



MONOKLONÁLIS VÉRCSOPORT-MEGHATÁROZÓ REAGENSEK HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

Anti-D Duoclone Monoclonal: Kémcsöves, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, mikrolemezes és tárgylemezes módszerekhez.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az Rh vércsoportrendszert 1940-ben fedezték fel. A D antigén a klinikai szempontból legjelentősebb nem ABO vörösvérsejt-antigén, amely szerepet játszik a hemolitikus transzfúziós reakciók és az újszülöttkori hemolitikus betegség kialakulásában.

Anti-D	Fenotípus	Kaukázusiak % ³	Afroamerikaiak % ³
+	Rh D +ve	83	92
0	Rh D -ve	17	8

FELHASZNÁLÁSI TERÜLET

Az Anti-D reagens olyan vércsoport-meghatározó reagens, amelyek célja az Rh D antigén véradok vagy vértranszfúziót igénylő betegek vörösvérsejtjein való jelenlétének vagy hiányának kvalitatív meghatározása, a jelen használati útmutatóban ismertetett ajánlott módszerekkel vizsgálva.

ALAPELV

A reagens a humán vörösvérsejten lévő D antigén elleni antitesteket tartalmaz, és a D antigént hordozó humán vörösvérsejtet közvetlen agglutinációját (összecsapódását), valamint a D^{VI} kategóriába tartozó humán vörösvérsejtet közvetett agglutinációját okozza a vizsgálat antiglobulin fázisában. Az agglutináció (összecsapódás) hiánya általában a D antigén hiányát jelzi a humán vörösvérsejten (lásd a **Korlátok** című részt).

REAGENS

A Lorne Monoclonal Anti-D Duoclone vércsoport-meghatározó reagens egy alacsony fehérjetartalmú, kevert reagens, amely humán monoklonális IgM és IgG anti-D-t tartalmaz, nátrium-kloridot (0,9 g%), szarvasmarha albumint (2,0 g%) és makromolekuláris potenciátorokat (1,5 g%) tartalmazó foszfátpufferben hígítva. Betegminták tipizálásakor a reagens közvetlenül agglutinálja az Rh D pozitív sejtet, beleértve a variánsok többségét (kivéve a D^{VI}-t) és a gyenge D (D^U) fenotípusok nagy részét az ajánlott módszerek alkalmazása esetén. A reagens nem tartalmaz CMR (rákkeltő, mutagén vagy reprodukciót károsító) anyagokat, endokrin rendszert káros anyagokat, illetve olyan anyagokat, amelyek a felhasználónál szénbilibiliációt vagy allergiás reakciót okozhatnak. A reagenst betegmintákon az alábbiakban felsorolt összes ajánlott módszerrel való használathoz optimális hígításban szállítják, további hígítást vagy kiegészítést nem igényel. A tétel referenciaszámát és lejárati dátumát lásd az **üveg címkéjén**.

IgM/IgG	Sejtvonal/klón
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

AZ RhD ANTIGÉN CSÖKKENT EXPRESSZIÓJA

A D^U együttes kifejezés széles körben használt azoknak a vörösvérsejteknek a leírására, amelyek a normálisnál gyengébben expresszálják a D antigént. A gyenge D kifejezés a vörösvérsejtenként kevesebb teljes D antigénhellyel rendelkező személyeket jelöli. A részleges D kifejezés a hiányzó D antigén-epitópokkal rendelkező személyeket jelöli. A D^{VI} egy részleges D kategória, amelyben hiányzik a legtöbb D epitóp. A Duoclone reagens közvetlen agglutinációval mutatja ki a részleges és gyenge D vörösvérsejtet legfőbbjét, a D^{VI} sejtet azonban nem mutatja ki. A reagens kimutatja a D^{VI} és a részleges D sejtet az IAT fázisban.

TÁROLÁS

A reagensüvegeket a kézhezvételüket követően 2–8 °C-on kell tárolni. A megadott hőmérséklet-tartományon kívül, hosszabb ideig történő tárolás felgyorsíthatja a reagens reakcióképességének elvesztését. A reagensen 37 °C-on és –25 °C-on szállítási stabilitási vizsgálatot végeztek a BS EN ISO 23640:2015 dokumentumban leírtak szerint.

MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

A vérmintákat EDTA, citrát, CPDA antikoagulánsokban vagy alvadt mintaként lehet gyűjteni. A mintákat a mintavételét követően a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni. Ha a vizsgálatot csak később lehet elvégezni, a mintákat tárolja 2–8 °C-on. A látható hemolízist vagy mikrobiális szennyeződést mutató mintákat nem szabad vizsgálatához használni. A lízisre utaló jeleket mutató vérminták megbízhatatlan eredményeket adhatnak. A vizsgálat előtt javasolt (de nem feltétlenül szükséges) az összes vérminta PBS-sel vagy izotóniás sóoldattal való mosása.

