



ODCZYNNIKI MONOKLONALNE DO BADAŃ GRUPOWYCH KRWI
INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA

ODCZYNNIK MONOKLONALNY ANTY-D DUOCLONE: do oznaczania metodą probówkową, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, mikropłytkową i szkiełkową.

PODSUMOWANIE

Układ grup krwi Rh został odkryty w 1940 roku. Antygen D jest najbardziej istotnym klinicznie antygenem czerwonych krwinek innym niż ABO i uczestniczy w wywoływaniu poprzetoczeniowych reakcji hemolitycznych oraz choroby hemolitycznej noworodka.

Anty-D	Fenotyp	% rasy białej ³	% Afroamerykanów ³
+	Rh D +ve	83	92
0	Rh D -ve	17	8

PRZEZNACZENIE

Niniejsze odczynniki anty-D to odczynniki do grupowania krwi przeznaczone do jakościowego określania obecności lub braku antygeny Rh D 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 antygenowi D na ludzkich czerwonych krwinkach i powoduje bezpośrednią aglutynację (zlepianie) ludzkich czerwonych krwinek, które zawierają antygen D, oraz pośrednią aglutynację ludzkich czerwonych krwinek należących do kategorii D^{VI}, w fazie antyglobulinowej badania. Brak aglutynacji oznacza zwykle brak antygeny D na ludzkich czerwonych krwinkach (patrz **Ograniczenia**).

ODCZYNNIK

Monoklonalny odczynnik anty-D Duoclone firmy Lorne to odczynnik mieszany o niskiej zawartości białka, zawierający ludzkie monoklonalne przeciwciała IgM i IgG anty-D, rozcieńczony w buforze fosforanowym zawierającym chlorek sodu (0,9 g%), albuminę bydlęcą (2,0 g%) i wzmacniacze makrocząsteczkowe (1,5 g%). Podczas oznaczania grupy krwi próbek pacjentów odczynnik ten bezpośrednio aglutynuje komórki Rh D dodatnie, w tym większość wariantów (ale nie D^{VI}) i wysoki odsetek słabych fenotypów D (D^U) przy zastosowaniu zalecanych metod. Odczynniki nie zawierają ani nie składają się z substancji CMR, substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego ani substancji, które mogą powodować uczulenie lub reakcję alergiczną u użytkownika. Odczynnik jest dostarczany w optymalnym stężeniu dla wszystkich zalecanych metod wymienionych poniżej, bez konieczności dalszego rozcieńczania lub dodawania. Brak aglutynacji oznacza zwykle brak antygeny D na ludzkich czerwonych krwinkach (patrz **Ograniczenia**). Numer referencyjny partii i data ważności znajdują się na **etykiecie fiołki**.

IgM / IgG	Linia komórkowa/klon
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

OSŁABIONA EKSPRESJA ANTYGENU RhD

Zbiórny termin D^U jest szeroko stosowany do opisanego krwinek czerwonych, które wykazują słabszą ekspresję antygeny D niż normalnie. Termin „słaby antygen D” oznacza osoby o zmniejszonej liczbie kompletnych lokalizacji antygeny D na czerwonej krwince. Termin „częściowy antygen D” oznacza osoby z brakującymi epitopami antygeny D. DVI należy do kategorii częściowej antygenów D, w której brakuje większości epitopów antygeny D. Odczynnik Duoclone wykrywa większość czerwonych krwinek z częściowymi i słabymi antygenami D przez bezpośrednią aglutynację, ale nie wykrywa komórek DVI. Niniejszy odczynnik wykrywa komórki DVI i komórki z częściowym antygenem D w fazie IAT.

PRZECHOWYWANIE

Po otrzymaniu fiołki z odczynnikiem 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. Probki należy przebadać jak najszybciej po pobraniu. Jeśli wystąpi opóźnienie w badaniu, próbki należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Probki wykazujące znaczny stopień hemolizy lub zanieczyszczenie mikrobiologiczne nie powinny być wykorzystywane do badań. Probki krwi wykazujące oznaki lizy mogą dawać niewiarygodne wyniki. Przed badaniem zaleca się (ale nie jest to konieczne) przemycanie wszystkich próbek krwi roztworem PBS lub izotonicznym roztworem soli.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Odczynnik jest przeznaczony wyłącznie do diagnostycznego użytku *in vitro*.
- Jeśli fiołka z odczynnikiem jest pęknięta lub nieszczelna, należy natychmiast wyrzucić zawartość.
- Nie należy używać odczynnika po upływie daty ważności (patrz **etykieta fiołki**).
- Nie należy używać odczynnika, jeżeli wytrącił się osad.
- Podczas pracy z odczynnikiem należy nosić odpowiednią ochronną, taką jak rękawiczki jednorazowe i fartuch laboratoryjny.
- Odczynnik został przefiltrowany przez kapsułkę 0,2 µm w celu zmniejszenia obciążenia biologicznego, ale nie jest dostarczany w postaci sterylnej. Po otwarciu fiołki zawartość powinna pozostać zdatna 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, tworząc wybuchowe azydki metali. Podczas usuwania słupek dużą ilością wody.
- Materiały użyte do wytworzenia odczynnika zbadano u źródła i stwierdzono ujemne wyniki badań na obecność przeciwciał przeciwko HIV 1+2 i HCV oraz HBsAg przy użyciu zatwierdzonych testów mikrobiologicznych.
- Żadne 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**.

PRÓBY KONTROLNE I PORADY

- Zaleca się badanie dodatnich (najlepiej komórek R_{1r}) i ujemnych (najlepiej komórek rr) prób kontrolnych równoległe z każdą serią badań. Badania należy uznać za nieważne, jeśli próby kontrolne nie dostarczają oczekiwanych wyników.
- Podczas oznaczania grupy krwi pacjenta, u którego zdiagnozowano chorobę, wskutek której czerwone krwinki pokrywają się przeciwciałami lub innymi białkami (takimi jak HDN, AIHA), należy przebadać czerwone krwinki pacjenta za pomocą ujemnej próby kontrolnej firmy Lorne (monoklonalny odczynnik ujemnej próby kontrolnej D, nr kat. 650010). Badanie należy uznać za nieważne, jeśli monoklonalny odczynnik ujemnej próby kontrolnej D firmy Lorne powoduje aglutynację czerwonych krwinek (nr kat. 650010).
- Próbki do oznaczenia kategorii D^{VI} metodą **pośredniego testu antyglobulinowego, Coombs Bio-Rad, Bio-Rad-ID i Coombs Ortho BioVue**.
- Słabe antygeny D i warianty antygeny D są słabo wykrywalne za pomocą kart żelowych, płytek do mikromiareczkowania i metod szkiełkowych. Zaleca się badanie w kierunku słabych i częściowych wariantów antygeny D metodą probówkową.
- Antyglobulinowe badanie probówkowe można uznać za ważne tylko wtedy, gdy wszystkie ujemne testy reagują dodatnio z czerwonymi krwinkami uczulonymi przez IgG.
- 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 odczynnika i interpretacja wyników muszą zostać przeprowadzone przez odpowiednio przeszkolony i wykwalifikowany personel zgodnie z wymogami obowiązującymi w kraju, w którym odczynniki są używane.
- Użytkownik musi określić przydatność odczynników do zastosowania w innych metodach.

WYMAGANE ODCZYNNIKI I MATERIAŁY

- Odczynnik przeciwko globulinie ludzkiej, np. Lorne AHG Elite (nr kat. 435010), lub przeciwludzkie IgG, np. Lorne Anti-Human IgG (nr kat. 402010).
- Pipety wolumetryczne
- Szkiełka mikroskopowe lub białe karty
- Aplikatory
- Szklane probówki (10 x 75 mm lub 12 x 75 mm)
- Inkubator z kąpielą wodną lub inkubator z suchym ciepłem zrównoważony do 37°C ± 2°C
- Wirówka na probówki
- Myjka do komórek Coombsa
- Zatwierdzone mikropłytki U-kształtne
- Wirówka na mikropłytki
- Wytrząsarka do płytek

- Automatyczny czytnik płytek
- Karty Bio-Rad ID (LISS/Coombs) i (NaCl, test enzymatyczny i zimne aglutyniny)
- Wirówka Bio-Rad ID
- Roztwór Bio-Rad ID-CellStab lub ID-Diluent 2
- Inkubator Bio-Rad ID zrównoważony do 37°C ± 2°C
- Kasety systemu Ortho BioVue (AHG/Coombs) i (obojętne).
- Wirówka systemu Ortho BioVue.
- Blok cieplny systemu Ortho BioVue zrównoważony do 37°C ± 2°C
- Płyn rozcieńczający Ortho 0.8% Red Cell Diluent
- Czerwone krwinki uczulone przez IgG, np. komórki kontrolne Coombsa firmy Lorne (nr kat. 970010)
- Roztwór PBS (pH 6,8–7,2) lub izotoniczny roztwór soli fizjologicznej (pH 6,5–7,5)
- Dodatnie (najlepiej R₁r) i ujemne (rr) próby kontrolne czerwonych krwinek

ZALECANE METODY (KATEGORIE INNE NIŻ D^{VI})

A. Metoda probówkowa

1. Przygotować 2-3% zawiesinę krwinek czerwonych w roztworze PBS lub izotonicznym roztworze soli fizjologicznej.
2. Umieścić w oznakowanej probówce: 1 część odczynnika Lorne Duoclone i 1 część zawiesiny czerwonych krwinek.
3. Dokładnie wymieszać i odwirować wszystkie probówki przez 20 sekund z siłą 1000 rcf lub przez stosowny inny czas z odpowiednią siłą.
4. Delikatnie odtworzyć zawiesinę czerwonych krwinek i zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.
5. Wszelkie probówki, które wykazują wynik ujemny lub wątpliwy (co może mieć miejsce w przypadku próbek zawierających antygen D^I lub słaby antygen D), należy inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
6. Po inkubacji powtórzyć kroki 3 i 4.

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 badanych czerwonych krwinek i 25 µl odczynnika Lorne Duoclone
4. Odwirować karty ID w wirówce na karty żelowe.
5. Zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.

C. Metoda Ortho BioVue (karty 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 badanych czerwonych krwinek i 40 µl odczynnika Lorne Duoclone.
4. Odwirować kasetę(-y) w wirówce systemu Ortho BioVue.
5. Zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.

D. Metoda mikroplótkowa z użyciem płytek dołkowych U-kształtanych

1. Przygotować 2-3% zawiesinę krwinek czerwonych w roztworze PBS lub izotonicznym roztworze soli fizjologicznej.
2. Umieścić w odpowiednim dołku: 1 część odczynnika Lorne Duoclone i 1 część zawiesiny czerwonych krwinek.
3. Dokładnie wymieszać, najlepiej za pomocą wytrząsarki do mikroplótek, uważając, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 15 minut (czas zależny od użytkownika).
5. Odwirować mikroplótkę przez 1 minutę z siłą 140 rcf lub przez stosowny inny czas z odpowiednią siłą.
6. Odtworzyć zawiesinę krwinek poprzez dokładnie kontrolowane wstrząsanie na wytrząsarce do mikroplótek.
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 oznakowanym szkiełku lub karcie: 1 część odczynnika Lorne Duoclone i 1 część zawiesiny badanych 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.

ZALECANE METODY (WYKRYWANIA KATEGORII D^{VI})

A. Pośrednia metoda antyglobulinowa (IAT)

1. Przygotować 2-3% zawiesinę krwinek czerwonych w roztworze PBS lub izotonicznym roztworze soli fizjologicznej.
2. Umieścić w oznakowanej probówce: 1 część odczynnika Lorne Duoclone i 1 część zawiesiny badanych czerwonych krwinek.
3. Dokładnie wymieszać i inkubować w temperaturze 37°C przez 15 minut.

4. Przeplukać czerwone krwinki co najmniej raz za pomocą roztworu PBS lub izotonicznego roztworu soli fizjologicznej, zwracając uwagę, aby zlać roztwór soli fizjologicznej pomiędzy płukaniem, a następnie odtworzyć zawiesinę z każdej próbki czerwonych krwinek po każdym płukaniu. Całkowicie zlać roztwór soli fizjologicznej po ostatnim płukaniu.
5. Dodać 2 krople odczynnika AHG lub anty-IgG do każdej suchej próbki krwinek.
6. Dokładnie wymieszać i odwirować wszystkie probówki przez 20 sekund z siłą 1000 rcf lub przez stosowny inny czas z odpowiednią siłą.
7. Odtworzyć zawiesinę każdej próbki krwinek i zbadać makroskopowo.
8. Potwierdzić ważność wszystkich ujemnych reakcji za pomocą czerwonych krwinek uczulonych przez IgG.

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

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 Duoclone.
4. Inkubować kartę/karty ID przez 15 minut w temperaturze 37°C.
5. Odwirować karty ID w wirówce na karty żelowe.
6. Zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.

C. Metoda Ortho BioVue (karty AHG/Coombs)

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 badanych czerwonych krwinek i 40 µl odczynnika Lorne Duoclone.
4. Inkubować kasetę/kasety przez 15 minut w temperaturze 37°C.
5. Odwirować kasetę(-y) w wirówce systemu Ortho BioVue.
6. Zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.

INTERPRETACJA WYNIKÓW BADAŃ

1. **Wynik dodatni:** Aglutynacja czerwonych krwinek stanowi dodatni wynik badania, a przy zaakceptowanych ograniczeniach procedury testowej wskazuje na obecność antygeny D na czerwonych krwinkach.
2. **Wynik ujemny:** Brak aglutynacji czerwonych krwinek stanowi ujemny wynik badania, a przy zaakceptowanych ograniczeniach procedury testowej wskazuje na brak antygeny D na czerwonych krwinkach.
3. Należy wykluczyć wyniki badań komórek poddanych aglutynacji przy użyciu ujemnej próby kontrolnej, ponieważ aglutynacja jest najprawdopodobniej spowodowana działaniem makrocząsteczkowych wzmacniaczy w odczynniku na uczulone komórki.

STABILNOŚĆ REAKCJI

1. Wyniki badań metodą probówkową i mikroplótkową należy odczytać natychmiast po odwirowaniu.
2. Czynności płukania należy wykonywać bez przerywania; próbki należy odwirować i odczytać wyniki natychmiast po dodaniu odczynnika przeciwno ludzkiej globulinie, ponieważ opóźnienia mogą powodować dysocjację kompleksów antygen-przeciwciała, prowadząc do fałszywie ujemnych lub słabo pozytywnych reakcji.
3. Badania wykonane metodą szkiełkową powinny być interpretowane po maksymalnie 1 minucie, aby zapewnić swoistość testu i uniknąć możliwości błędnego zinterpretowania wyniku ujemnego jako wyniku dodatniego z powodu wyschnięcia odczynnika.
4. Należy zachować ostrożność podczas interpretacji wyników badań przeprowadzonych w temperaturach innych niż zalecane.

OGRANICZENIA

1. Odczynnik anti-D firmy Lorne nie nadaje się do stosowania z komórkami traktowanymi enzymem lub komórkami zawieszonymi w roztworze LISS.
2. Zastosowanie roztworów do sporządzania zawiesin krwinek czerwonych innych niż opisane w punktach „Zalecane metody” tego dokumentu musi zostać zweryfikowane przed użyciem. Niektóre roztwory mogą powodować reakcje fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne.
3. Przechowywana krew może wykazywać słabsze reakcje niż świeża krew.
4. Fałszywie dodatnią aglutynację można zaobserwować podczas testowania komórek uczulonych przez IgG.
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;

SWOISTY CHARAKTER DZIAŁANIA

1. Przed dopuszczeniem do obrotu każdą partię odczynnika monoklonalnego Lorne anti-D Duoclone przebadano przy użyciu zalecanych metod testowych wymienionych w niniejszej instrukcji użytkownika. Badania były zgodne z wymogami testowymi określonymi w aktualnej wersji/wydaniu „Wytycznych dotyczących transfuzji krwi w Wielkiej Brytanii” (Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom) oraz „Wspólnych specyfikacji technicznych” (Common Technical Specifications).
2. Swoistość źródłowych przeciwciał monoklonalnych wykazano za pomocą panelu komórek antygenowo ujemnych.
3. Siła działania odczynnika 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-D 99/836.

4. Kontrolę jakości odczynników przeprowadzono przy użyciu czerwonych krwinek z fenotypami, które zostały zweryfikowane przez brytyjskie centrum krwiodawstwa i zostały przed użyciem przemyte za pomocą roztworu PBS lub izotonicznego roztworu soli fizjologicznej.

OGRANICZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI

1. Użytkownik ponosi odpowiedzialność za działanie odczynnika podczas korzystania z dowolnej metody innej niż wymienione **zalecane metody**.
2. Wszelkie odstępstwa od **zalecanych metod** powinny zostać zweryfikowane przed użyciem⁶.

LITERATURA

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, rozdz. 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; str. 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.

DOSTĘPNE WIELKOŚCI OPAKOWAŃ ODCZYNNIKÓW

Pojemność fiołki	Numer katalogowy	Badań na fiołkę
10 ml	740010	200
1000 ml	740000*	20 000
5000 ml	740000x5*	100 000

*Fiołki 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

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