

## ČINIDLA PRO STANOVENÍ KREVŇNÍCH SKUPIN NÁVOD K POUŽITÍ

**Anti-C, Anti-E, Anti-c a Anti-e Monoclonal:** Určeno pro testy ve zkumavce, na mikrotitrační destičce, sklíčku a metody Bio-Rad-ID a Ortho BioVue.

### SHRNUTÍ

Levine a Stetson objevili Rh systém krevních skupin v roce 1940. Kromě přítomnosti D další významné Rh antigeny zahrnují C, E, c a e. Antigen D je vysoce imunogenní; antigeny C a e jsou méně imunogenní než E a c. Odpovídající protilátky jsou všechny klinicky významné, protože mohou vyvolávat jak potransfuzní reakce, tak hemolytickou nemoc novorozenců.

### URČENÉ POUŽITÍ

Činidla Rh ke stanovení krevních skupin jsou určena ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti, nebo nepřítomnosti antigenů Rh na povrchu červených krvinek dárců krve nebo pacientů, kteří potřebují krevní transfuzi, za předpokladu, že testy probíhají v souladu s doporučenými postupy stanovenými v tomto návodu k použití.

### PRINCIP

Činidla obsahují protilátky proti příslušnému antigenu Rhesus na povrchu lidských červených krvinek a způsobují přímou aglutinaci (shlukování) červených krvinek, které nesou odpovídající antigen Rh. Nepřítomnost aglutinace (nepřítomnost shlukování) obecně indikuje nepřítomnost odpovídajícího antigenu Rh (viz část **Omezení**).

### ČINIDLA

Lorne Monoclonal IgM Anti-Rh jsou nízkoproteinová činidla ke stanovení krevních skupin, která obsahují monoklonální protilátky v roztoku chloridu sodného, hovězího albuminu a makromolekulárních potenciátorů (4,0 g%). Činidla neobsahují látky karcinogenní, mutagenní nebo toxické pro reprodukci (CMR), látky narušující endokrinní systém ani látky, které by mohly u uživatele vyvolat senzibilizační nebo alergickou reakci. Každé činidlo je dodáváno v optimálním ředění vhodném k použití všemi doporučenými postupy uvedenými dále, aniž by bylo nutné další ředění nebo doplnění. Referenční číslo šarže a datum expirace je uvedeno na **štítku na nádobě**.

Činidlo	Buněčná kultura / klon
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

### SKLADOVÁNÍ

Nádoby s činidlem je třeba po převzetí uchovávat při teplotě 2–8 °C. Dlouhodobé skladování mimo uvedené teplotní rozmezí může urychlit snížení reaktivity činidla. Toto činidlo bylo podrobeno studiím stability při přepravě při teplotě 37 °C a –25 °C, jak uvádí dokument BS EN ISO 23640:2015.

### ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Krev lze odebírat do antikoagulantů EDTA, citrát nebo CPDA, případně ve formě sražených vzorků. Vzorky je třeba testovat co nejdříve po odběru. Pokud dojde při testování ke zpoždění, uchovávejte vzorky při teplotě 2–8 °C. Vzorky, které vykazují výraznou hemolýzu nebo mikrobiální kontaminaci, nelze k testování použít. Výsledky testování vzorků krve s průkaznou lýzou mohou být nespolehlivé. Před testováním je vhodné (nikoli však nezbytné) veškeré krevní vzorky promýt ve fosfátém pufovaném (PBS) nebo izotonickém (Isotonic) fyziologickém roztoku.

### UPOZORNĚNÍ

- Činidla jsou určena výhradně k diagnostice *in vitro*.
- Je-li nádoba s činidlem prasklá nebo netěsná, okamžitě obsah zlikvidujte.
- Nepoužívejte činidla po datu použitelnosti (viz **štítek na nádobě**).
- Nepoužívejte činidla, pokud obsahují sraženinu.
- Při manipulaci s činidly je třeba používat ochranný oděv, například jednorázové rukavice a laboratorní plášť.
- Činidla byla filtrována přes 0,2 μm kapsli z důvodu snížení biologické zátěže, ale nejsou dodávána sterilní. Po otevření nádoby zůstává obsah použitelný až do data expirace, pokud není výrazně zkalený, což může být známka zhoršené kvality nebo kontaminace činidla.
- Činidla obsahují < 0,1 % azidu sodného. Azid sodný může být při požití toxický a může reagovat s olověným a měděným potrubím za vzniku výbušných azidů kovů. Při likvidaci spláchněte velkým množstvím vody.
- Schválené mikrobiologické testy zdrojových materiálů použitých k výrobě produktů prokázaly, že jsou negativní vůči protilátkám HIV 1+2 a HCV a antigenu HBsAg.
- Žádné známé testy nemohou zaručit, že produkty získané z lidského nebo živočišného zdroje neobsahují infekční původce. Při používání a likvidaci každé jednotlivé nádoby a jejího obsahu je třeba postupovat opatrně.

### LIKVIDACE ČINIDLA A POSTUP PŘI ROZLÍTÍ

Informace o likvidaci činidla a dekontaminaci místa, kde došlo k jeho rozlítí, najdete v **bezpečnostních listech**, které jsou k dispozici na vyžádání.

### KONTROLY A POKYNY

- V každé sérii testů je doporučeno provádět současně testování pozitivní (nejlépe heterozygotní) a negativní kontroly. Pokud kontroly neukazují očekávané výsledky, považujte testy za neplatné.
- Při typizaci červených krvinek pacientů s potvrzenou nebo suspektní diagnózou, že mají autoprotilátky, abnormality sérových proteinů nebo pozitivní přímý antiglobulinový test (DAT), je důležité současně provést negativní kontrolu činidla. Jako negativní kontrolu činidla je nutné použít výhradně Lorne Monoclonal Rh Control (katalogové číslo 640010).
- Míra detekce slabých antigenů Rh metodou s využitím gelové karty, mikrotitrační destičky nebo sklíčka může být nízká. Slabé antigeny Rh je doporučeno testovat zkumavkovou metodou.
- Před použitím nechte činidlo zahřát na pokojovou teplotu. Po použití vraťte činidlo ihned zpět na úložné místo při teplotě 2–8 °C.
- V části **Doporučené metody** představuje jedna objemová jednotka přibližně 50 μl při použití kapátka dodávaného s balením.
- Používat činidlo a interpretovat výsledky smí pouze řádně vyškolený a kvalifikovaný personál v souladu s požadavky země, kde jsou činidla používána.
- Vhodnost použít činidla při jiných metodách je na posouzení uživatele.

### ČINIDLA A POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ BALENÍ

#### Zkumavková metoda

- skleněné zkumavky (10 x 75 mm nebo 12 x 75 mm)
- odstředivka umožňující odstřeďovat při 1000 g po dobu 20 sekund
- fosfátém pufovaný fyziologický roztok (PBS) (pH 6,8–7,2) nebo izotonický fyziologický roztok (Isotonic) (pH 6,5–7,5)
- červené krvinky pro pozitivní a negativní kontrolu:  
Monoclonal Anti-C: R<sub>1</sub>r (pozitivní kontrola) a rr (negativní kontrola)  
Monoclonal Anti-E: R<sub>2</sub>r (pozitivní kontrola) a rr (negativní kontrola)  
Monoclonal Anti-c: R<sub>1</sub>r (pozitivní kontrola) a R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> (negativní kontrola)  
Monoclonal Anti-e: R<sub>2</sub>r (pozitivní kontrola) a R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (negativní kontrola)

#### Metoda typizace Bio-Rad-ID Micro

- karty Bio-Rad ID (NaCl, enzymový test a chladové aglutininy)
- odstředivka Bio-Rad ID
- roztok Bio-Rad ID-CellStab nebo ID-Diluent 2

#### Metoda typizace Ortho BioVue

- kazety systému Ortho BioVue (Neutrální)
- odstředivka systému Ortho BioVue
- ředící činidlo Ortho 0,8% Red Cell Diluent

#### Metoda s využitím mikrotitračních destiček

- validované mikrotitrační destičky s „U“ jamkami
- odstředivka určená pro mikrotitrační destičky
- třepačka mikrotitračních destiček

#### Sklíčková metoda

- mikroskopická sklíčka nebo bílé karty
- aplikační tyčinky
- časovač nebo stopky

#### Všechny metody

- odměrné pipety

### DOPORUČENÉ METODY

#### A. Zkumavková metoda

- Ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic připravte 2–3% suspenzi červených krvinek.
- Do štítkem označené zkumavky přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Anti-Rh a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
- Důkladně promíchejte a odstřeďujte všechny zkumavky po dobu 20 sekund při odstředivé síle 1000 RCF, případně dobu a sílu odstředění vhodně upravte.
- Sedimentované červené krvinky jemně znovu resuspendujte a makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.
- Veškeré zkumavky, které vykazují negativní nebo nejednoznačný výsledek, je třeba inkubovat při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
- Po inkubaci zopakujte kroky 3 a 4.

#### B. Metoda Bio-Rad-ID (karty NaCl, enzymový test a chladové aglutininy)

- V roztoku ID-CellStab nebo ID-Diluent 2 připravte 0,8% suspenzi červených krvinek.

- Z potřebného množství mikrozkuvek na ID kartě NaCl, enzymový test a chladové aglutininy (NaCl/Enzyme/Cold) odstraňte hliníkovou fólii.
- Do příslušné mikrozkuvky přidejte: 50 µl suspenze červených krvinek a 25 µl činidla Lorne Anti-Rh.
- Odstředte ID kartu/karty v odstředivce Bio-Rad ID.
- Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

#### C. Metoda Ortho BioVue (Neutrální kazety)

- V 0,8% roztoku Ortho Red Cell Diluent připravte 0,8% suspenzi červených krvinek.
- Z potřebného množství reakčních komůrek na Neutrální kazetě odstraňte hliníkovou fólii.
- Do příslušné reakční komůrky přidejte: 50 µl suspenze červených krvinek a 40 µl činidla Lorne Anti-Rh.
- Odstředte kazetu/kazety v odstředivce systému Ortho BioVue po dobu 5 minut.
- Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

#### D. Metoda s využitím mikrotitračních destiček s „U“ jamkami

- Ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic připravte 2–3% suspenzi červených krvinek.
- Do příslušné jamky přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Anti-Rh a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
- Důkladně promíchejte, nejlépe na mikrotitrační třepačce, a dbejte, aby nedošlo mezi jamkami ke křížové kontaminaci.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 15 minut (čas určuje uživatel).
- Odstředte mikrotitrační destičku po dobu 1 minuty při odstředivé síle 140 RCF, případně dobu a sílu odstředění vhodně upravte.
- Řízeným pohybem na mikrotitrační třepačce sedimentované buňky znovu resuspendujte.
- Makroskopicky nebo pomocí validované automatické čtečky odečtěte výsledek.
- Slabé reakce je třeba vždy zopakovat s využitím zkumavkové metody.

#### E. Sklíčková metoda

- V séru, plazmě nebo fyziologickém roztoku PBS či Isotonic připravte 35–45% suspenzi červených krvinek. Pokud to není možné, lze rovněž použít jako vzorek plnou krev s antikoagulantem.
- Na štítkem označené mikroskopické sklíčko nebo kartu přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Anti-Rh a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
- Pomocí čisté aplikační tyčinky smíchejte činidlo a buňky na ploše přibližně 20 x 40 mm.
- Při pokojové teplotě jemně sklíčkem kývejte dopředu a dozadu po dobu 1 minuty.
- V rozptýleném světle odečtěte po 1 minutě makroskopicky výsledek a nezaměňujte fibrinová vlákna za aglutinaci.
- Slabé reakce je třeba vždy zopakovat s využitím zkumavkové metody.

#### INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU

- Pozitivní:** Aglutinace červených krvinek znamená pozitivní výsledek testu a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje přítomnost odpovídajícího antigenu Rh na červených krvinkách.
- Negativní:** Nepřítomnost aglutinace červených krvinek znamená negativní výsledek a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje nepřítomnost odpovídajícího antigenu Rh na červených krvinkách.
- Kontrola:** Výsledky testů buněk, u nichž došlo k aglutinaci s využitím negativní kontroly činidla, je třeba vyloučit, jelikož aglutinace je s největší pravděpodobností způsobena reakcí makromolekulárních potenciátorů v činidle se senzibilizovanými buňkami.

#### STABILITA REAKCÍ

- U všech testů ve zkumavkách a na mikrotitračních destičkách odečtěte výsledky ihned po odstředění.
- Sklíčkové testy je nezbytné interpretovat do jedné minuty, aby byla zajištěna specifita a vyloučena možnost, že negativní výsledek bude mylně interpretován jako pozitivní v důsledku zasychání činidla.
- Při interpretaci výsledků testů prováděných při jiných než doporučených teplotách postupujte obezřetně.

#### OMEZENÍ

- Činidla Lorne Anti-Rh není vhodné používat s buňkami ošetřenými enzymy nebo v rámci nepřímých antiglobulinových metod.
- U řady monoklonálních lidských protilátek IgM anti-Rh bylo prokázáno, že vyvíjejí anti-I/II chladovou aglutininovou aktivitu, zejména s buňkami pupečnickové krve a buňkami ošetřenými enzymy. Tato aktivita se může projevit, pokud jsou testované vzorky inkubovány při nižší než doporučené teplotě.
- Některé červené krvinky exprimují variantní antigeny Rh a mohou vykazovat slabší reakce, než je obvyklé u náhodně vybraných pozitivních kontrolních buněk. Anti-C může vykazovat u jedinců s fenotypem R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> slabší reakci s antigenem C. Podobně Anti-e může mít slabší reakci za nepřítomnosti antigenu C, např. R<sub>2</sub>r, r<sup>r</sup>r a rr.
- Potlačená nebo snížená exprese antigenů některých krevních typů může naopak vést k falešně negativní reakci. Proto je třeba vždy postupovat obezřetně, když na základě výsledků testů stanovujete genotypy.
- Falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky mohou vzniknout v důsledku následujících faktorů:
  - kontaminace testovaného materiálu
  - nevhodné skladování, koncentrace buněk, inkubační doba či teplota
  - nevhodné nebo nadměrné odstředování
  - nedodržení doporučených metod

#### SPECIFICKÁ CHARAKTERISTIKA TESTU

- Každá šarže činidla Rh byla před uvedením na trh testována za použití doporučených testovacích metod uvedených v tomto návodu k použití. Testy splnily testovací požadavky, které jsou obsahem aktuální verze či vydání pokynů pro služby transfuze krve ve Spojeném království („Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom“) a obecných technických specifikací.
- Specifita zdrojových monoklonálních protilátek byla prokázána pomocí panelu antigen-negativních buněk.
- Kontrola kvality činidel byla provedena s využitím červených krvinek s fenotypy, které ověřila transfuzní stanice ve Spojeném království a které byly před použitím promyty ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic.

#### VYLOUČENÍ ODPOVĚDNOSTI

- Za účinnost činidel použitých jinými technikami, než které jsou uvedeny v části **Doporučené metody**, odpovídá uživatel.
- Jakékoli odchylky od **doporučených metod** je třeba před použitím validovat<sup>5</sup>.

#### BIBLIOGRAFIE

- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3. vydání, Montgomery Scientific, Miami, 1985, kapitola 10.
- AABB Technical Manual, 16. vydání, AABB 2008.
- Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. Transfusion Medicine 1995, 5, 171-184
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6. vydání 2002. The Stationary Office.
- 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.

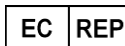
#### DOSTUPNÉ VELIKOSTI BALENÍ ČINIDEL

	Objem nádoby	Katalogové číslo	Počet testů na nádobu
Anti-C Monoclonal	5 ml	690005	100
	1000 ml	690000*	20 000
Anti-E Monoclonal	5 ml	691005	100
	1000 ml	691000*	20 000
Anti-c Monoclonal	5 ml	692005	100
	1000 ml	692000*	20 000
Anti-e Monoclonal	5 ml	693005	100
	1000 ml	693000*	20 000

\*Tato velikost je určena pouze pro další výrobní účely (For Further Manufacturing Use; FFMU), a proto nemá označení CE.



**Lorne Laboratories Limited**  
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate  
Danehill  
Lower Earley  
Berkshire, RG6 4UT  
Spojené království  
Tel: +44 (0) 118 921 2264  
Fax: +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