkach.
3. **Rozbieżności:** Jeśli wyniki uzyskane na podstawie surowicy nie odpowiadają wynikom uzyskanym na podstawie czerwonych krwinek, wymagane jest dalsze badanie.

## STABILNOŚĆ REAKCJI

1. Wyniki badań metodą probówkową i mikroplytkową należy odczytać natychmiast po odwirowaniu.

2. Badania wykonane metodą szkiełkową powinny być interpretowane po maksymalnie jednej minucie, aby zapewnić swoistość testu i uniknąć możliwości błędnego zinterpretowania wyniku ujemnego jako wyniku dodatniego z powodu wyschnięcia odczynnika.
3. Należy zachować ostrożność podczas interpretacji wyników badań przeprowadzonych w temperaturach innych niż zalecane.

## OGRANICZENIA

1. Ponieważ antygeny ABO nie są w pełni rozwinięte po urodzeniu, w przypadku próbek krwi pępowinowej lub krwi noworodka mogą wystąpić słabsze reakcje.
2. Podczas korzystania z odczynników monoklonalnych anti-A,B próbki krwi słabych podgrup A lub B (np. Ax) mogą być źródłem fałszywie ujemnych lub słabych reakcji podczas badania przy użyciu szkiełek, płytek do mikromiareczkowania lub kart żelowych. Wskazane jest ponowne przebadanie słabych podgrup metodą probówkową.
3. Ponieważ odczynniki monoklonalne anti-A i anti-B firmy Lorne nie zostały zatwierdzone do wykrywania odpowiednio antygenów Ax i A3 lub Bx i B3, firma nie udziela żadnych zapewnień dotyczących reaktywności odczynnika monoklonalnego anti-A lub anti-B w obecności tych słabych podgrup A i B.
4. Przechowywana krew może wykazywać słabsze reakcje niż świeża krew.
5. Wyniki fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne mogą również wystąpić z następujących przyczyn:
  - zanieczyszczenie materiałów testowych;
  - niewłaściwe przechowywanie, stężenie komórek, czas inkubacji lub temperatura;
  - niewłaściwe lub nadmierne odwirowanie;
  - odstępstwo od zalecanych metod;
  - zanieczyszczenie próbek krwi pępowinowej galaretą Whartona.

## SWOISTY CHARAKTER DZIAŁANIA

1. Przed dopuszczeniem do obrotu każdą partię odczynnika monoklonalnego Lorne ABO przebadano przy użyciu zalecanych metod testowych wymienionych w niniejszej instrukcji użytkownika. Badania były zgodne z wymogami testowymi określonymi w aktualnej wersji/wydaniu „Wtycznych dotyczących transfuzji krwi w Wielkiej Brytanii” (Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom)<sup>3</sup> oraz „Wspólnych specyfikacji technicznych” (Common Technical Specifications).
2. Swoistość źródłowych przeciwciał monoklonalnych wykazano za pomocą panelu komórek antygenowo ujemnych.
3. Siła działania odczynników została przebadana według następujących minimalnych wzorców odniesienia siły działania określonych przez Krajowy Instytut Norm Biologicznych i Kontroli (National Institute of Biological Standards and Controls, NIBSC):
  - norma referencyjna anti-A 03/188 i/lub
  - norma referencyjna anti-B 03/164
4. Odczynnik anti-B firmy Lorne nie reaguje z krwinkami czerwonymi z „nabytym antygenem B”.
5. Odczynniki monoklonalne ABO firmy Lorne nie wykrywają antygenów układu T, takich jak T, Tn lub Cad.
6. Kontrolę jakości odczynników przeprowadzono przy użyciu czerwonych krwinek z fenotypami, które zostały zweryfikowane przez brytyjskie centrum krwiodawstwa i zostały przed użyciem przemylete za pomocą roztworu PBS lub izotonicznego roztworu soli fizjologicznej.

## OGRANICZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI

1. Użytkownik ponosi odpowiedzialność za działanie odczynników podczas korzystania z dowolnej metody innej niż wymienione **zalecane metody**.
2. Wszelkie odstępstwa od **zalecanych metod** powinny zostać zweryfikowane przed użyciem<sup>5</sup>.

## LITERATURA

1. Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; str. 181.
2. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; rozdz. 6.
3. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6<sup>th</sup> Edition 2002. The Stationary Office.
4. AABB Technical Manual, 16<sup>th</sup> edition, AABB 2008.
5. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 1995, 5, 145-150.

## DOSTĘPNE WIELKOŚCI OPAKOWAŃ ODCZYNNIKÓW

	Pojemność fiołki	Numer katalogowy	Badań na fiołkę
Monoklonalne anti-A	10 ml	600010	200
	1000 ml	600000*	20 000
	5000 ml	600000X5*	100 000
Monoklonalne anti-B	10 ml	610010	200
	1000 ml	610000*	20 000
	5000 ml	610000X5*	100 000

Monoklonalne anty-A,B	10 ml	620010	200
	1000 ml	620000*	20 000
	5000 ml	620000X5*	100 000

\*Fiolki o tej pojemności są przeznaczone wyłącznie do dalszego wykorzystania produkcyjnego (FFMU), dlatego nie są oznaczone znakiem CE.



**Lorne Laboratories Limited**  
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate  
Danehill  
Lower Earley  
Berkshire, RG6 4UT  
Wielka Brytania  
Tel.: +44 (0) 118 921 2264  
Faks: +44 (0) 118 986 4518  
E-mail: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2<sup>nd</sup> Flr.,  
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta