

MONOKLONINIAI REAGENTAI KRAUJO GRUPEI NUSTATYTI

NAUDOJIMO NURODYMAI

„anti-A“, „anti-B“ ir „anti-A,B Monoclonal“ (monokloniniai: testams atlikti mėgintuvėliuose, mikroplokštelėse ant plokštumos ir „Bio-Rad-ID“, „Ortho BioVue“ metodais.

SANTRAUKA

1900 metais Landsteiner atrado, kad kai kurių žmonių serumas agliutino kitų žmonių raudonąsias ląsteles. Dabar žinomi keturi dažni fenotipai: O, A, B ir AB. Nustatyti A ir B pogrupiai.

Tiesioginė grupė			Atvirkštinė grupė				ABO Fenotipas	Baltaodžiai % ¹
A	B	A, B	A ₁	A ₂	B	O		
+	0	+	0	0	+	0	A	43
0	+	+	+	+	0	0	B	9
0	0	0	+	+	+	0	O	44
+	+	+	0	0	0	0	AB	4

NUMATYTOJI PASKIRTIS

ABO reagentai yra reagentai kraujo grupei nustatyti, skirti naudoti kokybiniam testui A ir (arba) B antigenams aptikti ant kraujo donoro ar pacientų, kuriems reikia perpilti kraujo, raudonųjų ląstelių, testus atliekant šioje naudojimo instrukcijoje rekomenduojamais metodais.

PRINCIPAS

Reagentuose yra antikūnų atitinkamiems žmogaus raudonųjų ląstelių A ir (arba) B antigenams, kurie sukels tiesioginę raudonųjų ląstelių, turinčių atitinkamą ABO antigeną, agliutinaciją (sulipimą). Agliutinacijos nebuvimas rodo, kad ant žmogaus raudonųjų ląstelių atitinkamo ABO antigeno nėra (žr. **Ribojimai**).

REAGENTAI

„Lorne“ monokloniniuose IgM ABO reagentuose kraujo grupei nustatyti yra pelės monokloninių antikūnų, praskiestų fosfatinu buferiu su natrio chloridu, EDTA ir jaučio albuminu. Reagentų sudėtyje nėra CMR medžiagų ar endokrininę sistemą ardančių medžiagų, kurios galėtų jautrinti naudotoją ar sukelti jam alerginių reakcijų. Kiekvienas reagentas tiekiamas tinkamai praskiestas naudoti taikant toliau nurodytus rekomenduojamus metodus, jų skiesti ar papildyti nereikia. Gaminio serijos numeris ir tinkamumo naudoti pabaigos data nurodyta **buteliuko etiketėje**.

Gaminys	Ląstelių linija / klonas	Spalva	Naudoti dažai
„Anti-A“	9113D10	Mėlyni	„Patent“ mėlynasis
„Anti-B“	9621A8	Geltoni	Tartrazinas
„Anti-A,B“	152D12 + 9113D10 + ES15	Bespalsvis	Nėra

LAIKYMAS

Gautus reagentus reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje. Ilgiau reagentus laikant netinkamoje temperatūroje gali pagreitėti reagento reaktyvumo mažėjimas. Atlikti šio reagento stabilumo gabenant tyrimai 37 °C ir –25 °C temperatūroje, kaip aprašyta dokumente BS EN ISO 23640:2015.

MĖGINIŲ PAĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

Kraujo mėginius galima surinkti į mėgintuvėlius su EDTA, citrato, CPDA antikoagulantais arba kaip mėginį su krešuliu. Paėmus mėginius, juos iširti reikia kuo greičiau. Jei mėginiai bus tiriami vėliau, juos laikykite 2–8 °C temperatūroje. Mėginiai, kuriuose stebima ryški hemolizė ar mikrobinė tarša, tyrimui netinka. Kraujo mėginių, kuriuose įvyko ląstelių lizė, testo rezultatai gali būti nepatikimi. Pageidautina (bet nebūtina) prieš atliekant testą visus kraujo mėginius plauti PBS (fosfatinio buferio fiziologiniu) arba izotoniniu fiziologiniu tirpalu.

ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Reagentai skirti tik diagnostikai *in vitro*.
2. Jeigu reagento buteliukas įskilęs arba nesandarus, turinį nedelsdami išpilkite.
3. Po tinkamumo naudoti datos reagentų nenaudokite (žr. **buteliuko etiketę**).
4. Jeigu yra precipitatas, reagentų nenaudokite.
5. Tvarkant reagentus reikia vilkėti apsauginius drabužius, pavyzdžiui, mūvėti vienkartinę pirštines ir dėvėti laboratorinį apsiaustą.
6. Siekiant sumažinti biologinę taršą reagentai buvo filtruoti per 0,2 μm kapsulę, tačiau tiekiami nesterilūs. Atidarius buteliuką, turinys iki tinkamumo naudoti pabaigos datos yra tinkamas naudoti, jeigu reagentas akivaizdžiai nedrumstas; drumstumas gali rodyti reagento suirimą ar taršą.
7. Reagentuose yra < 0,1 % natrio azido. Natrio azidas gali būti toksiškas nurius ir gali reaguoti su vandentiekio švino ir vario vamzdžiais bei sudaryti

labai sprogius metalo azidų junginius. Išpylę nuskalaukite dideliu vandens kiekiu.

8. Jokie testai negali užtikrinti, kad iš žmogaus ar gyvūninės kilmės medžiagų pagamintuose produktuose nėra infekcinių ligų sukėlėjų. Naudojant ir šalinant kiekvieną buteliuką bei jo turinį reikia būti atsargiems.

REAGENTŲ ŠALINIMAS IR IŠSILIEJUSIŲ MEDŽIAGŲ TVARKYMAS

Informacijos, kaip šalinti reagentus ir nukenksminti vietą, kurioje išsiliejo medžiagos, pateikiama **Medžiagos saugos duomenų lapuose**, kurie pateikiami paprasčiau.

1. KONTROLĖ IR PATARIMAI

1. Kartu su kiekviena testų partija rekomenduojama atlikti teigiamos ir neigiamos kontrolės testus. Jeigu tiriant kontrolinius mėginius laukiamą testo rezultatų negaunama, testų rezultatai laikomi nevertinamais.
2. Kadangi šiuose reagentuose nėra makromolekulinių agliutinaciją stiprinančių medžiagų, mažai tikėtina, kad klaidingai teigiamą reakciją sukėlė ląstelės, kurių paviršius padengtas IgG.
3. Tiriant ant plokštumos, mikrotitravimo plokštelėse ar ant gelio kortelių kraujo mėginių su silpnais A ar B pogrupių antigenais (pvz., Ax) reakcija gali būti neigiama arba silpna. Silpnus pogrupių antigenus patartina tirti pakartotinai mėgintuvėliuose.
4. Prieš patvirtinant kraujo grupę pagal ABO antigenus, vyresnių nei šešių mėnesių amžiaus asmenims ABO kraujo grupės nustatymo rezultatus reikia patvirtinti tiriant jų serumą ar plazmą su žinomomis A₁ ir B ląstelėmis.
5. Prieš naudodami reagentus, leiskite jiems sušilti iki patalpos temperatūros. Panaudoję reagentą, jį iš karto padėkite saugoti 2–8 °C temperatūroje.
6. Skyriuje **Rekomenduojami metodai** vienas tūris yra apytiksliai 50 μl naudojant buteliuką su lašintuvu.
7. Reagentus naudoti ir rezultatus interpretuoti turi tinkamai išmokyti ir kvalifikuoti darbuotojai, laikydamiesi šalies, kurioje naudojami reagentai, reikalavimų.
8. Naudotojas privalo nustatyti reagentų tinkamumą naudoti taikant kitus metodus.

REIKALINGI REAGENTAI IR MEDŽIAGOS

- Tūrį matuojančios pipetės.
- „Bio-Rad ID“ kortelės (NaCl, fermentų testas ir šaldio agliutininiai).
- „Bio-Rad“ ID centrifuga.
- „Bio-Rad“ „ID-CellStab“ reagentas arba „ID-Diluent 2“ skiediklis.
- „Ortho BioVue System“ kasetės (neutralios).
- „Ortho BioVue System“ centrifuga.
- „Ortho“ 0,8 % raudonųjų ląstelių skiediklis.
- Mikroskopiniai stiklėliai ar baltos plokštelės.
- Aplikaciniai pagaliukai.
- Stikliniai mėgintuvėliai (10 x 75 mm arba 12 x 75 mm).
- Mėgintuvėlių centrifuga.
- Validuotos mikroplokštelės su U formos šulinėliais.
- Mikroplokštelių centrifuga.
- Plokštelių purtyklė.
- PBS tirpalas (pH 6,8–7,2) arba izotoninis fiziologinis tirpalas (pH 6,5–7,5).
- Teigiamos ir neigiamos raudonųjų ląstelių kontrolės reagentai.
- „Anti-A“: A grupės (teigiama kontrolė) ir O grupės (neigiama kontrolė).
- „Anti-B“: B grupės (teigiama kontrolė) ir O grupės (neigiama kontrolė).
- „Anti-A,B“: A grupės ir B grupės (teigiama kontrolė), ir O grupės (neigiama kontrolė).

REKOMENDUOJAMI METODAI

A. Mėgintuvėlių metodas

1. PBS ar izotoniniame fiziologiniame tirpale paruoškite 2–3 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Į paženklinatą mėgintuvėlį įlašinkite vieną „Lorne“ „Anti-ABO“ reagento tūrį ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrį.
3. Kruopščiai sumaišykite ir mėgintuvėlius laikykite 1 minutę kambario temperatūroje.
4. Visus mėgintuvėlius centrifuguokite 10 sekundžių 1 000 rcf ar kita tinkama jėga tinkamą laiką.
5. Švelniai išsklaidykite raudonųjų ląstelių sankaupą ir makroskopiškai įvertinkite agliutinaciją.
6. Visus mėgintuvėlius, kuriuose testo rezultatas yra neigiamas arba abejotinas, reikia 15 min. laikyti patalpos temperatūroje.
7. Po inkubacijos pakartokite 4 ir 5 veiksmus.

B. „Bio-Rad ID“ metodas (NaCl, fermentų testo ir šalčio agliutininų kortelės)

1. „ID-CellStab“ reagente ar „ID-Diluent 2“ skiediklyje paruoškite 0,8 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Nuo reikiamo mikromėgintuvėlių skaičiaus nuimkite aliuminio foliją.
3. Į atitinkamą mikromėgintuvėlį įlašinkite: 50 µl raudonųjų ląstelių suspensijos ir 25 µl „Lorne“ „Anti-ABO“ reagento.
4. ID kortelės centrifuguokite „Bio-Rad“ gelio kortelių centrifugoje.
5. Makroskopiškai įvertinkite agliutinaciją.

C. „Ortho BioVue“ metodas (neutralios kasetės)

1. 0,8 % „Ortho“ raudonųjų ląstelių skiediklyje paruoškite 0,8 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Nuo reikiamo reakcijos kamerų skaičiaus nuimkite aliuminio foliją.
3. Į atitinkamą reakcijos kamerą įlašinkite: 50 µl raudonųjų ląstelių suspensijos ir 40 µl „Lorne“ „Anti-ABO“ reagento.
4. Kasetes centrifuguokite „Ortho BioVue System“ centrifugoje.
5. Makroskopiškai įvertinkite agliutinaciją.

D. Mikroplokštelių metodas naudojant U formos šulinėlius

1. PBS ar izotoniniame fiziologiniame tirpale paruoškite 2–3 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Į atitinkamą šulinėlį įlašinkite: vieną „Lorne“ „Anti-ABO“ reagento tūrį ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrį.
3. Kruopščiai sumaišykite, pageidautina, naudodami mikroplokštelių purtyklę, pasirūpinkite, kad būtų išvengta kryžminės šulinėlių taršos.
4. Mikroplokšteles laikykite 15 minučių kambario temperatūroje (laikas priklauso nuo naudotojo).
5. Mikroplokštelę centrifuguokite 1 minutę 140 rcf ar kita tinkama jėga tinkama laiką.
6. Atsargiai išsklaidykite ląstelių sankaupas kontroliuojamai purtydami mikroplokštelių purtyklėje.
7. Įvertinkite makroskopiškai arba validuotu automatinio vertinimo prietaisu.
8. Visas silpnas reakcijas reikia pakartoti mėgintuvėlių metodu.

E. Plokštumos metodas

1. Serume, plazmoje, PBS ar izotoniniame fiziologiniame tirpale paruoškite 35–45 % raudonųjų ląstelių suspensiją arba naudokite kraują su antikoagulantais (su plazma).
2. Ant paženklinto stiklelio ar plokštelės užlašinkite: vieną „Lorne“ „Anti-ABO“ reagento tūrį ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrį.
3. Švariu aplikaciniu pagaliuku maždaug 20 x 40 mm plote reagentą sumaišykite su ląstelėmis.
4. 30 sekundžių plokštelę pavartykite į priekį ir atgal, plokštelę laikydami patalpos temperatūroje maišykite papildomai dar 1 minutę.
5. Po 1 minutės išsklaidytoje šviesoje makroskopiškai įvertinkite rezultatą; fibrino siūlų nesupainiokite su agliutinacija.
6. Visas silpnas reakcijas reikia pakartoti mėgintuvėlių metodu.

TESTO REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

1. **Teigiamas:** testą atlikus paisant priimtinių procedūros ribų, raudonųjų ląstelių agliutinacija rodo teigiamą testo rezultatą; tai reiškia, kad ant raudonųjų ląstelių yra atitinkamas ABO antigenas.
2. **Neigiamas:** testą atlikus paisant priimtinių procedūros ribų, raudonųjų ląstelių agliutinacijos nebuvimas rodo neigiamą testo rezultatą; tai reiškia, kad ant raudonųjų ląstelių atitinkamo ABO antigeno nėra.
3. **Neatitinkimai:** jeigu su atvirktinio ir tiesioginio grupės nustatymo testų rezultatai nesutampa, reikia atlikti daugiau tyrimų.

REAKCIJŲ STABILUMAS

1. Visus mėgintuvėliuose ir mikroplokštelėse atliktų testų rezultatus vertinkite iš karto po centrifugavimo procedūros.
2. Kad būtų užtikrintas specifiskumas ir išvengta klaidingo neigiamo rezultato vertinimo dėl išdžiūvusio reagento jį laikant teigiamu, testus ant plokštumos galima vertinti po daugiausia 1 minutės.
3. Jeigu testas atliekamas kitoje temperatūroje, nei rekomenduojama, testo rezultatus reikia vertinti atsargiai.

RIBOJIMAI

1. Tik gimus ABO antigenai nėra visiškai išsivystę, todėl tiriant naujagimių mėginius galimos silpnesnės reakcijos.
2. Tiriant ant plokštumos, mikrotitravimo plokštelėse ar ant gelio kortelių kraujo mėginių su silpnais A ar B pogrupių antigenais (pvz., Ax) reakcija gali būti klaidingai neigiama arba silpna, naudojantis Monoclonal Anti-A, B. Silpnus pogrupių antigenus patartina tirti pakartotinai mėgintuvėliuose.
3. „Lorne“ monokloniniai „Anti-A“ ir monokloniniai „Anti-B“ reagentai nebuvo validuoti aptikti atitinkamai Ax ir A3 arba Bx ir B3 antigenus, todėl netvirtiname, kad monokloniniai „Anti-A“ ar „Anti-B“ reagentai yra reaktyvūs su šiais A ir B pogrupių antigenais.
4. Tiriant ilgiau laikytą kraują reakcijos gali būti silpnesnės nei su šviežiu krauju.
5. Klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami rezultatai gali būti gauti, jei:
 - testo medžiagos yra užterštos,
 - netinkamai laikomos, naudojama netinkama ląstelių koncentracija, inkubavimo laikas ar temperatūra;
 - netinkamai ar pernelyg centrifuguojama;
 - nesilaikoma rekomenduojamų metodų;
 - virkštelės kraujo mėginiai užteršti vartono gelio.

SPECIALIOSIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

1. Prieš išleidžiant kiekviena „Lorne“ ABO monokloninių reagentų serija buvo iširta taikant šiose naudojimo instrukcijose išvardytus rekomenduojamus tyrimo metodus. Testai atitiko galiojančios „Jungtinės Karalystės rekomendacijų kraujo perpilimo tarnyboms“ versijos leidime ir Bendrosiose techninėse specifikacijose nurodytus reikalavimus.
2. Monokloninių antikūnų specifiskumas įrodytas naudojant antigenams neigiamų ląstelių rinkinį.
3. Reagentų galima buvo tirta naudojant toliau nurodytus minimalios galios pamatinius standartus, gautus iš Nacionalinio biologinių standartų ir kontrolės instituto (NIBSC):
 - „Anti-A“ etaloninis standartas 03/188 ir (arba)
 - „Anti-B“ etaloninis standartas 03/164
4. „Lorne“ „Anti-B“ nereaguoja su B antigeną įgijusiomis raudonosiomis ląstelėmis.
5. „Lorne“ monokloniniai ABO antigenai neaptinka kriptinių antigenų, pavyzdžiui, T, Tn ar Cad.
6. Reagentų kokybės kontrolė atliekama naudojant raudonąsias ląsteles, kurių fenotipas buvo patikrintas JK kraujo perpilimo centre, prieš naudojant jas nuplovus PBS ar izotoniniu fiziologiniu tirpalu.

ATSAKOMYBĖS RIBOJIMAS

1. Tais atvejais, jei testas atliekamas taikant kitus metodus, nei nurodyta skyriuje **Rekomenduojami metodai**, už reagentų veikimą atsako naudotojas.
2. Prieš naudojant visus nukrypimus nuo **rekomenduojamų metodų** reikia validuoti⁵.

LITERATŪRA

1. Marion E. Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 181.
2. Issitt P. D. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6.
3. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
4. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
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.

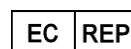
TIEKIAMŲ REAGENTŲ DYDŽIAI

	Buteliuko dydis	Katalogo numeris	Testų, kuriuos galima atlikti su vienu buteliuku, skaičius
„Anti-A“ monokloninis	10 ml	600010	200
	1 000 ml	600000	20 000
	5 000 ml	600000X5*	100 000
„Anti-B“ monokloninis	10 ml	610010	200
	1 000 ml	610000	20 000
	5 000 ml	610000X5*	100 000
„Anti-A,B“ monokloninis	10 ml	620010	200
	1 000 ml	620000	20 000
	5 000 ml	620000X5*	100 000

*Šis dydis skirtas naudoti tik tolesnei gamybai (FFMU), todėl CE ženklu neženklinaamas.



„Lorne Laboratories Limited“
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Jungtinė Karalystė
Tel. +44 (0) 118 921 2264
Faks. +44 (0) 118 986 4518
El. paštas info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Fl.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta