

## MONOKLONÁLNÍ ČINIDLA PRO STANOVENÍ KREVNÍCH SKUPIN

### NÁVOD K POUŽITÍ

**Anti-A, Anti-B a Anti-A,B Monoclonal:** Určeno pro testy ve zkumavce, na mikrotitrační destičce, sklíčku a metody Bio-Rad-ID a Ortho BioVue.

### SHRNUTÍ

V roce 1900 Karl Landsteiner objevil, že krevní sérum některých lidí aglutinuje červené krvinky jiných lidí. Nyní rozlišujeme čtyři běžné fenotypy: 0, A, B a AB. Dále byly identifikovány podskupiny A a B.

Skupina dle přímého testu			Skupina dle reverzního testu				AB0 fenotyp	Bělošská populace % <sup>1</sup>
A	B	A,B	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B	0		
+	0	+	0	0	+	0	A	43
0	+	+	+	+	0	0	B	9
0	0	0	+	+	+	0	0	44
+	+	+	0	0	0	0	AB	4

### URČENÉ POUŽITÍ

Činidla AB0 ke stanovení krevních skupin jsou určena ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti, nebo nepřítomnosti antigenů A a/nebo B na povrchu červenýchrvinek 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 příslušným antigenům A a/nebo B na povrchu lidských červenýchrvinek a způsobují přímou aglutinaci (shlukování) červenýchrvinek, které nesou odpovídající antigen AB0. Nepřítomnost aglutinace obecně indikuje nepřítomnost odpovídajícího antigenu AB0 na povrchu lidských červenýchrvinek (viz část **Omezení**).

### ČINIDLA

Činidla Lorne Monoclonal IgM AB0 ke stanovení krevních skupin obsahují myši monoklonální protilátky naředěné ve fosfátovém pufru s obsahem chloridu sodného, EDTA 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**.

Produkt	Buněčná kultura / klon	Barva	Použité barvivo
Anti-A	9113D10	modrá	patentní modř
Anti-B	9621A8	žlutá	tartrazin
Anti-A,B	152D12 + 9113D10 + ES15	bez barvy	žádné

### SKLADOVÁNÍ

Nádooby 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 fosfátovém 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 0,2µm 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.
- 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.

### 1. KONTROLY A POKYNY

- V každé sérii testů je doporučeno provádět současně testování pozitivní a negativní kontroly. Pokud kontroly neukazují očekávané výsledky, považujte testy za neplatné.
- Tato činidla neobsahují makromolekulární potenciátory, proto je velmi nepravděpodobné, že buňky s vrstvou IgG způsobí falešně pozitivní reakci.
- Krevní vzorky slabých podskupin A nebo B (např. Ax) při testování na sklíčku, mikrotitrační destičce či gelové kartě mohou zapříčinit falešně negativní výsledek, případně slabou reakci. Testování slabých podskupin je doporučeno zopakovat zkumavkovou metodou.
- Výsledky stanovení krevní skupiny AB0 u jedinců starších šesti měsíců je třeba ověřit vyšetřením reakce séra nebo plazmy s buňkami se známou skupinou A1 a B, než lze jejich krevní skupinu AB0 potvrdit.
- 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 použít činidla 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
- ředící 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
- fosfátém pufovaný fyziologický roztok (PBS) (pH 6,8–7,2) nebo izotonický fyziologický roztok (Isotonic) (pH 6,5–7,5)
- červené krvinky pro pozitivní a negativní kontrolu:
  - Anti-A: skupina A (pozitivní kontrola) a skupina 0 (negativní kontrola)
  - Anti-B: skupina B (pozitivní kontrola) a skupina 0 (negativní kontrola)
  - Anti-A,B: skupina A a skupina B (pozitivní kontroly) a skupina 0 (negativní kontrola)

### DOPORUČENÉ METODY

#### A. Zkumavková metoda

- Ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic připravte 2–3% suspenzi červenýchrvinek.
- Do štítkem označené zkumavky přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Anti-ABO a 1 objemovou jednotku suspenze červenýchrvinek.
- Důkladně promíchejte a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 1 minuty.
- Odstředivte všechny zkumavky po dobu 10 sekund při odstředivé síle 1000 RCF, případně dobu a sílu odstředění vhodně upravte.
- Sedimentované červené krvinky jemně znovu resuspendujte a makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.
- Veškeré zkumavky, které vykazují negativní nebo nejednoznačný výsledek, je třeba inkubovat při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
- Po inkubaci zopakujte kroky 4 a 5.

#### B. Metoda Bio-Rad-ID (karty NaCl, enzymový test a chladové aglutininy)

- V roztoku ID-CellStab nebo ID-Diluent 2 připravte 0,8% suspenzi červenýchrvinek.

- Z potřebného množství mikrozkuvek odstraňte hliníkovou fólii.
- Do příslušné mikrozkuvky přidejte: 50 µl suspenze červených krvinek a 25 µl činidla Lorne Anti-ABO.
- Odstředte ID kartu/karty v odstředivce Bio-Rad ID.
- Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

### C. Metoda Ortho BioVue (Neutrální kazety)

- V 0,8% roztoku Ortho Red Cell Diluent připravte 0,8% suspenzi červených krvinek.
- Z potřebného množství reakčních komůrek odstraňte hliníkovou fólii.
- Do příslušné reakční komůrky přidejte: 50 µl suspenze červených krvinek a 40 µl činidla Lorne Anti-ABO.
- Odstředte kazetu/kazety v odstředivce systému Ortho BioVue.
- Makroskopicky odečtěte výsledek aglutinace.

