

MONOKLONÁLNÍ ČINIDLA PRO STANOVENÍ KREVNÍCH SKUPIN NÁVOD K POUŽITÍ

Anti-D Duoclone Monoclonal: Určeno pro testy ve zkumavce, na mikrotitrační destičce, sklíčku a metody Bio-Rad-ID a Ortho BioVue.

SHRNUTÍ

Rh systém krevních skupin byl objeven v roce 1940. Antigen D je klinicky nejvýznamnějším antigenem červených krvinek mimo systém AB0, který se podílí na vzniku hemolytických potransfuzních reakcí a hemolytické nemoci novorozenců.

Anti-D	Fenotyp	Bělošská populace % ³	Afroameričané % ³
+	Rh D +ve	83	92
0	Rh D -ve	17	8

URČENÉ POUŽITÍ

Činidla Anti-D ke stanovení krevních skupin jsou určena ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti, nebo nepřítomnosti antigenu Rh D 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

Činidlo obsahuje protilátky proti antigenu D na povrchu lidských červených krvinek a způsobuje přímou aglutinaci (shlukování) lidských červených krvinek, které nesou antigen D, a v antiglobulinové fázi testování nepřímou aglutinaci lidských červených krvinek, které nesou antigen kategorie D^{VI}. Nepřítomnost aglutinace (nepřítomnost shlukování) obecně indikuje nepřítomnost antigenu D na povrchu lidských červených krvinek (viz část **Omezení**).

ČINIDLO

Lorne Monoclonal Anti-D Duoclone je nízkoproteinové činidlo ke stanovení krevních skupin, které obsahuje směs lidské monoklonální protilátky IgM a IgG anti-D v roztoku fosfátového pufru s obsahem chloridu sodného (0,9 g%), hovězího albuminu (2,0 g%) a makromolekulárních potenciátorů (1,5 g%). Při typizaci vzorků pacientů toto činidlo přímo aglutinuje buňky nesoucí antigen Rh D včetně většiny variant (nikoli však D^{VI}) a velkého podílu slabých fenotypů D (D^U), jsou-li použity doporučené metody. Činidla neobsahují látky karcinogenní, mutagenní nebo toxické pro reprodukci (CMR), látky narušující endokrinní systém ani látky, které by mohly u uživatele vyvolat senzibilizaci nebo alergickou reakci. Činidlo je dodáváno v optimálním ředění vhodném ke zpracování vzorků pacientů 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.

IgM / IgG	Buněčná kultura / klon
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

OSLABENÁ EXPRESE ANTIGENU RhD

Souhmné označení D⁺ se obecně používá k popisu červených krvinek, které mají slabší expresi antigenu D, než je běžné. Termín slabý fenotyp D (weak) označuje jedince se sníženým počtem kompletních míst antigenu D na jednu červenou krvinku. Termín parciální fenotyp D označuje jedince, kterým chybí epitopy antigenu D. D^{VI} představuje kategorii parciálního fenotypu D, které chybí většina epitopů D. Činidlo Duoclone detekuje metodou přímé aglutinace většinu variant červených krvinek slabého nebo parciálního typu D s výjimkou buněk D^{VI}. Činidlo detekuje buňky typu D^{VI} a parciální D v rámci nepřímé antiglobulinové metody.

SKLADOVÁNÍ

Nádob 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 studii stability při přepravě při teplotě 37 °C a –25 °C, jak uvádí dokument BS EN ISO 23640:2015.

ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Krev lze odebrat 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 fosfátem pufovaném (PBS) nebo izotonickém (Isotonic) fyziologickém roztoku.

UPOZORNĚNÍ

- Činidlo je určeno výhradně k diagnostice *in vitro*.
- Je-li nádoba s činidlem prasklá nebo netěsná, okamžitě obsah zlikvidujte.
- Nepoužívejte činidlo po datu použitelnosti (viz **Štítek na nádobě**).

- Nepoužívejte činidlo, pokud obsahuje sraženinu.
- Při manipulaci s činidly je třeba používat ochranný oděv, například jednorázové rukavice a laboratorní plášť.
- Činidlo bylo filtrováno přes 0,2µm kapsli z důvodu snížení biologické zátěže, ale není dodáváno sterilní. Po otevření nádoby zůstává obsah použitelný až do data expirace, pokud není výrazně zkalený, což může být známkou zhoršené kvality nebo kontaminace činidla.
- Činidlo obsahuje < 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 činidla 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 ROZLITÍ

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

KONTROLY A POKYNY

- V každé sérii testů je doporučeno provádět současně testování pozitivní (nejlépe buněk R₁r) a negativní (nejlépe buněk rr) kontroly. Pokud kontroly neukazují očekávané výsledky, považujte testy za neplatné.
- Při typizaci červených krvinek pacienta, u něhož bylo diagnostikováno onemocnění, které způsobuje navázání protilátky nebo jiných proteinů na membránu červených krvinek (např. HNN, AIHA), je důležité otestovat červené krvinky pacienta negativní kontrolou činidla Lorne (Monoclonal D Negative Control, kat. č. 650010). Pokud červené krvinky za užití negativní kontroly Lorne Monoclonal D Negative Control (kat. č. 650010) aglutinují, testy je nutné považovat za neplatné.
- Vzorky ke stanovení kategorie D^{VI} testujte výhradně pomocí **nepřímého antiglobulinového testu, s využitím technik Coombs Bio-Rad, Bio-Rad-ID a Coombs Ortho BioVue**.
- Míra detekce slabých a variantních antigenů D metodou s využitím gelové karty, mikrotitrační destičky nebo sklíčka je nízká. Slabé a parciální varianty je doporučeno testovat zkumavkovou metodou.
- Antiglobulinovou zkumavkovou metodu lze považovat za platnou, pouze pokud všechny negativní testy mají s červenými krvinkami senzibilizovanými IgG pozitivní reakci.
- 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 použití činidla při jiných metodách je na posouzení uživatele.

ČINIDLA A POTŘEBNÝ MATERIÁL

- lidský antiglobulin, tj. Lorne AHG Elite (kat. č. 435010) nebo činidlo proti lidskému IgG, tj. Lorne Anti-Human IgG (kat. č. 402010)
- odměrné pipety
- mikroskopická sklíčka nebo bílé karty
- aplikační tyčinky
- skleněné zkumavky (10 x 75 mm nebo 12 x 75 mm)
- inkubátor se suchým teplem nebo vodní lázní nastavený na stabilní teplotu 37 °C ±2 °C
- odstředivka vhodná pro zkumavky
- promývačka buněk na bázi Coombsovy metody
- validované mikrotitrační destičky s „U“ jamkami
- odstředivka vhodná pro mikrotitrační destičky
- třepačka na destičky
- automatická čtečka destiček
- karty Bio-Rad ID (LISS/Coombs) a (NaCl, enzymový test a chladové aglutininy)
- odstředivka Bio-Rad ID
- roztok Bio-Rad ID-CellStab nebo ID-Diluent 2
- inkubátor Bio-Rad ID nastavený na teplotu 37 °C ±2 °C
- kazety systému Ortho BioVue (AHG/Coombs) a (Neutrální)
- odstředivka systému Ortho BioVue
- topný box Ortho BioVue System Heat Block nastavený na teplotu 37 °C ±2 °C
- ředící činidlo Ortho 0,8% Red Cell Diluent
- červené krvinky senzibilizované IgG, tj. Lorne Coombs Control Cells (kat. č. 970010)
- fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) (pH 6,8–7,2) nebo izotonický fyziologický roztok (Isotonic) (pH 6,5–7,5)

- červené krvinky pro pozitivní (nejlépe R_{1r}) a negativní (rr) kontrolu

DOPORUČENÉ METODY (NEVZTAHUJE SE NA KATEGORII D^V)

A. Zkumavková metoda

1. Ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic připravte 2–3% suspenzi červenýchrvinek.
2. Do štítkem označené zkumavky přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Duoclone a 1 objemovou jednotku suspenze červenýchrvinek.
3. Důkladně promíchejte a odstředěte všechny zkumavky po dobu 20 sekund při odstředivé síle 1000 RCF, případně dobu a sílu odstředění vhodně upravte.
4. Sedimentované červené krvinky jemně znovu resuspendujte a makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.
5. Veškeré zkumavky, které vykazují negativní nebo nejednoznačný výsledek (což se může stát u vzorků s antigenem D^U nebo se slabým antigenem D), je třeba inkubovat při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
6. Po inkubaci zopakujte kroky 3 a 4.

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

1. V roztoku ID-CellStab nebo ID-Diluent 2 připravte 0,8% suspenzi červenýchrvinek.
2. Z potřebného množství mikrozkmavek odstraňte hliníkovou fólii.
3. Do příslušné mikrozkmavky přidejte: 50 µl suspenze vyšetřovaných červenýchrvinek a 25 µl činidla Lorne Duoclone.
4. Odstředte ID kartu/karty v odstředivce určené pro gelové karty.
5. Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

C. Metoda Ortho BioVue (Neutrální kazety)

1. V 0,8% roztoku Ortho Red Cell Diluent připravte 0,8% suspenzi červenýchrvinek.
2. Z potřebného množství reakčních komůrek odstraňte hliníkovou fólii.
3. Do příslušné reakční komůrky přidejte: 50 µl suspenze vyšetřovaných červenýchrvinek a 40 µl činidla Lorne Duoclone.
4. Odstředte kazetu/kazety v odstředivce systému Ortho BioVue.
5. Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

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

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

E. Sklíčková metoda

1. Připravte 35–45% suspenzi červenýchrvinek v séru, plazmě nebo fyziologickém roztoku PBS/Isotonic, případně použijte antikoagulovanou plnou krev (ve vlastní plazmě).
2. Na štítkem označené mikroskopické sklíčko nebo kartu přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Duoclone a 1 objemovou jednotku suspenze vyšetřovaných červenýchrvinek.
3. Pomocí čisté aplikační tyčinky smíchejte činidlo a buňky na ploše přibližně 20 x 40 mm.
4. Při pokojové teplotě jemně sklíčkem kývejte dopředu a dozadu po dobu 30 sekund a během jedné minuty obsah na sklíčko občas znovu promíchejte.
5. V rozptýleném světle odečtěte po 1 minutě makroskopicky výsledek a nezaměňujte fibrinová vlákna za aglutinaci.
6. Slabé reakce je třeba vždy zopakovat s využitím zkumavkové metody.

DOPORUČENÉ METODY (K DETEKCI KATEGORIE D^V)

A. Nepřímá antiglobulinová metoda (Indirect Antiglobulin Technique; IAT)

1. Ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic připravte 2–3% suspenzi červenýchrvinek.
2. Do štítkem označené zkumavky přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Duoclone a 1 objemovou jednotku suspenze vyšetřovaných červenýchrvinek.
3. Důkladně promíchejte a inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
4. Promyjte červené krvinky nejméně jednou ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic. Mezi promýváním roztok pečlivě dekantujte a po každém promytí sedimentované buňky resuspendujte. Po posledním promytí fyziologický roztok zcela dekantujte.
5. Ke každému suchému buněčnému sedimentu přidejte 2 kapky lidského antiglobulinu nebo anti-IgG.
6. Důkladně promíchejte a odstředěte všechny zkumavky po dobu 20 sekund při odstředivé síle 1000 RCF, případně dobu a sílu odstředění vhodně upravte.
7. Všechny buněčné sedimenty resuspendujte a makroskopicky odečtěte výsledek.
8. Pomocí červenýchrvinek senzibilizovaných IgG potvrďte validitu všech negativních reakcí.

B. Metoda Bio-Rad-ID (karty LISS/Coombs)

1. V roztoku ID-CellStab nebo ID-Diluent 2 připravte 0,8% suspenzi červenýchrvinek.
2. Z potřebného množství mikrozkmavek odstraňte hliníkovou fólii.
3. Do příslušné mikrozkmavky přidejte: 50 µl suspenze červenýchrvinek a 25 µl činidla Lorne Duoclone.
4. Inkubujte ID kartu/karty při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
5. Odstředte ID kartu/karty v odstředivce určené pro gelové karty.
6. Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

C. Metoda Ortho BioVue (kazety AHG/Coombs)

1. V 0,8% roztoku Ortho Red Cell Diluent připravte 0,8% suspenzi červenýchrvinek.
2. Z potřebného množství reakčních komůrek odstraňte hliníkovou fólii.
3. Do příslušné reakční komůrky přidejte: 50 µl suspenze vyšetřovaných červenýchrvinek a 40 µl činidla Lorne Duoclone.
4. Inkubujte kazetu/kazety při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
5. Odstředte kazetu/kazety v odstředivce systému Ortho BioVue.
6. Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU

1. **Pozitivní:** Aglutinace červenýchrvinek znamená pozitivní výsledek testu a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje přítomnost antigenu D na červených krvinkách.
2. **Negativní:** Nepřítomnost aglutinace červenýchrvinek znamená negativní výsledek a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje nepřítomnost antigenu D na červených krvinkách.
3. **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

1. U všech testů ve zkumavkách a na mikrotitračních destičkách odečtěte výsledky ihned po odstředění.
2. Jednotlivé kroky promývání vzorků proveďte bez přerušení a po přidání antiglobulinového séra ihned odstředte a odečtěte výsledky, protože prodloužení může způsobit rozklad komplexů antigen a protilátka s následným falešně negativním nebo slabě pozitivním výsledkem.
3. Sklíčkové testy je nezbytné interpretovat po maximálně 1 minutě, aby byla zajištěna specifita a vyloučena možnost, že negativní výsledek bude mylně interpretován jako pozitivní v důsledku zasychání činidla.
4. Při interpretaci výsledků testů prováděných při jiných než doporučených teplotách postupujte obezřetně.

OMEZENÍ

1. Činidlo Lorne Anti-D není vhodné používat s enzymaticky ošetřenými buňkami nebo buňkami suspendovanými v roztoku LISS.
2. Použijte-li k vytvoření suspenze červenýchrvinek jiné roztoky, než které jsou popsány v části „Doporučené metody“ tohoto dokumentu, musíte je před použitím validovat. Některé roztoky mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní reakci.
3. Skladovaná krev může vykazovat slabší reakci než krev čerstvá.
4. Falešně pozitivní aglutinaci lze pozorovat při testování buněk senzibilizovaných IgG.
5. 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

1. Každá šarže monoklonálního činidla Lorne Anti-D Duoclone 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.
2. Specifita zdrojových monoklonálních protilátek byla prokázána pomocí panelu antigen-negativních buněk.
3. Účinnost činidla byla testována na základě následujícího referenčního standardu s minimální účinností získaného z britského národního institutu biologických standardů a kontrol NIBSC (National Institute of Biological Standards and Controls):
 - referenční standard Anti-D 99/836.
4. Kontrola kvality činidel byla provedena s využitím červenýchrvinek s fenotypy, které ověřila transfuzní stanice ve Spojeném království a které byly před použitím promyty ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic.

VYLOUČENÍ ODPOVĚDNOSTI

1. Za účinnost činidla použitého jinými technikami, než které jsou uvedeny v části **Doporučené metody**, odpovídá uživatel.
2. Jakékoli odchylky od **doporučených metod** je třeba před použitím validovat⁶.

BIBLIOGRAFIE

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3. vydání, Montgomery Scientific, Miami, 1985, kapitola 10.
2. AABB Technical Manual, 16. vydání, AABB 2008.
3. Marion E. Reid a Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; strana 192.

4. 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
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6. vydání 2002. The Stationary Office.
6. 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.

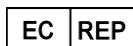
DOSTUPNÉ VELIKOSTI BALENÍ ČINIDEL

Objem nádoby	Katalogové číslo	Počet testů na nádobu
10 ml	740010	200
1000 ml	740000*	20 000
5000 ml	740000x5*	100 000

*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, 2nd Flr.,
 Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta