

MONOKLONÁLNÍ ČINIDLA PRO STANOVENÍ KREVŇÍCH SKUPIN NÁVOD K POUŽITÍ

Anti-D Clone 1 a Clone 2 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 dárce 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 antigenu D na povrchu lidských červených krvinek a způsobují přímou aglutinaci (shlukování) lidských červených krvinek, které nesou odpovídající antigen D. Nepřítomnost aglutinace (nepřítomnost shlukování) obecně indikuje nepřítomnost antigenu D na povrchu lidských červených krvinek (viz část **Omezení**).

ČINIDLA

Lorne Monoclonal IgM Anti-D Clone 1 a Clone 2 jsou nízkoproteinová činidla ke stanovení krevních skupin, která obsahují lidskou monoklonální protilátku IgM v roztoku chloridu sodného (0,9 g%), hovězího albuminu (2,0 g%) a makromolekulárních potenciátorů (1,5 g%). Při typizaci vzorků pacientů každé 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. Každé 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**.

Produkt	Buněčná kultura / klon
Anti-D Clone 1	RUM-1
Anti-D Clone 2	MS-201

OSLABENÁ EXPRESE ANTIGENU RhD

Souhrnné označení D^s 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. Buňky D^{VI} představují kategorii parciálního fenotypu D, které chybí většina epitopů D. Obě činidla Clone 1 i Clone 2 detekují metodou přímé aglutinace většinu variant červených krvinek slabého nebo parciálního typu D s výjimkou buněk D^{VI}.

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 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 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

- 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 známkou 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 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).
- Míra detekce slabých a parciálních variant antigenu D metodou s využitím gelové karty, mikrotitrační destičky nebo sklíčka je nízká. Slabé a parciální varianty antigenu D 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 použití činidla 1 při jiných metodách je na posouzení uživatele.

ČINIDLA A POTŘEBNÝ MATERIÁL

- odměrné pipety
- karty Bio-Rad ID (NaCl, enzymový test a chladové aglutininy)
- odstředivka Bio-Rad ID
- roztok Bio-Rad ID-CellStab nebo ID-Diluent 2
- kazety systému Ortho BioVue (Neutrální)
- odstředivka systému Ortho BioVue
- ředicí činidlo Ortho 0,8% Red Cell Diluent
- mikroskopická sklíčka nebo bílé karty
- aplikační tyčinky
- skleněné zkumavky (10 x 75 mm nebo 12 x 75 mm)
- odstředivka vhodná pro zkumavky
- validované mikrotitrační destičky s „U“ jamkami
- odstředivka vhodná pro mikrotitrační destičky
- třepačka na destičky
- 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

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-D a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
- Důkladně promíchejte a odstředte všechny zkumavky po dobu 20 sekund při odstředivé síle 1000 RCF, případně dobu a sílu odstředění vhodně upravte.
- Sedimentované červené krvinky jemně resuspendujte a makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.
- Veškeré zkumavky, které vykazují negativní nebo nejednoznačný výsledek (což se může stát u vzorků se slabým antigenem D), 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)

1. V roztoku ID-CellStab nebo ID-Diluent 2 připravte 0,8% suspenzi červených krvinek.
2. Z potřebného množství mikrozkupek odstraňte hliníkovou fólii.
3. Do příslušné mikrozkupekvy přidejte: 50 µl suspenze červených krvinek a 25 µl činidla Lorne Anti-D.
4. Odstředte ID kartu/karty v odstředivce určené pro gelové karty Bio-Rad.
5. Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

C. Metoda Ortho BioVue (Neutrální kazety)

1. V 0,8% roztoku Ortho Red Cell Diluent připravte 0,8% suspenzi červených krvinek.
2. Z potřebného množství reakčních komůrek odstraňte hliníkovou fólii.
3. Do příslušné reakční komůrky přidejte: 50 µl suspenze červených krvinek a 40 µl činidla Lorne Anti-D.
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 červených krvinek.
2. Do příslušné jamky přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Anti-D a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
3. Důkladně promíchejte, nejlépe na mikrotitrační třepačce, 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 třepačce sedimentované buňky resuspendujte.
7. Makroskopicky nebo pomocí validované automatické čtečky odečtěte výsledek.
8. Slabé reakce je třeba vždy zopakovat s využitím zkušavkové metody.

E. Sklíčková metoda

1. Připravte 35–45% suspenzi červených krvinek 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 Anti-D a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
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 sklíčku 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 zkušavkové metody.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU

1. **Pozitivní:** Aglutinace červených krvinek znamená pozitivní výsledek testu a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje přítomnost antigenu D na červených krvinkách.
2. **Negativní:** Nepřítomnost aglutinace červených krvinek 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 zkušavkách a na mikrotitračních destičkách odečtěte výsledky ihned po odstředění.
2. 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.
3. Při interpretaci výsledků testů prováděných při jiných než doporučených teplotách postupujte obezřetně.

OMEZENÍ

1. Činidlo Lorne Anti-D není vhodné používat s buňkami ošetřenými enzymy, buňkami suspendovanými v roztoku LISS nebo v rámci nepřímých antiglobulinových metod (IAT).
2. Skladovaná krev může vykazovat slabší reakci než krev čerstvá.
3. Falešně pozitivní aglutinace může být způsobena přítomností makromolekulárních potenciátorů v činidle při testování buněk senzibilizovaných IgG (např. AIHA, HNN).
4. 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 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. Činidla anti-D ke stanovení skupiny pacientů s antigenem D by neměla za použití doporučených metod reagovat s buňkami D⁺.
3. Specifita zdrojových monoklonálních protilátek byla prokázána pomocí panelu antigen-specifických buněk.
4. Účinnost činidel byla testována na základě následujících referenčních standardů s minimální účinností získaných z britského národního institutu biologických standardů a kontrol NIBSC (National Institute of Biological Standards and Controls):
 - referenční standard Anti-D 99/836.
5. 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.

LYLOUČENÍ ODPOVĚDNOSTI

1. Za účinnost činidel použitých 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.

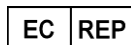
DOSTUPNÉ VELIKOSTI BALENÍ ČINIDEL

	Objem nádob	Katalogové číslo	Počet testů na nádobu
Anti-D Clone 1 Monoclonal	10 ml	730010	200
	1000 ml	730000*	20 000
	5000 ml	730000x5*	100 000
Anti-D Clone 2 Monoclonal	10 ml	710010	200
	1000 ml	710000*	20 000
	5000 ml	710000x5*	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