

**KRAUJO GRUPĖS NUSTATYMO REAGENTAI**  
**NAUDOJIMO INSTRUKCIJOS**

**„Anti-C“, „Anti-E“, „Anti-c“ ir „Anti-e“ monokloniniai: testams atlikti „Bio-Rad-ID“, „Ortho BioVue“ metodais, mėgintuvėliuose ir mikroplokštelėse ant plokštumos.**

**SANTRAUKA**

Levine ir Stetson 1940 metais atrado Rh kraujo grupių sistemą. Be D, kiti svarbiausi Rh sistemos antigenai yra C, E, c ir e. D antigenas yra labai imunogeniškas, C ir e antigenai yra mažiau imunogeniški nei E ir c antigenai. Taip pat klinikiškai svarbūs ir visi atitinkami antikūnai, nes jie gali sukelti potransfuzinių reakcijų ir naujų hemolizinių ligų.

**NUMATYTOJI PASKIRTIS**

Rh reagentai yra reagentai kraujo grupei nustatyti, skirti kokybiniam testui, kad būtų galima nustatyti Rh antigenų buvimą ar nebuvimą ant kraujo donoro ar pacientų, kuriems reikia perpilti kraujo, raudonųjų ląstelių, testą atliekant šioje naudojimo instrukcijoje rekomenduojamais metodais.

**PRINCIPAS**

Reagentuose yra antikūnų atitinkamam žmogaus raudonųjų ląstelių Rh antigenui, ir šie sukels tiesioginę raudonųjų ląstelių, turinčių atitinkamą Rh antigeną, agliutinaciją (sulipimą). Agliutinacijos (sulipimo) nebuvimas reiškia, kad atitinkamų Rh antigenų nėra (žr. **Ribojimai**).

**REAGENTAI**

„Lorne“ monokloniniai IgM „Anti-Rh“ reagentai kraujo grupei nustatyti yra reagentai su nedideliu baltymų kiekiu, kuriame yra monokloninių antikūnų, praskiestų natrio chloridu, jaučio albuminiais ir makromolekuliniemis agliutinaciją stiprinančiomis medžiagomis (4,0 g%). Reagentų sudėtyje nėra CMR medžiagų ar endokrininę sistemą ardančių medžiagų, kurios galėtų jautrinti naudotoją ar sukelti jam alerginių reakcijų. Kiekvienas reagentas tiekiamas tinkamai praskiestas naudoti taikant toliau nurodytus rekomenduojamus metodus, jų skiesti ar papildyti nereikia. Gaminio serijos numeris ir tinkamumo naudoti pabaigos data nurodyta **buteliuko etiketėje**.

Reagentas	Ląstelių linija / klonas
„Anti-C“	MS-24
„Anti-E“	MS-258
„Anti-c“	MS-33
„Anti-e“	MS-16 + MS-63

**LAIKYMAS**

Gautus reagentus reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje. Ilgiau reagentus laikant netinkamoje temperatūroje gali pagreitėti reagento reaktyvumo mažėjimas. Atlikti šio reagento stabilumo gabenant tyrimai 37 °C ir –25 °C temperatūroje, kaip aprašyta dokumente BS EN ISO 23640:2015.

**MĖGINIŲ PAĖMIMAS IR PARUOŠIMAS**

Kraujo mėginius galima surinkti į mėgintuvėlius su EDTA, citrato, CPDA antikoaguliantais arba kaip mėginį su krešuliu. Paėmus mėginius, juos reikia kuo greičiau iširti. Jei testas atliekamas vėliau, mėginius laikykite 2–8 °C temperatūroje. Mėginiai, kuriuose stebima ryški hemolizė ar mikrobinė tarša, tyrimui netinka. Kraujo mėginių, kuriuose įvyko ląstelių lizė, testo rezultatai gali būti nepatikimi. Pageidautina (bet nebūtina) prieš atliekant testą visus kraujo mėginius plauti PBS (fosfatinio buferio fiziologiniu) arba izotoniniu fiziologiniu tirpalu.

**ATSARGUMO PRIEMONĖS**

1. Reagentai skirti tik diagnostikai *in vitro*.
2. Jeigu reagento buteliukas įskilęs arba nesandarus, nedelsdami išpilkite turinį.
3. Pasibaigus tinkamumo naudoti datai, reagentų nenaudokite (žr. **buteliuko etiketę**).
4. Jeigu yra precipitato, reagentų nenaudokite.
5. Tvarkant reagentus reikia vilkėti apsauginius drabužius, pavyzdžiui, mūvėti vienkartinę pirštines ir dėvėti laboratorinį apsiaustą.
6. Reagentai buvo filtruoti per 0,2 μm kapsulę, kad būtų galima sumažinti biologinę taršą, tačiau tiekiami nesterilūs. Atidarius buteliuką, turinys iki tinkamumo naudoti pabaigos datos yra tinkamas naudoti, jeigu reagentas akivaizdžiai nedrumstas; drumstumas gali rodyti reagento suirimą ar taršą.
7. Reagentuose yra < 0,1 % natrio azido. Natrio azidas gali būti toksiškas nurijus ir gali reaguoti su vandentiekio švino ir vario vamzdžiais, sudaryti labai sprogių metalo azidų junginių. Išpylę nuskalaukite dideliu vandens kiekiu.
8. Produktams gaminti naudojamos pirminės medžiagos buvo tiriamos taikant patvirtintus mikrobiologinius testus, jose antikūnų ŽIV 1+2 ir HCV neaptikta.
9. Jokie testai negali užtikrinti, kad iš žmogaus ar gyvūninės kilmės medžiagų pagamintuose produktuose nėra infekcinių ligų sukėlėjų. Naudojant ir šalinant kiekvieną buteliuką bei jo turinį reikia būti atsargiems.

**REAGENTŲ ŠALINIMAS IR IŠSILIEJUSIŲ MEDŽIAGŲ TVARKYMAS**

Informacijos, kaip šalinti reagentus ir nukenksminti vietą, kurioje išsiliejo medžiagos, pateikiama **Medžiagos saugos duomenų lapuose**, o jie pateikiami paprašius.

**KONTROLĖ IR PATARIMAI**

1. Kartu su kiekviena testų partija rekomenduojama atlikti teigiamos (idealiu atveju heterozigotinės) ir neigiamos kontrolės testus. Jeigu tiriant kontrolinius mėginius laukiamų testo rezultatų negaunama, testų rezultatai laikomi nevertinamais.
2. Tiriant paciento, kuriam įtariamas autoantikūnų buvimas, baltymų patologija ar teigiamas tiesioginis antiglobulinų testas (DAT), raudonąsias ląsteles svarbu kartu atlikti testą su reagento neigiama kontrole. Reagento neigiamai kontrolei būtina naudoti tik „Lorne“ „Monoclonal Rh Control“ reagentą, katalogo numeris 640010.
3. Silpni Rh antigenai ant gelio plokštelių, mikrotitravimo plokštelėse ir ant plokštumos gali būti aptinkami prasčiau. Silpniems Rh antigenams testą rekomenduojama atlikti mėgintuvėliuose.
4. Prieš naudodami reagentus, leiskite jiems sušilti iki patalpos temperatūros. Panaudoję reagentą, jį iš karto padėkite saugoti 2–8 °C temperatūroje.
5. Skyriuje **Rekomenduojami metodai** vienas tūris yra apytiksliai 50 μl naudojant buteliuką su lašintuvu.
6. Reagentus naudoti ir rezultatus interpretuoti turi tinkamai išmokyti ir kvalifikuoti darbuotojai, laikydamiesi šalies, kurioje naudojami reagentai, reikalavimų. Naudotojas privalo nustatyti reagentų tinkamumą naudoti taikant kitus metodus.

**REIKALINGOS, BET NETIEKIAMOS MEDŽIAGOS IR REAGENTAI**

**Mėgintuvėlių metodas**

- Stikliniai mėgintuvėliai (10 x 75 mm arba 12 x 75 mm).
- Centrifuga, tinkama centrifuguoti 1 000 g jėga 20 sekundžių.
- PBS tirpalas (pH 6,8–7,2) arba izotoninis fiziologinis tirpalas (pH 6,5–7,5).
- Teigiamos ir neigiamos raudonųjų ląstelių kontrolės reagentai. Monokloninis „Anti-C“: R<sub>1r</sub> (teigiama kontrolė) ir rr (neigiama kontrolė). Monokloninis „Anti-E“: R<sub>2r</sub> (teigiama kontrolė) ir rr (neigiama kontrolė). Monokloninis „Anti-c“: R<sub>1r</sub> (teigiama kontrolė) ir R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> (neigiama kontrolė). Monokloninis „Anti-e“: R<sub>2r</sub> (teigiama kontrolė) ir R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (neigiama kontrolė).

**„Bio-Rad-ID“ mikrotipavimo metodas**

- „Bio-Rad ID“ kortelės (NaCl, fermentų testas ir šalcio agliutininiai).
- „Bio-Rad“ ID centrifuga.
- „Bio-Rad“ „ID-CellStab“ reagentas arba „ID-Diluent 2“ skiediklis.

**„Ortho BioVue“ tipavimo metodas**

- „Ortho BioVue System“ kasetės (neutralios).
- „Ortho BioVue System“ centrifuga.
- „Ortho“ 0,8 % raudonųjų ląstelių skiediklis.

**Mikrotitravimo plokštelės metodas**

- Validuotos U formos šulinėlių mikrotitravimo plokštelės.
- Mikrotitravimo plokštelių centrifuga.
- Mikrotitravimo plokštelių purtyklė.

**Plokštumos metodas**

- Mikroskopiniai stikleliai ar baltos plokštelės.
- Aplikaciniai pagaliukai.
- Laikmatis arba chronometras

**Visi metodai**

- Tūrij matuojančios pipetės.

**REKOMENDUOJAMI METODAI**

**A. Mėgintuvėlių metodas**

1. PBS ar izotoniniame fiziologiniame tirpale paruoškite 2–3 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Į paženklinatą mėgintuvėlį įlašinkite vieną „Lorne“ „Anti-Rh“ reagento tūrij ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrij.
3. Visus mėgintuvėlius kruopščiai centrifuguokite 20 sekundžių 1 000 rcf ar kita tinkama jėga tinkamą laiką.
4. Švelniai išsklaidykite raudonųjų ląstelių sankaupą ir makroskopiškai įvertinkite agliutinaciją.
5. Visus mėgintuvėlius, kuriuose testo rezultatas yra neigiamas arba abejotinas, reikia 15 min. laikyti patalpos temperatūroje.
6. Po inkubacijos pakartokite 3 ir 4 veiksmus.

## B. „Bio-Rad ID“ metodas (NaCl, fermentų testo ir šalčio agliutininų kortelės)

1. „ID-CellStab“ reagente ar „ID-Diluent 2“ skiediklyje paruoškite 0,8 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Nuo reikiamo skaičiaus mikromėgintuvėlių su NaCl, fermentų ir šalčio agliutininų ID kortelių nuimkite aluminio foliją.
3. Į atitinkamą mikromėgintuvėlių įlašinkite: 50 µl raudonųjų ląstelių suspensijos ir 25 µl „Lorne“ „Anti-Rh“ reagento.
4. ID kortelę (-es) centrifuguokite „Bio-Rad ID“ centrifugoje.
5. Makroskopiškai įvertinkite agliutinaciją.

## C. „Ortho BioVue“ metodas (neutralios kasetės)

1. 0,8 % „Ortho“ raudonųjų ląstelių skiediklyje paruoškite 0,8 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Nuo reikiamo neutralios kasetės reakcijos kamerų skaičiaus nuimkite aluminio foliją.
3. Į atitinkamą reakcijos kamerą įlašinkite: 50 µl raudonųjų ląstelių suspensijos ir 40 µl „Lorne“ „Anti-Rh“ reagento.
4. Kasetę (-es) 5 minutes centrifuguokite „Ortho BioVue System“ centrifugoje.
5. Makroskopiškai įvertinkite agliutinaciją.

## D. Mikroplokštelių metodas naudojant U formos šulinėlius

1. PBS ar izotoniniame fiziologiniame tirpale paruoškite 2–3 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Į atitinkamą šulinėlį įlašinkite: vieną „Lorne“ „Anti-Rh“ reagento tūrį ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrį.
3. Krūpščiai sumaišykite, pageidautina, naudodami mikroplokštelių purtyklę, pasirūpinkite, kad būtų išvengta kryžminės šulinėlių taršos.
4. Mikroplokštelės laikykite 15 minučių kambario temperatūroje (laikas priklauso nuo naudotojo).
5. Mikroplokštelę centrifuguokite 1 minutę 140 rcf ar kita tinkama jėga tinkama laiką.
6. Atsargiai išsklaidykite ląstelių sankaupas kontroliuojamai purtydami mikroplokštelių purtyklėje.
7. Įvertinkite makroskopiškai arba validuotą automatinį vertinimo prietaisu.
8. Visas silpnas reakcijas reikia pakartoti mėgintuvėlių metodu.

## E. Plokštumos metodas

1. Serume, plazmoje, PBS ar izotoniniame fiziologiniame tirpale paruoškite 35–45 % raudonųjų ląstelių suspensiją. Jei to padaryti neįmanoma, galima naudoti kraują su antikoagulantais mėginį.
2. Ant paženklinoto stiklėlio ar plokštelės užlašinkite: vieną „Lorne“ „Anti-Rh“ reagento tūrį ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrį.
3. Švari aplikaciniu pagaliuku maždaug 20 x 40 mm plote reagentą sumaišykite su ląstelėmis.
4. Plokštelę laikydami patalpos temperatūroje, lėtai ją 1 minutę vartykite į priekį ir atgal.
5. Po 1 minutės išsklaidytoje šviesoje makroskopiškai įvertinkite rezultatą; fibrino siūlų nesupainiokite su agliutinacija.
6. Visas silpnas reakcijas reikia pakartoti mėgintuvėlių metodu.

## TESTO REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

1. **Teigiamas:** testą atlikus paisant priimtinių procedūros ribų, raudonųjų ląstelių agliutinacija rodo teigiamą testo rezultatą, o jis reiškia, kad ant raudonųjų ląstelių yra atitinkamas Rh antigenas.
2. **Neigiamas:** testą atlikus paisant priimtinių procedūros ribų, raudonųjų ląstelių agliutinacijos nebuvimas rodo neigiamą testo rezultatą, o jis reiškia, kad ant raudonųjų ląstelių atitinkamo Rh antigeno nėra.
3. **Kontrolė:** Ląstelių, agliutinusių su neigiama kontrole, testo rezultatus reikia atmesti, nes agliutinaciją tikriausiai sukėlė jautrintų ląstelių reagente esančios makromolekulinės agliutinaciją skatinančios medžiagos.

## REAKCIJŲ STABILUMAS

1. Visus mėgintuvėliuose ir mikroplokštelėse atliktų testų rezultatus vertinkite iš karto po centrifugavimo procedūros.
2. Kad būtų užtikrintas specifiskumas ir išvengta klaidingo neigiamo rezultato vertinimo dėl išdžiūvusio reagento jį laikant teigiamu, testus ant plokštumos galima vertinti po 1 minutės.
3. Jeigu testas atliekamas esant kitai temperatūrai, nei rekomenduojama, testo rezultatus reikia vertinti atsargiai.

## RIBOJIMAI

1. „Lorne“ „Anti-Rh“ reagentai netinka naudoti su fermentais apdorotomis ląstelėmis ar naudoti netiesioginiu antiglobulinu metodu atliekamiems testams.
2. Įrodyta, kad daugelis monokloninių IgM antikūnų Rh antigenui pasižymi anti-I/I šalčio agliutininu aktyvumu, ypač su virkštelės kraujo ar fermentais apdorotomis ląstelėmis. Tai gali būti pastebėta, jeigu testai inkubuojami žemesnėje temperatūroje, nei rekomenduojama.
3. Kai kurios raudonosios ląstelės ekspresuoja įvairius Rh antigenus ir gali sukelti silpnas reakcijas nei stebimos su atsitiktinai atrinktomis teigiamos kontrolės ląstelėmis. „Anti-C“ reagento sukeltos reakcijos su R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> asmenų C antigenu gali būti silpnesnės. Panašiai „Anti-e“ reagentas gali sukelti silpnas reakcijas, jei C antigeno nėra, pvz., R<sub>2</sub>r, r<sup>+</sup> ir rr.
4. Priešingai, nuslopinta ar susilpnėjusi tam tikrų kraujo grupių antigenų ekspresija gali lemti klaidingai neigiamus reakcijų rezultatus. Dėl šių priežasčių, remiantis testo rezultatais, genotipus priskirti reikia atsargiai.
5. Klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami rezultatai gali būti gauti, jei:
  - užterštos testo medžiagos;

- netinkamai laikoma, dėl ląstelių koncentracijos, inkubavimo laiko ar temperatūros;
- netinkamai ar pernelyg centrifuguojama;
- nesilaikoma rekomenduojamų metodų.

## SPECIALIOSIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

1. Prieš išleidžiant kiekviena šio Rh reagento serija buvo iširta taikant šiose naudojimo instrukcijose išvardytus rekomenduojamus tyrimo metodus. Testai atitiko galiojančios „Jungtinės Karalystės rekomendacijų kraujo perpilimo tarnyboms“ versijos leidime ir Bendrosiose techninėse specifikacijose nurodytus reikalavimus.
2. Monokloninių antikūnų specifiskumas įrodytas naudojant antigenams neigiamų ląstelių rinkinį.
3. Reagentų kokybės kontrolė atliekama naudojant raudonąsias ląsteles, kurių fenotipas buvo patikrintas JK kraujo perpilimo centre, prieš naudojant jas nuplovus PBS ar izotoniniu fiziologiniu tirpalu.

## ATSAKOMYBĖS RIBOJIMAS

1. Tais atvejais, jei testas atliekamas taikant kitus metodus, nei nurodyta skyriuje **Rekomenduojami metodai**, už reagentų veikimą atsako naudotojas.
2. Prieš naudojant visus nukrypimus nuo **Rekomenduojamų metodų** reikia validuoti<sup>5</sup>.

## LITERATŪRA

1. Issitt P. D. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16<sup>th</sup> edition, AABB 2008.
3. Jones J., Scott M. L., 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
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6<sup>th</sup> Edition 2002. The Stationary Office.
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.

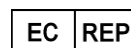
## TIKIAMIŲ REAGENTŲ DYDŽIAI

	Buteliuko dydis	Katalogo numeris	Testų, kuriuos galima atlikti su vienu buteliuku, skaičius
„Anti-C“ monokloninis	5 ml	690005	100
	1 000 ml	690000*	20 000
„Anti-E“ monokloninis	5 ml	691005	100
	1 000 ml	691000*	20 000
„Anti-c“ monokloninis	5 ml	692005	100
	1 000 ml	692000*	20 000
„Anti-e“ monokloninis	5 ml	693005	100
	1 000 ml	693000*	20 000

\*Šis dydis skirtas naudoti tik tolesnei gamybai (FFMU), todėl CE ženklų neženklina.



„Lorne Laboratories Limited“  
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate  
Danehill  
Lower Earley  
Berkshire, RG6 4UT  
Jungtinė Karalystė  
Tel. +44 (0) 118 921 2264  
Faks. +44 (0) 118 986 4518  
El. paštas info@lornelabs.com



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