



MONOKLONĀLI ASINS GRUPU NOTEIKŠANAS REAĢENTI

LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI:

Divu klonu anti-D monoklonālais reaģents: mēģenes, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, mikroplāksnes un priekšmetstikliņa metodes.

KOPSAVILKUMS

Asinsgrupu rēzus faktoru sistēma tika atklāta 1940. gadā. D antigēns ir klīniski nozīmīgākais ABO sistēmai nepiederošs eritrocītu antigēns, un tas ir cēlonis hemolītiskām asins pārliešanas reakcijām un hemolītiskām slimībām jaundzimušajiem.

Anti-D	Fenotips	Baltās rases pārstāvji % ³	Afroamerikāņi % ³
+	Rh D +ve	83	92
0	Rh D -ve	17	8

PAREDZĒTĀ IZMANTOŠANA

Anti-D reaģenti ir asins grupu noteikšanas reaģenti, ko izmanto, lai kvalitatīvi noteiktu Rh D antigēna esamību vai neesamību asins donoru vai pacientu, kuriem nepieciešama asins pārliešana, eritrocītos, ja pārbaudes tiek veiktas saskaņā ar šajos lietošanas norādījumos minētajām ieteicamajām metodēm.

DARBĪBAS PRINCIPS

Reaģents satur antivielas pret D antigēnu cilvēka eritrocītos un testēšanas antiglobulīna fāzē izraisīs cilvēka D antigēnu saturošu eritrocītu tiešu aglutināciju (salipšanu) un D^{VI} kategorijas cilvēka eritrocītu netiešu aglutināciju. Ja aglutinācija nenotiek (nenotiek salipšana), tas parasti norāda, ka cilvēka eritrocītos nav D antigēna (skatīt sadaļu “Ierobežojumi”).

REAĢENTS

Lorne monoklonālais anti-D divu klonu asinsgrupu noteikšanas reaģents ir nedaudz proteīnu saturošs sajaukts reaģents, kas satur cilvēka monoklonālos IgM un IgG anti-D, kas atšķaidīts fosfāta buferšķīdumā, kas satur nātrija hlorīdu (0,9 g%), liellopu albumīnu (2,0 g%) un makromolekulārus pastiprinātājus (1,5 g%). Tipējot pacientu paraugus, izmantojot ieteicamās metodes, šis reaģents tieši aglutinēs Rh D pozitīvās šūnas, ieskaitot vairumu variantu (izņemot D^{VI}) un lielu daļu vājo D (D^U) fenotipu. Reaģenti nesatur CMR vielas un nesastāv no tām, nesatur endokrīno sistēmu ietekmējošas vielas vai tādas vielas, kas var izraisīt lietotāja sensibilizāciju vai alerģisku reakciju. Reaģentu piegādā optimālā atšķaidījumā, lai to varētu izmantot pacientu paraugiem ar visām turpmāk minētajām ieteiktajām metodēm, bez nepieciešamības veikt papildu atšķaidīšanu vai jebkādu vielu pievienošanu. Partijas atsaucē numuru un derīguma termiņu skatīt uz **flakona etiķetes**.

IgM / IgG	Šūnu līnija / klons
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

RHD ANTIGĒNA VĀJINĀTA EKSPRESIJA

Kopējo nosaukumu D^U paši izmanto, lai raksturotu eritrocītos, kam ir vājāka D antigēna ekspresija nekā tas ir normāli. Ar terminu “vājš D” apzīmē cilvēkus ar samazinātu pilnu D antigēna vietu skaitu vienā eritrocītā. Ar terminu “daļējs D” apzīmē cilvēkus, kam nav D antigēna epitopu. DVI ir daļēja D kategorija, kurai nav vairuma D epitopu. Divu klonu reaģenti ar tiešu aglutināciju atklās vairumu daļēju vai vāju D eritrocītu paraugus, taču neatklās DVI šūnas. Šis reaģents atklās DVI un daļēja D šūnas netiešā antiglobulīna testa fāzē.