### D. Metoda s využitím mikrotitračních destiček s „U“ jamkami

- Ve fyziologickém roztoku PBS nebo Isotonic připravte 2–3% suspenzi červených krvinek.
- Do příslušné jamky přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Anti-ABO a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
- Důkladně promíchejte, nejlépe na mikrotitrační třepačce, a dbejte, aby nedošlo mezi jamkami ke křížové kontaminaci.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 15 minut (čas určuje uživatel).
- Odstředte mikrotitrační destičku po dobu 1 minuty při odstředivé síle 140 RCF, případně dobu a sílu odstředění vhodně upravte.
- Řízeným pohybem na mikrotitrační třepačce sedimentované buňky znovu rozptýlte.
- Makroskopicky nebo pomocí validované automatické čtečky odečtěte výsledek.
- Slabé reakce je třeba vždy zopakovat s využitím zkušební metody.

### E. Sklíčková metoda

- Připravte 35–45% suspenzi červených krvinek v séru, plazmě nebo fyziologickém roztoku PBS/Isotonic, případně použijte antikoagulanou plninu krev (ve vlastní plazmě).
- Na štítkem označené mikroskopické sklíčko nebo kartu přidejte: 1 objemovou jednotku činidla Lorne Anti-ABO a 1 objemovou jednotku suspenze červených krvinek.
- Pomocí čisté aplikační tyčinky smíchejte činidlo a buňky na ploše přibližně 20 x 40 mm.
- Při pokojové teplotě jemně sklíčkem kývejte dopředu a dozadu po dobu 30 sekund a během jedné minuty obsah na sklíčko občas znovu promíchejte.
- V rozptýleném světle odečtěte po 1 minutě makroskopicky výsledek a nezaměřujte fibrinová vlákna za aglutinaci.
- Slabé reakce je třeba vždy zopakovat s využitím zkušební metody.

### INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU

- Pozitivní:** Aglutinace červených krvinek znamená pozitivní výsledek testu a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje přítomnost odpovídajícího antigenu AB0 na červených krvinkách.
- Negativní:** Nepřítomnost aglutinace červených krvinek znamená negativní výsledek a v rámci přijatelných omezení testovací metody indikuje nepřítomnost odpovídajícího antigenu AB0 na červených krvinkách.
- Neshodný výsledek:** Pokud výsledná skupina dle reverzního testu neodpovídá skupině dle přímého testu, je nezbytné provést další vyšetření.

### STABILITA REAKCÍ

- U všech testů ve zkušebnách a na mikrotitračních destičkách odečtěte výsledky ihned po odstředění.
- Sklíčkové testy je nezbytné interpretovat po maximálně jedné minutě, aby byla zajištěna specifita a vyloučena možnost, že negativní výsledek bude mylně interpretován jako pozitivní v důsledku zasychání činidla.
- Při interpretaci výsledků testů prováděných při jiných než doporučených teplotách postupujte obezřetně.

### OMEZENÍ

- Antigeny AB0 nejsou při narození plně rozvinuty, proto mohou být reakce vzorků pupečnickové a novorozenecké krve slabší.
- Při použití monoklonálního činidla Anti-A,B mohou krevní vzorky slabých podskupin A nebo B (např. Ax) při testování na sklíčko, mikrotitrační destičce či gelové kartě zapříčinit falešně negativní výsledek, případně slabou reakci. Testování slabých podskupin je doporučeno zopakovat zkušební metodou.
- Monoklonální činidla Lorne Anti-A a Anti-B nejsou validována k detekci příslušných antigenů Ax a A3 nebo Bx a B3, a proto reaktivitu monoklonálních činidel Anti-A nebo Anti-B vůči těmto slabým podskupinám A a B nezaručujeme.
- Skladovaná krev může vykazovat slabší reakci než krev čerstvá.
- 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
  - vzorky pupečnickové krve kontaminované Whartonovým rosolem

### SPECIFICKÁ CHARAKTERISTIKA TESTU

- Každá šarže monoklonálního činidla Lorne ABO 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“<sup>3</sup>) a obecných technických specifikací.

- Specifita zdrojových monoklonálních protilátek byla prokázána pomocí panelu antigen-negativních buněk.
- 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-A 03/188 a/nebo
  - referenční standard Anti-B 03/164.
- Činidlo Lorne Anti-B nereaguje s červenými krvinkami se „získanými B antigeny“.
- Monoklonální činidla Lorne ABO nedetekují kryptoantigeny, jako je T, Tn nebo Cad.
- 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

- 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 validovat<sup>5</sup>.

### BIBLIOGRAFIE

- Marion E. Reid a Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; strana 181.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3. vydání. Montgomery Scientific, Miami 1985; kapitola 6.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6. vydání 2002. The Stationary Office.
- AABB Technical Manual, 16. vydání, AABB 2008.
- 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.

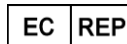
### DOSTUPNÉ VELIKOSTI BALENÍ ČINIDEL

	Objem nádoby	Katalogové číslo	Počet testů na nádobu
Anti-A Monoclonal	10 ml	600010	200
	1000 ml	600000*	20 000
	5000 ml	600000X5*	100 000
Anti-B Monoclonal	10 ml	610010	200
	1000 ml	610000*	20 000
	5000 ml	610000X5*	100 000
Anti-A,B Monoclonal	10 ml	620010	200
	1000 ml	620000*	20 000
	5000 ml	620000X5*	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, 2<sup>nd</sup> Flr.,  
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta