

AHG ZE SMĚSI POLYSPECIFICKÝCH (KRÁLIČÍCH) ANTI-IgG A ANTI-C3d NÁVOD K POUŽITÍ

AHG Elite (Clear nebo Green): Určeno pro antiglobulinové metody.

SHRNUTÍ

Coombs, Mourant a Race popsali v roce 1945 použití séra AHG k detekci neaglutinujících protilátek na povrchu červených krvinek. Dacie et al. v roce 1957 prokázali, že protilátky přítomné v antiglobulinovém séru jsou namířeny proti určitým složkám komplementu. Činidla AHG po reakci antigenu s protilátkou *in vivo* nebo *in vitro* detekují molekuly neaglutinujících protilátek a rovněž molekuly komplementu navázané na červené krvinky.

URČENÉ POUŽITÍ

Tato polyspecifická činidla pro stanovení krevních skupin jsou určena ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti, nebo nepřítomnosti senzibilizujících protilátek IgG (všech 4 podtříd) a faktorů komplementu C3d a C3b na povrchu červených krvinek za předpokladu, že testy probíhají v souladu s doporučenými postupy stanovenými v tomto návodu k použití.

PRINCIP

Činidla obsahují protilátky proti lidským protilátkám IgG a faktorům komplementu C3 (C3d a C3b) na lidských červených krvinkách a způsobují přímou aglutinaci (shlukování) červených krvinek, které jsou senzibilizovány lidskými protilátkami IgG a/nebo faktory komplementu C3 (C3d a C3b). Nepřítomnost aglutinace obecně indikuje nepřítomnost senzibilizujících lidských protilátek IgG a faktorů komplementu C3 (C3d a C3b) na povrchu lidských červených krvinek (viz část **Omezení**).

ČINIDLA

Činidla Lorne AHG Elite Clear a AHG Elite Green obsahují králičí protilátky anti-IgG s nespecifickou aktivitou odebrané adsorpcí a myší monoklonální IgM anti-C3d, klon BRIC-8. Protilátky jsou naředěny v pufovaném roztoku s obsahem hovězího albuminu. Činidla neobsahují látky karcinogenní, mutagenní nebo toxické pro reprodukci (CMR), látky narušující endokrinní systém ani látky, které by mohly u uživatele vyvolat senzibilizační 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**.

Činidlo	Buněčná kultura / klon	Barva	Použité barvivo
AHG Elite Clear	králičí IgG proti lidským protilátkám BRIC-8 (Anti-C3d)	bez barvy	žádné
AHG Elite Green	králičí IgG proti lidským protilátkám BRIC-8 (Anti-C3d)	zelená	patentní modř a tartrazin

SKLADOVÁNÍ

Nádobys 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

Vzorky je třeba odebrat asepticky do antikoagulantu EDTA, aby nedošlo k vazbě komplementu *in vitro*, a co nejdříve analyzovat. Není-li EDTA k dispozici, vhodnější je odebrat vzorky do antikoagulantů ACD, CPD nebo CPDA-1, než použít vzorky sražené. Jsou-li dostupné pouze sražené vzorky, před testováním je nezchlazujte.

UPOZORNĚNÍ

- Činidla jsou určena výhradně k diagnostice *in vitro*.
- Je-li nádobys 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 0,2µm 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 známka 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 činidel a dekontaminaci místa, kde došlo k jejich rozlití, najdete v **bezpečnostních listech**, které jsou k dispozici na vyžádání.

KONTROLY A POKYNY

- V každé sérii testů je doporučeno provádět současně testování pozitivní (slabé Anti-D, < 0,1 IU/ml) a negativní kontroly (inertní sérum). 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.
- 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 činidla a interpretovat výsledky smí pouze řádně vyškolený a kvalifikovaný personál v souladu s požadavky země, kde jsou činidla používána.
- Vhodnost použít činidel při jiných metodách je na posouzení uživatele.

ČINIDLA A POTŘEBNÝ MATERIÁL

- promývačka buněk na bázi Coombsovy metody
- skleněné zkumavky (10 x 75 mm nebo 12 x 75 mm)
- červené krvinky senzibilizované IgG, tj. Lorne Coombs Control Cells (kat. č. 970010)
- inertní protilátka, např. Lorne Inert AB Serum (kat. č. 110010)
- roztok s nízkou iontovou silou (LISS): s obsahem 0,03M NaCl, 0,003M Na₂HPO₄; pufr NaH₂PO₄ s pH 6,7 při teplotě 22 °C ± 1 °C a 0,24M glycin
- fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) (pH 6,8–7,2) nebo izotonický fyziologický roztok (Isotonic) (pH 6,5–7,5)
- odměrné pipety
- inkubátor se suchým teplem nebo vodní lázní nastavený na stabilní teplotu 37 °C ± 2 °C
- slabý Anti-D, např. Lorne Precise Weak Anti-D (kat. č. 209005)

DOPORUČENÉ METODY

A. Přímá antiglobulinová metoda (Direct Antiglobulin Technique; DAT)

- Promyjte 1 objemovou jednotku červených krvinek (2–3% suspenze ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic) čtyřikrát 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.
- Ke každému suchému sedimentu buněk přidejte 2 objemové jednotky činidla Lorne AHG Elite.
- 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.

B. Nepřímá antiglobulinová metoda NISS (Indirect Antiglobulin Technique; NISS IAT)

- Ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic připravte 2–3% suspenzi červených krvinek.
- Do štítkem označené zkumavky přidejte 2 objemové jednotky testovacího séra a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
- Důkladně promíchejte a inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
- Promyjte červené krvinky čtyřikrát 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 sedimentu buněk přidejte 2 objemové jednotky činidla Lorne AHG Elite.
- 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.

C. Nepřímá antiglobulinová metoda LISS (Indirect Antiglobulin Technique; LISS IAT)

- V roztoku LISS připravte 1,5–2% suspenzi červených krvinek.
- Do štítkem označené zkumavky přidejte 2 objemové jednotky testovacího séra a 2 objemové jednotky suspenze červených krvinek.

- Důkladně promíchejte a inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
- Postupujte podle kroků 4 až 7 metody **NISS IAT** výše.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU

- Pozitivní:** Aglutinace červených krvinek znamená pozitivní výsledek testu a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje přítomnost IgG a/nebo komplementu (C3d/C3b) na červených krvinkách.
- Negativní:** Nepřítomnost aglutinace červených krvinek znamená negativní výsledek a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje nepřítomnost IgG a/nebo komplementu (C3d/C3b) na červených krvinkách.

STABILITA REAKCÍ

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

OMEZENÍ

- Červené krvinky, které mají pozitivní přímý antiglobulinový test v důsledku vazby s IgG, nelze **nepřímými antiglobulinovými metodami** typizovat.
- Pozitivní přímý antiglobulinový test v důsledku senzibilizace komplementu nemusí odrážet fixaci komplementu *in vivo*, pokud jsou vyšetřované buňky odebrány ze sraženého zchlazeného vzorku.
- Nedostatečné promytí červených krvinek při nepřímém antiglobulinovém testu může neutralizovat činidlo AHG.
- Nadměrné množství zbytkového fyziologického roztoku po dokončení promývací fáze může naředit činidlo AHG Elite a snížit tak jeho účinnost.
- Negativní výsledek přímého antiglobulinového testu nutně nevylučuje klinickou diagnózu hemolytické nemoci novorozenců nebo autoimunitní hemolytická anémie na základě systému AB0. Rovněž nelze vyloučit HNN, zejména při podezření na inkompatibilitu v systému AB0.
- 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

SPECIFICKÁ CHARAKTERISTIKA TESTU

- Každá šarže činidel byla před uvedením na trh testována za použití doporučených testovacích metod, které jsou uvedeny v tomto návodu k použití, na reakci s červenými krvinkami s vazbou Anti-D, Anti-K a Anti-Fy^a z důvodu kontroly vhodné reaktivity. 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“).
- Účinnost činidel anti-IgG a anti-C3d 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-AHG 96/666.
- Účinnost anti-C3d prokázaly testy využívající buňky s navázaným fragmenty C3d a C3b.
- Přítomnost kontaminujících heterospecifických aglutininů či protilátek proti C4d vyloučily testy s využitím červených krvinek všech skupin systému AB0 a buněk s vazbou C4d.
- Reaktivita jakýchkoli potenciálně přítomných složek anti-IgM, anti-IgA či lehkých řetězců protilátek nebyla stanovena.
- 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

- Za účinnost činidel použitých jinými technikami, než které jsou uvedeny v části **Doporučené metody**, odpovídá uživatel.
- Jakékoli odchylky od **doporučených metod** je třeba před použitím validovat⁶.

BIBLIOGRAFIE

- Voak D, Downie DM, Moore BPL a Engelfreit CP. Anti-Human Globulin reagent specification. The European and ISBT/ICSH View. Biotest Bulletin 1: 7-22 (1986).
- The Department of Health and Social Security. Health Services Management Antiglobulin Test. False negative results, HN (Hazard) (83) 625, listopad 1983.
- Bruce M, Watt AH, Hare W, Blue A, Mitchell R. A serious source of error in antiglobulin testing. Transfusion 1986; **26**: 177-181.
- Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in AHG (AHG) tests: optimum conditions and quality control. Haematologia 1988; **21**(1): 3-16.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6. vydání 2002. The Stationary Office.
- 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

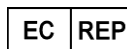
	Objem nádoby	Katalogové číslo	Počet testů na nádobu
Lorne AHG Elite (Clear)	10 ml	415010	100
	1000 ml	415000*	10 000
Lorne AHG Elite (Green)	10 ml	435010	100
	1000 ml	435000*	10 000

*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