UZGLABĀŠANA

Flakoni ar reaģentu pēc saņemšanas jāglabā 2-8°C temperatūrā. Ilgstoša uzglabāšana ārpus šī temperatūru diapazona var izraisīt paātrinātu reaģenta reaktivitātes zudumu. Ir veikti šī reaģenta transportēšanas stabilitātes pētījumi 37°C un -25°C temperatūrā kā aprakstīts dokumentā BS EN ISO 23640:2015.

PARAUGU SAVĀKŠANA UN SAGATAVOŠANA

Asins paraugus var savākt EDTA, citrāta, CPDA antikoagulantos vai kā sarecējušu paraugu. Paraugi jāpārbauda iespējami ātrāk pēc savākšanas. Ja ar testēšanu notiek aizkavēšanās, uzglabājiet paraugus 2-8°C temperatūrā. Paraugus ar spēcīgu hemolīzes vai mikrobu piesārņojumu testos nedrīkst izmantot. Asins paraugi, kam vērojamas līzes pazīmes, var sniegt nepārliecināšanos rezultātus. Pirms testu veikšanas ieteicams (taču nav būtiski) noskalot visus asins paraugus ar PBS vai izotonisko šķīdumu.

BRĪDINĀJUMI

1. Reaģents ir paredzēts izmantošanai tikai *in vitro* diagnostikā.
2. Ja flakons ar reaģentu ir iekļūstījis vai no tā notiek noplūde, nekavējoties likvidējiet tā saturu.
3. Nelietojiet reaģentu pēc derīguma termiņa beigām (skatīt **flakona etiķeti**).
4. Nelietojiet reaģentu, ja tajā ir nogulsnes.
5. Rīkojoties ar reaģentiem jāvalkā aizsargapģērbs, piemēram, vienreizlietojamie cimdi un laboratorijas halāts.

6. Reaģents ir filtrēts caur 0,2 μm kapsulu, lai samazinātu bioloģisko piesārņojumu, taču netiek piegādāts sterils. Pēc flakona attaisīšanas saturam jābūt dzīvotspējīgam līdz derīguma termiņa beigām, ja vien nav novērojama izteikta duļķainība, kas var liecināt, ka reaģents ir sabojājies vai piesārņots.
7. Reaģents satur < 0,1% nātrija azīda. Nātrija azīds var būt toksisks, ja to norij, un var reaģēt ar svina un vara caurulēm, veidojot sprādzienbīstamus metāla azīdus. Iznīcinot aizskalo ar lielu daudzumu ūdens.
8. Materiāli, kas tika izmantoti reaģenta izgatavošanā, ieguves vietā tikai pārbaudīti uz HIV 1+2 un HCV antivielām un B hepatīta vīrusmas antigēnu, izmantojot apstiprinātus mikrobioloģiskos testus, un rezultāti bija negatīvi.
9. Nevieni no zināmajiem testiem nevar garantēt, ka cilvēku vai dzīvnieku izcelsmes produktos nav nekādu infekcijas izraisītāju. Lietojot un iznīcinot katru flakonu un tā saturu, jāievēro piesardzība.

REAĢENTA IZNĪCINĀŠANA UN RĪCĪBA IZŠĻAKSTĪŠANĀS GADĪJUMĀ

Lai iegūtu informāciju par reaģenta iznīcināšanu un izšļakstīšanās vietas dekontamināciju, skatīt **materiālu drošības datu lapas**, kas pieejamas pēc pieprasījuma.

KONTROLE UN IETEIKUMI

1. Parāli katrai testu partijai ieteicams veikt pozitīvu kontroles (vislabāk R₁r šūnu) testu un negatīvu kontroles (vislabāk rr šūnu) testu. Testi jāuzskata par nederīgiem, ja kontrole neuzrāda skaidrus rezultātus.
2. Tipējot eritrocītus no pacienta, kuram ir diagnosticēta slimība, kas izraisa eritrocītu pārkļāšanos ar antivielām vai citiem proteīniem (piemēram, HDN, AIHA), ir svarīgi pārbaudīt pacienta eritrocītus, izmantojot Lorne reaģenta negatīvu kontroles testu (monoklonālais D negatīvais kontroles tests (katalogs 650010)). Testi jāuzskata par nederīgiem, ja, izmantojot Lorne monoklonālo D negatīvu kontroles testu (kataloga # 650010), eritrocīti aglutinējas.
3. Testa paraugi D^{VI} kategorijas noteikšanai, izmantojot tikai **netiešā antiglobulīna testu, Kumsa Bio-Rad, Bio-Rad-ID un Kumsa Ortho BioVue metodes**.
4. Vājos un D variantu antigēnus ir grūti atklāt, izmantojot gēla kartītes, mikrotitru plates un priekšmetstikliņa metodi. Vājos un daļējos variantus ieteicams pārbaudīt, izmantojot mēģenes testa metodi.
5. Antiglobulīna stobriņu metodi var uzskatīt par derīgu tikai tad, ja visi negatīvie testi pozitīvi reaģē ar IgG sensibilizētiem eritrocītiem.
6. Ļaujiet reaģentam pirms lietošanas sasilt līdz istabas temperatūrai. Tiklīdz reaģents ir izmantots, atlieciet to atpakal glabātuvē, kur ir 2-8°C temperatūra.
7. Sadaļā **“Ieteicamās metodes”** norādītā viena tilpuma vienība ir aptuveni 50 μl, izmantojot komplektā iekļauto flakonu ar pipeti.
8. Tikai pienācīgi apmācīts un kvalificēts personāls drīkst lietot reaģentu un interpretēt rezultātus, saskaņā ar tās valsts prasībām, kurā izmanto reaģentus.
9. Lietotājam jānosaka reaģentu piemērotība izmantošanai ar citām metodēm.

NEPIECIEŠAMIE REAĢENTI UN MATERIĀLI

- Cilvēka antiglobulīns, piem., Lorne AHG Elite (kat. # 435010) vai cilvēka antiglobulīns IgG, piem., Lorne Anti-Human IgG (kat. # 402010).
- Mērpipetes.
- Mikroskopa priekšmetstikliņi vai baltas kartītes.
- Aplikatora kociņi.
- Stikla mēģenes (10 x 75 mm vai 12 x 75 mm).
- Ūdens pelde vai sausā siltuma inkubators, kas nolīdzsvarots uz 37°C±2°C.
- Mēģeņu centrifūga.
- Kumsa šūnu skalotājs.
- Validētas “U” iedobju mikroplates.
- Mikroplašu centrifūga.
- Plašu kratītājs.
- Automātisks plašu lasītājs.
- Bio-Rad ID kartes (LISS/Kumbs) un (NaCl, enzīmu tests un aukstuma aglutinīni).
- Bio-Rad ID centrifūga.
- Bio-Rad ID CellStab vai ID Diluent 2.
- Bio-Rad ID inkubator, kas nolīdzsvarots līdz 37°C±2°C.
- Ortho BioVue sistēmas kasetes (AHG/Kumbs) un (Neitrāli).
- Ortho BioVue sistēmas centrifūga.
- Ortho BioVue sistēmas siltuma bloka, kas nolīdzsvarots līdz 37°C±2°C.
- Ortho 0,8% eritrocītu atšķaidītājs.
- IgG sensibilizēti eritrocīti, piem., Lorne Coombs Control Cells (kat. # 970010).
- PBS šķīdums (pH 6,8–7,2) vai izotoniskais šķīdums (pH 6,5–7,5).
- Pozitīvi (ideālā gadījumā R₁r) un negatīvi (rr) kontroles eritrocīti.

IETEICAMĀS METAODES (NEATTIECĀS UZ D^{VI} KATEGORIJU)

A. Mēģenes metode

1. Sagatavojiet 2–3% eritrocītu suspensiju PBS vai izotoniskajā šķīdumā.
2. Ievietojiet marķētā mēģenē: 1 tilpuma vienību Lorne divu klonu reaģenta un 1 tilpuma vienību eritrocītu suspensijas.
3. Kārtīgi samaisiet un centrifugējiet visas mēģenes 20 sekundes ar 1000 rcf (relatīvais centrālās spēks) vai atbilstošu alternatīvu laiku un spēku.
4. Sausdzīgi atkārtoti suspendējiet eritrocītu recekli un makroskopiski nolasi aģlutināciju.
5. Visas mēģenes ar negatīvu vai apšaubāmu rezultātu (tas var notikt ar D^{VI} vai vājiem D paraugiem) nepieciešams inkubēt 15 minūtes istabas temperatūrā.
6. Pēc inkubācijas atkārtojiet 3. un 4. soli.

B. Bio-Rad-ID metode (NaCl, enzīmu tests un aukstuma aģlutināciju kartītes)

1. Sagatavojiet 0,8% eritrocītu suspensiju ID-CellStab vai ID šķīdinātājā 2.
2. Noņemiet alumīnija plēvīti no tik daudz mikrostobriņiem, cik nepieciešams.
3. Ievietojiet atbilstošā mikromēģenē: 50 μl testējamo eritrocītu suspensijas un 25 μl Lorne divu klonu reaģenta.
4. Centrifugējiet ID-kartīti(-es) gēla kartīšu centrifūgā.
5. Makroskopiski nolasi aģlutinācijas rezultātus.

C. Ortho BioVue metode (neitrālas kartītes)

1. Sagatavojiet 0,8% eritrocītu suspensijas 0,8% Ortho eritrocītu šķīdinātājā.
2. Noņemiet alumīnija plēvīti no tik daudz reakcijas kamerām, cik nepieciešams.
3. Ievietojiet atbilstošā reakcijas kamerā: 50 μl testējamo eritrocītu suspensijas un 40 μl Lorne divu klonu reaģenta.
4. Centrifugējiet kaseti(-es) Ortho BioVue sistēmas centrifūgā.
5. Makroskopiski nolasi aģlutinācijas rezultātus.

D. Mikroplates metode, izmantojot "U" iedobes

1. Sagatavojiet 2–3% eritrocītu suspensiju PBS vai izotoniskajā šķīdumā.
2. Ievietojiet atbilstošā iedobē: 1 tilpuma vienību Lorne divu klonu reaģenta un 1 tilpuma vienību eritrocītu suspensijas.
3. Kārtīgi samaisiet, vēlams, izmantojot mikroplašu kratītāju, uzmanoties, lai nenotiktu savstarpēja piesārņošanās starp iedobēm.
4. Inkubējiet 15 minūtes istabas temperatūrā (laiks atkarīgs no lietotāja).
5. Centrifugējiet mikroplati 1 minūti ar 140 rcf (relatīvais centrālās spēks) vai atbilstošu alternatīvu laiku un spēku.
6. Atkārtoti suspendējiet eritrocītu recekli, izmantojot kontrolētu maisīšanu uz mikroplašu kratītāja.
7. Rezultātus nolasi makroskopiski vai izmantojot apstiprinātu automātisku lasītāju.
8. Visas vājās reakcijas ir jāatkārto, izmantojot mēģeņu metodi.

E. Priekšmetstikliņu metode

1. Sagatavojiet 35–45% eritrocītu suspensiju serumā, plazmā, PBS vai izotoniskajā šķīdumā, vai arī izmantojiet antikoagulētu pilnasiņu paraugu (tā plazmā).
2. Novietojiet uz marķēta priekšmetstikliņa vai kartītes: 1 tilpuma vienību Lorne divu klonu reaģenta un 1 tilpuma vienību eritrocītu suspensijas.
3. Izmantojot tīru aplikatora kociņu, sajauciet reaģentu un eritrocītus aptuveni 20 x 40 mm lielā laukumā.
4. 30 sekundes lēnām pašūpoiet priekšmetstikliņu, pēc tam 1 minūti ik pa brīdim samaisiet, nodrošinot, ka priekšmetstikliņš ir istabas temperatūrā.
5. Pēc 1 minūtes difūzā gaismā makroskopiski nolasi rezultātus un kļūdaini neuzveriet fibrīna pavedienus kā aģlutināciju.
6. Visas vājās reakcijas ir jāatkārto, izmantojot mēģeņu metodi.

IETEICAMĀS METODES (LAI NOTEIKTU D^{VI} KATEGORIJU)

A. Netiešā antiglobulīna metode (IAT)

1. Sagatavojiet 2–3% eritrocītu suspensiju PBS vai izotoniskajā šķīdumā.
2. Ievietojiet marķētā mēģenē: 1 tilpuma vienību Lorne divu klonu reaģenta un 1 tilpuma vienību eritrocītu suspensijas.
3. Rūpīgi samaisiet un inkubējiet 15 minūtes 37°C temperatūrā.
4. Vismaz vienu reizi noskalojiet eritrocītus ar PBS vai izotonisko šķīdumu, starp skalošanām dekantējot fizioloģisko šķīdumu, un pēc skalošanas atkārtoti suspendējiet katru eritrocītu recekli. Pēc pēdējās skalošanas pilnībā dekantējiet fizioloģisko šķīdumu.
5. Katram sausajam eritrocītu receklim pievienojiet 2 pilienus AHG vai anti-IgG.
6. Kārtīgi samaisiet un centrifugējiet visas mēģenes 20 sekundes ar 1000 rcf (relatīvais centrālās spēks) vai atbilstošu alternatīvu laiku un spēku.
7. Atkārtoti suspendējiet katru eritrocītu recekli un makroskopiski nolasi rezultātus.
8. Apstipriniet visu negatīvo reakciju pareizību, izmantojot IgG sensibilizētus eritrocītus.

B. Bio-Rad-ID metode (LISS/Kumbsa kartītes)

1. Sagatavojiet 0,8% eritrocītu suspensiju ID-CellStab vai ID-Diluent 2.
2. Noņemiet alumīnija plēvīti no tik daudz mikrostobriņiem, cik nepieciešams.
3. Ievietojiet atbilstošā mikrostobriņā: 50 μl testējamo eritrocītu suspensijas un 25 μl Lorne divu klonu reaģenta.
4. Inkubējiet ID kartīti (-es) 15 minūtes 37°C temperatūrā.
5. Centrifugējiet ID-kartīti(-es) gēla kartīšu centrifūgā.
6. Makroskopiski nolasi aģlutinācijas rezultātus.

C. Ortho BioVue metode (AHG/Kumbsa kartītes)

1. Sagatavojiet 0,8% eritrocītu suspensijas 0,8% Ortho eritrocītu šķīdinātājā.
2. Noņemiet alumīnija plēvīti no tik daudz reakcijas kamerām, cik nepieciešams.
3. Ievietojiet atbilstošā reakcijas kamerā: 50 μl testējamo eritrocītu suspensijas un 40 μl Lorne divu klonu reaģenta.
4. Inkubējiet kaseti (-es) 15 minūtes 37°C temperatūrā.
5. Centrifugējiet kaseti(-es) Ortho BioVue sistēmas centrifūgā.
6. Makroskopiski nolasi aģlutinācijas rezultātus.

TESTA REZULTĀTU INTERPRETĒŠANA

1. **Pozitīvs:** eritrocītu aģlutinācija nozīmē, ka testa rezultāts ir pozitīvs, un saskaņā ar pieļaujamajiem testa procedūras ierobežojumiem norāda, ka eritrocītos ir D antigēns.
2. **Negatīvs:** ja eritrocītu aģlutinācija nenotiek, tas nozīmē, ka testa rezultāts ir negatīvs, un saskaņā ar pieļaujamajiem testa procedūras ierobežojumiem norāda, ka eritrocītos nav D antigēna.
3. Eritrocīti, kas aģlutinējušies, izmantojot reaģenta negatīvo kontroli, testa rezultāti nav jāņem vērā, jo aģlutināciju, visticamāk, ir izraisījusi reaģentā esošo makromolekulāro pastiprinātāju ietekme uz sensibilizētiem eritrocītiem.

REAKCIJU STABILITĀTE

1. Nolasi stobriņu un mikroplates testu rezultātus uzreiz pēc centrifugēšanas.
2. Veiciet skalošanas soļus bez pārtraukuma, centrifugējiet un nolasi rezultātus uzreiz pēc cilvēka antiglobulīna pievienošanas, jo aizkavēšanās var izraisīt antigēna-antivielu kompleksu izjukšanu, izraisot kļūdaini negatīvas vai vāji pozitīvas reakcijas.
3. Priekšmetstikliņu tekstu rezultāti jānolasa ne vairāk kā pēc 1 minūtes, lai nodrošinātu specifiku un nepieļautu iespēju, ka izžuvuša reaģenta dēļ kļūdaini negatīvs rezultāts tiek interpretēts kā pozitīvs.
4. Testu, kas veikti, neievērojot ieteicamās temperatūras, rezultātus jāinterpretē piesardzīgi.

IEROBEŽOJUMI

1. Lorne Anti-D reaģents nav piemērots eritrocītiem, kas apstrādāti ar enzīmiem, vai eritrocītiem, kuru suspensija ir izgatavota LISS.
2. Izmantojot tādu šķīdumu eritrocītu suspensijas pagatavošanai, kas nav aprakstīts šī dokumenta sadaļā "Ieteicamās metodes", pirms lietošanas ir jāapstiprina. Daži šķīdumi var izraisīt kļūdaini pozitīvas vai kļūdaini negatīvas reakcijas.
3. Uzglabātas asinis var reaģēt vājāk, nekā svaigas asinis.
4. Testējot IgG sensibilizētus eritrocītus, var tikt novērota kļūdaini pozitīva aģlutinācija.
5. Kļūdaini pozitīvas vai kļūdaini negatīvas rezultātus var izraisīt arī:
 - testējamo materiālu piesārņošanās;
 - nepareiza uzglabāšana, eritrocītu koncentrācija, inkubācijas laiks vai temperatūra;
 - nepareiza vai pārmērīga centrifugēšana;
 - ieteicamo metožu neievērošana.

ĪPAŠI VEIKTSPĒJAS RAKSTURLIELUMI

1. Pirms izplatīšanas katrā Lorne Anti-D divu klonu monoklonālā reaģenta partijā tika pārbaudīta, izmantojot šajos lietošanas norādījumos minētās ieteicamās metodes. Testi tika veikti saskaņā ar pārbaudes prasībām, kas noteiktas "Vadlīnijās par asins pārlišanas pakalpojumiem Apvienotajā Karalistē" un "Kopējās tehniskajās specifikācijās".
2. Monoklonālo antivielu avota specifika tiek pierādīta, izmantojot tādu eritrocītu paneli, kam ir negatīvs antigēns.
3. Reģenta stiprums ir pārbaudīts, ņemot vērā šādu minimālo stipruma atsauces standartu, kas iegūts no Nacionālā bioloģisko standartu un kontroles institūta (NIBSC):
 - Anti-D atsauce 99/836
4. Reģentu kvalitātes kontrole tika veikta, izmantojot eritrocītus ar fenotipiem, kurus apstiprinājis Apvienotās Karalistes asins pārlišanas centrs un kuri pirms lietošanas tika skaloti ar PBS vai izotonisko šķīdumu.

ATRUNA

1. Izmantojot jebkuru citu metodi, kas nav minēta sadaļā "Ieteicamās metodes," lietotājs pats ir atbildīgs par reaģenta darbību.
2. Jebkādas novirzes no **ieteicamajām metodēm** jāapstiprina pirms to izmantošanas⁶.

BIBLIOGRĀFIJA

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 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, 6th Edition 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.

PIEEJAMIE REAĢENTU TILPUMI

Flakona izmērs	Kataloga numurs	Testi katrā flakonā
10 ml	740010	200
1000 ml	740000*	20 000
5000 ml	740000x5*	100 000

*Šis tilpums paredzēts tikai izmantošanai turpmākā ražošanā (For Further Manufacturing Use (FFMU)), tādēļ tam nav CE marķējuma.



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Apvienotā Karaliste
Tālr.: +44 (0) 118 921 2264
Fakss: +44 (0) 118 986 4518
E-pasts: info@lornelabs.com

EC	REP	Advena Ltd. Tower Business Centre, 2 nd Fl., Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta
----	-----	--