

ČINIDLA PRO STANOVENÍ LIDSKÝCH KREVŇÍCH SKUPIN NÁVOD K POUŽITÍ

Anti-Fy^b Polyclonal: Určeno pro nepřímé antiglobulinové metody.

SHRNUTÍ

Antigen Fy^a byl objeven v roce 1950, antigen Fy^b pak v roce 1951. Anti-Fy^b se podílí na akutní i opožděné hemolytické potransfuzní reakci a hemolytické nemoci novorozenců.

Anti-Fy ^a	Anti-Fy ^b	Fenotyp	Bělošská populace ¹	Afroameričané ¹
+	0	Fy(a+b-)	17%	9%
0	+	Fy(a-b+)	34%	22%
+	+	Fy(a+b+)	49%	1%
0	0	Fy(a-b-)	vzácně	68

URČENÉ POUŽITÍ

Činidlo ke stanovení krevních skupin je určeno ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti, nebo nepřítomnosti antigenu Fy^b (FY2) 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

Činidlo obsahuje protilátky proti antigenu Fy^b na povrchu lidských červených krvinek a způsobuje v antiglobulinové fázi testování nepřímou aglutinaci (shlukování) lidských červených krvinek, které nesou odpovídající antigen Duffy b. Nepřítomnost aglutinace (nepřítomnost shlukování) obecně indikuje nepřítomnost odpovídajícího antigenu Duffy b (viz část **Omezení**).

ČINIDLA

Činidlo Lorne Human Anti-Fy^b ke stanovení krevních skupin se připravuje z lidského séra naředěného v roztoku chloridu sodného s obsahem makromolekulárních potenciátorů (1,9 g%) a hovězího albuminu. 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 k použití 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**.

SKLADOVÁNÍ

Nádoby 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 při stabilitě 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.
- Z plazmy, z níž je činidlo vyrobeno, se již neodstraňují lipidy, proto je normální, když má činidlo zakalený vzhled.
- Činidla obsahují < 0,1 % azidu sodného. Azid sodný může být při požití toxický a může reagovat s oloveným a měděným potrubím za vzniku výbušných azidů kovů. Při likvidaci spláchněte velkým množstvím vody.
- Schválené mikrobiologické testy zdrojových materiálů použitých k výrobě činidel 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 ROZLÍTÍ

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

KONTROLY A POKYNY

- V každé sérii testů je doporučeno provádět současně testování pozitivní (nejlépe s využitím heterozygotních buněk) a negativní kontroly. Pokud kontroly neukazují očekávané výsledky, považujte testy za neplatné.
- Antiglobulinové metody lze považovat za platné, pouze pokud všechny negativní testy mají s červenými krvinkami senzibilizovanými IgG pozitivní reakci.
- Činidla obsahují makromolekulární potenciátory, které mohou způsobit falešně pozitivní reakci s buňkami senzibilizovanými IgG, pro ověření těchto falešně pozitivních reakcí se proto doporučuje otestovat buňky pacienta jeho vlastní plazmou.
- Většina proteolytických enzymů ruší reaktivitu Fy^b.
- Před použitím nechte činidlo zahřát na pokojovou teplotu. Po použití vraťte činidlo ihned zpět na úložné místo při teplotě 2–8 °C.
- V části **Zkumavková metoda** 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 POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ BALENÍ

Zkumavková metoda

- lidský antiglobulin, tj. Lorne AHG Elite (kat. č. 435010 nebo 415010) nebo činidlo proti lidskému IgG, tj. Lorne Anti-Human IgG (kat. č. 402010 nebo 401010)
- promývačka buněk na bázi Coombsovy metody
- skleněné zkumavky (10 x 75 mm nebo 12 x 75 mm)
- fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) (pH 6,8–7,2) nebo izotonický fyziologický roztok (Isotonic) (pH 6,5–7,5)
- červené krvinky senzibilizované IgG, tj. Lorne Coombs Control Cells (kat. č. 970010)
- červené krvinky pro pozitivní (nejlépe heterozygotní) a negativní kontrolu
- inkubátor se suchým teplem nebo vodní lázní nastavený na stabilní teplotu 37 °C ±2 °C

Metoda typizace Bio-Rad-ID Micro

- karty Bio-Rad ID (LISS/Coombs nebo Coombs Anti-IgG)
- odstředivka Bio-Rad ID
- roztok Bio-Rad ID-CellStab nebo ID-Diluent 2
- inkubátor Bio-Rad ID nastavený na stabilní teplotu 37 °C ±2 °C

Metoda typizace Ortho BioVue

- kazety systému Ortho BioVue (AHG Polyspecific nebo AHG Anti-IgG)
- odstředivka systému Ortho BioVue
- topný box Ortho BioVue System Heat Block nastavený na stabilní teplotu 37 °C ±2 °C
- ředicí činidlo Ortho 0,8% Red Cell Diluent

Všechny metody

- odměrné pipety

DOPORUČENÉ METODY

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

- Ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic připravte 2–3% suspenzi červených krvinek.
- Do štítkem označené zkumavky přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
- Důkladně promíchejte a inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
- Promyjte červené krvinky nejméně třikrát ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic. Mezi promýváním roztok pečlivě dekantujte a po každém promytí sedimentované červené krvinky resuspendujte. Po posledním promytí fyziologický roztok zcela dekantujte.
- Ke každému suchému buněčnému sedimentu přidejte 2 objemové jednotky AHG Elite nebo anti-Human IgG.
- Důkladně promíchejte a odstředte všechny zkumavky po dobu 20 sekund při odstředivé síle 1000 RCF, případně dobu a sílu odstředivé vhodně upravte.
- Sedimentované červené krvinky jemně resuspendujte a makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.
- Pomocí červených krvinek 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 červených krvinek.
2. Z potřebného množství mikrozkuavek na ID kartách LISS/Coombs nebo Coombs Anti-IgG odstraňte hliníkovou fólii.
3. Do příslušné mikrozkuavky přidejte: 50 µl 0,8% suspenze červených krvinek a 25 µl činidla Lorne.
4. Inkubujte ID kartu/karty při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
5. Odstředte ID kartu/karty v odstředivce Bio-Rad ID.
6. Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

C. Metoda Ortho BioVue (kazeta AHG)

1. V 0,8% roztoku Ortho Red Cell Diluent připravte 0,8% suspenzi červených krvinek.
2. Z potřebného množství reakčních komůrek na kazetách AHG Polyspecific nebo AHG Anti-IgG odstraňte hliníkovou fólii.
3. Do příslušné reakční komůrky přidejte: 50 µl suspenze červených krvinek a 40 µl činidla Lorne.
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 červených krvinek znamená pozitivní výsledek testu a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje přítomnost odpovídajícího antigenu Duffy na červených krvinkách.
2. **Negativní:** Nepřítomnost aglutinace červených krvinek znamená negativní výsledek a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje nepřítomnost odpovídajícího antigenu Duffy na červených krvinkách.

STABILITA REAKCÍ

1. Promývání vzorků je třeba provést bez přerušení a po přidání činidla je nezbytné vzorky ihned odstředit a odečíst výsledky. Prodleva může způsobit rozklad komplexů antigen a protilátka s následným falešně negativním nebo slabě pozitivním výsledkem.
2. Při interpretaci výsledků testů prováděných při jiných než **doporučených** teplotách postupujte obezřetně.

OMEZENÍ

1. Červené krvinky, které mají pozitivní přímý antiglobulinový test v důsledku vazby s IgG, nelze **nepřímou antiglobulinovou metodou** typizovat.
2. Činidlo obsahuje makromolekulární potenciátory, které mohou způsobit falešně pozitivní reakci s buňkami senzibilizovanými IgG. Pro ověření těchto falešně pozitivních reakcí se proto doporučuje otestovat buňky pacienta jeho vlastní plazmou.
3. Protilátky zaměřené na antigeny s nízkou frekvencí výskytu se mohou objevit jako neznámé kontaminanty v antiséru pro stanovení krevních skupin. Některé antigeny (např. Bg, Sd^a) mohou být navíc přítomny na červených krvinkách v excitovaném stavu. Tyto jevy mohou být příčinou vzácných falešně pozitivních reakcí, které se mohou vyskytnout u více než jedné šarže dané specifity.
4. Naprostou nepřítomnost kontaminujících protilátek není možné zaručit, protože červené krvinky, které nesou antigeny s nízkým výskytem nebo excitované antigeny, není vždy možné otestovat.
5. Potlačená nebo snížená exprese antigenů některých krevních skupin může naopak vést k falešně negativním výsledkům, proto je třeba vždy postupovat obezřetně, když na základě výsledků testů stanovujete genotypy.
6. Falešně pozitivní aglutinaci lze pozorovat při testování buněk senzibilizovaných IgG.
7. Falešně pozitivní výsledky se mohou objevit účinkem makromolekulárních potenciátorů, které jsou obsaženy v činidle.
8. 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 činidla byla před uvedením na trh testována za použití 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“).
2. Přítomnost kontaminujících protilátek proti antigenům s incidencí 1 % a vyšší v náhodné populaci byla vyloučena v testech za použití odpovídajících antigen-negativních červených krvinek nebo v testech využívajících již absorbovaná činidla k odstranění nežádoucích specifit.
3. Protilátky proti Xg^a, Do^a, Yt^a, Co^b, Wr^a, Bg^a a V^w nemusí být při běžném testování specifity vyloučeny a detekce závisí na dostupnosti odpovídajících testovacích buněk. To samé lze prohlásit o Yt^b, M⁹ a V^w a jiných antigenech s nízkým výskytem, které nemusí být při běžném testování specifity vyloučeny, a detekce opět závisí na dostupnosti odpovídajících testovacích buněk.
4. 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.

VYLOUČENÍ 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 validovat⁵.

BIBLIOGRAFIE

1. Marion E. Reid a Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; strana 183.
2. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3. vydání. Montgomery Scientific, Miami 1985; kapitola 6.
3. AABB Technical Manual, 16. vydání, AABB 2008.
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6. vydání 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.

DOSTUPNÉ VELIKOSTI BALENÍ ČINIDEL

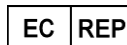
	Objem nádoby	Katalogové číslo	Počet testů na nádobu
Anti-Fy ^b	2 ml	317002	40
Polyclonal	1000 ml	317000*	20 000

*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