ÖVINTÉZKEDÉSEK

1. A reagens kizárólag *in vitro* diagnosztikai felhasználásra szolgál.
2. Ha a reagensüveg megrepedt vagy szivárog, azonnal dobja ki a tartalmát.

3. Ne használja a reagenst a lejárati dátumot követően (lásd az **üveg címkéjét**).
4. Ne használja a reagenst csapadék jelenléte esetén.
5. A reagens kezelésakor védőruházatot, például eldobható kesztyűt és laboratóriumi köpenyt kell viselni.
6. A biológiai terhelés csökkentése érdekében a reagenst 0,2 µm-es kapszulán átszűrtek, de nem sterilén szállítják. Az üveg felnyitása után a tartalomnak a lejárati dátumig működőképesnek kell maradnia, mindaddig, amíg nincs benne látható zavarosság, amely a reagens károsodását vagy szennyeződését jelezheti.
7. A reagens <0,1% nátrium-azidot tartalmaz. A nátrium-azid lenyelve mérgező lehet, illetve az ólom- és rézvezetékekkel reakcióba léphet és robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet. Ártalmatlanításkor nagy mennyiségű vízzel öblítse le.
8. A reagens előállításához használt anyagokat a forrásnál megvizsgálták, és jóváhagyott mikrobiológiai vizsgálatokkal negatívnak találták HIV 1+2 és HCV antitestek, valamint HBsAg szempontjából.
9. Egyetlen ismert vizsgálat sem tudja garantálni, hogy az emberi vagy állati eredetű termékek fertőző ágensektől mentesek. Az üvegek és azok tartalmának használatakor és ártalmatlanításakor óvatosan kell eljárni.

A REAGENS ÁRTALMATLANÍTÁSA ÉS A KIÖMLÖTT ANYAGOK KEZELÉSE

A reagens ártalmatlanításával és a kiömléssel érintett terület szennyeződésmentesítésével kapcsolatos információkat lásd a kérésre rendelkezésre álló **anyagbiztonsági adatlapokban**.

KONTROLLK ÉS TANÁCSOK

1. Javasolt az egyes vizsgálati tételekkel párhuzamosan egy pozitív (ideálisan R_r sejt) és egy negatív kontroll (ideálisan rr sejt) vizsgálata. A vizsgálatokat érvénytelennek kell tekinteni, ha a kontrollok nem a várt eredményeket mutatják.
2. Azon betegek vörösvérsejtjeinek tipizálásakor, akiknél olyan betegséget diagnosztizáltak, amely a vörösvérsejtet antitesttel vagy más fehérjékkel (például újszülöttkori hemolitikus betegség vagy vagy autoimmun hemolitikus anémia) bevonását okozza, fontos a beteg vörösvérsejtjeinek Lorne reagens-negatív kontroll (Monoclonal D Negative Control (katalógusszám: 650010)) használatával történő vizsgálata. A vizsgálatokat érvénytelennek kell tekinteni, ha a Lorne Monoclonal D Negative Control (katalógusszám: 650010) agglutinálja a vörösvérsejtet.
3. A D^{VI} kategória meghatározására szolgáló vizsgálati minták csak **indirekt antiglobulin vizsgálattal, Coombs Bio-Rad-ID, Bio-Rad ID és Coombs Ortho BioVue módszerrel** használhatók.
4. A gyenge és részleges D antigéneket rosszul detektálja a gélykártyás, a mikroiter lemezes és a tárgylemezes módszer. Javasolt a gyenge és részleges variánsok kémcsöves módszerrel történő vizsgálata.
5. Az antiglobulin kémcsöves módszer csak akkor tekinthető érvényesnek, ha az összes negatív teszt pozitívan reagál az IgG-szenzibilizált vörösvérsejtekkel.
6. Használat előtt hagyja a reagenst szobahőmérsékletre felmelegedni. Használat után a reagenst azonnal tegye vissza 2–8 °C-on történő tárolásra.
7. Az **Ajánlott módszerek** című részben egy térfogat körülbelül 50 µl az üveghez mellékelt cseppentő használata esetén.
8. A reagens használatát és az eredmények értelmezését megfelelően képzett és képzett személyzetnek kell végeznie annak az országnak a követelményeivel összhangban, ahol a reagenst használják.
9. A felhasználónak kell meghatároznia a reagens más módszerekkel végzett felhasználásra való alkalmasságát.

SZÜKSÉGES REAGENSEK ÉS ANYAGOK

- Anti-humán globulin, pl. Lorne AHG Elite (katalógusszám: 435010) vagy anti-humán IgG, pl. Lorne Anti-Human IgG (katalógusszám: 402010).
- Volumetrikus pipetták.
- Üveg mikroszkóp-tárgylemek vagy fehér kártyalapok.
- Applikátorpálcák.
- Üveg kémcsövek (10 x 75 mm-es vagy 12 x 75 mm-es).
- 37 °C ± 2 °C-ra kiegyenlített vízfürdő vagy száraz fűtőinkubátor.
- Kémcsőcentrifuga.
- Coombs sejtmosó.
- Validált, „U” lyukakkal rendelkező mikrolemezek.
- Mikrolemez-centrifuga.
- Lemezrázó készülék.
- Automatikus lemezleolvasó.
- Bio-Rad ID-kártyák (LISS/Coombs) és (NaCl, enzimteszt és hideg agglutininek).
- Bio-Rad ID-centrifuga.
- Bio-Rad ID-CellStab vagy ID-Diluent 2 oldat.
- 37 °C ± 2 °C-ra kiegyenlített Bio-Rad ID-inkubátor.

- Ortho BioVue kazetták (AHG/Coombs) és (neutrális).
- Ortho BioVue centrifuga.
- 37 °C ± 2 °C-ra kiegyenlített Ortho BioVue fűtőblokk.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent hígítóoldat..
- IgG-szenzibilizált vörösvérsejtek, pl. Lorne Coombs Control Cells (katalógusszám: 970010).
- PBS-oldat (pH 6,8–7,2) vagy izotóniás sóoldat (pH 6,5–7,5).
- Pozitív (ideálisan R_{1r}) és negatív (rr) kontroll vörösvérsejtek.

AJÁNLOTT MÓDSZEREK (NEM D^{VI} KATEGÓRIA)

A. Kémcsöves módszer

1. Készítsen 2-3%-os vörösvérsejt-szuspenziót PBS-ben vagy izotóniás sóoldatban.
2. Tegyen egy felcímkézett kémcsőbe: 1 térfogat Lorne Duoclone reagenst és 1 térfogat vörösvérsejt-szuspenziót.
3. Alaposan keverje össze, majd centrifugálja az összes csövet 20 másodpercig 1000 rcf-en vagy annak megfelelő, eltérő idő és erő alkalmazásával.
4. Óvatosan szuszpendálja újra a vörösvérsejt-üledéket, és makroszkóposan olvassa le az agglutinációt.
5. A negatív vagy megkérdőjelezhető eredményt mutató csöveket (ami D^u vagy gyenge D minták esetén megtörténhet) 15 percig szobahőmérsékleten kell inkubálni.
6. Az inkubálást követően ismételje meg a 3. és a 4. lépést.

B. Bio-Rad-ID módszer (NaCl, enzimteszt és hideg agglutininek kártyák)

1. Készítsen 0,8%-os vörösvérsejt-szuspenziót ID-CellStab vagy ID-Diluent 2 oldatban.
2. Távolítsa el az alumíniumfóliát a szükséges számú mikroszűrő.
3. Tegyen a megfelelő reakciókamrába: 50 µl vizsgálati vörösvérsejt-szuspenziót és 25 µl Lorne Duoclone reagenst.
4. Centrifugálja az ID-kártyá(ka)t gélkártya-centrifugában.
5. Olvassa le makroszkóposan az agglutinációt.

C. Ortho BioVue módszer (neutrális kazetták)

1. Készítsen 0,8%-os vörösvérsejt-szuspenziót Ortho 0.8% Red Cell Diluent hígítóoldatban.
2. Távolítsa el az alumíniumfóliát a szükséges számú reakciókamráról.
3. Tegyen a megfelelő reakciókamrába: 50 µl vizsgálati vörösvérsejt-szuspenziót és 40 µl Lorne Duoclone reagenst.
4. Centrifugálja a kazettá(ka)t Ortho BioVue centrifugában.
5. Olvassa le makroszkóposan az agglutinációt.

D. Mikrolemezes módszer („U” lyukakkal)

1. Készítsen 2-3%-os vörösvérsejt-szuspenziót PBS-ben vagy izotóniás sóoldatban.
2. Tegyen a megfelelő lyukba: 1 térfogat Lorne Duoclone reagenst és 1 térfogat vörösvérsejt-szuspenziót.
3. Alaposan keverje össze, lehetőleg mikrolemezrázó készülékkel, ügyelve a lyukak közötti szennyeződés elkerülésére.
4. Inkubálja szobahőmérsékleten 15 percig (az idő a felhasználótól függ).
5. Centrifugálja a mikrolemezt 1 percig 140 rcf-en vagy annak megfelelő, eltérő idő és erő alkalmazásával.
6. Szuszpendálja újra a sejtüledéket gondosan ellenőrzött keverést alkalmazva egy mikrolemezrázó készüléken.
7. Olvassa le makroszkóposan vagy validált automatikus leolvasóval.
8. A gyenge reakciókat kémcsöves módszerrel meg kell ismételni.

E. Tárgylemezes módszer

1. Készítsen 35-45%-os vörösvérsejt-szuspenziót szérumban, plazmában, PBS-ben vagy izotóniás sóoldatban, vagy használjon antikoagulált teljes vért (saját plazmájában).
2. Tegyen egy felcímkézett üveg tárgylemezre vagy kártyalapra: 1 térfogat Lorne Duoclone reagenst és 1 térfogat vizsgálati vörösvérsejt-szuspenziót.
3. Tiszta applikátorpálcával keverje össze a reagenst és a sejteket egy körülbelül 20 x 40 mm-es területen.
4. Lassan döntse előre és hátra a tárgylemezt 30 másodpercig, időnként további keveréssel az 1 perces időtartam alatt, miközben a tárgylemezt szobahőmérsékleten tartja.
5. 1 perc elteltével makroszkóposan olvassa le az eredményt szórt fényben, és a fibrinszálatok ne tévessze össze az agglutinációval.
6. A gyenge reakciókat kémcsöves módszerrel meg kell ismételni.

AJÁNLOTT MÓDSZEREK (A D^{VI} KATEGÓRIA KIMUTATÁSÁRA)

A. Indirekt antiglobulin módszer (IAT)

1. Készítsen 2-3%-os vörösvérsejt-szuspenziót PBS-ben vagy izotóniás sóoldatban.
2. Tegyen egy felcímkézett kémcsőbe: 1 térfogat Lorne Duoclone reagenst és 1 térfogat vizsgálati vörösvérsejt-szuspenziót.
3. Alaposan keverje össze, és inkubálja 37 °C-on 15 percig.
4. Mossa át a vörösvérsejteket legalább egyszer PBS-sel vagy izotóniás sóoldattal, ügyelve arra, hogy a mosások között dekantálja a sóoldatot, és minden mosás után szuszpendálja újra a sejtüledéket. Az utolsó mosás után teljesen dekantálja a sóoldatot.
5. Adjon 2 csepp AHG-t vagy anti-IgG-t minden száraz sejtüledékhez.
6. Alaposan keverje össze, majd centrifugálja az összes csövet 20 másodpercig 1000 rcf-en vagy annak megfelelő, eltérő idő és erő alkalmazásával.
7. Szuszpendálja újra a sejtüledékeket, majd olvassa le makroszkóposan.

8. Ellenőrizze az összes negatív reakció érvényességét az IgG-szenzibilizált vörösvérsejtekkel.

B. Bio-Rad-ID módszer (LISS/Coombs kártyák)

1. Készítsen 0,8%-os vörösvérsejt-szuspenziót ID-CellStab vagy ID-Diluent 2 oldatban.
2. Távolítsa el az alumíniumfóliát a szükséges számú mikroszűrő.
3. Tegyen a megfelelő reakciókamrába: 50 µl vörösvérsejt-szuspenziót és 25 µl Lorne Duoclone reagenst.
4. Inkubálja az ID-kártyá(ka)t 15 percig 37 °C-on.
5. Centrifugálja az ID-kártyá(ka)t gélkártya-centrifugában.
6. Olvassa le makroszkóposan az agglutinációt.

C. Ortho BioVue módszer (AHG/Coombs kazetták)

1. Készítsen 0,8%-os vörösvérsejt-szuspenziót Ortho 0.8% Red Cell Diluent hígítóoldatban.
2. Távolítsa el az alumíniumfóliát a szükséges számú reakciókamráról.
3. Tegyen a megfelelő reakciókamrába: 50 µl vizsgálati vörösvérsejt-szuspenziót és 40 µl Lorne Duoclone reagenst.
4. Inkubálja a kazettá(ka)t 15 percig 37 °C-on.
5. Centrifugálja a kazettá(ka)t Ortho BioVue centrifugában.
6. Olvassa le makroszkóposan az agglutinációt.

A VIZSGÁLAT EREDMÉNYEINEK ÉRTELMEZÉSE

1. **Pozitív:** A vörösvérsejtek agglutinációja pozitív vizsgálati eredményt jelent, és a vizsgálati eljárás elfogadott korlátain belül a D antigén jelenlétét jelzi a vörösvérsejteken.
2. **Negatív:** A vörösvérsejtek agglutinációjának hiánya negatív eredményt jelent, és a vizsgálati eljárás elfogadott korlátain belül a D antigén hiányát jelzi a vörösvérsejteken.
3. **Kontroll:** A reagens-negatív kontroll alkalmazásával agglutinált sejtek vizsgálati eredményeit ki kell zárni, mivel az agglutinációt valószínűleg a reagensben lévő makromolekuláris potenciátorok szenzibilizált sejtekre gyakorolt hatása okozta.

A REAKCIÓK STABILITÁSA

1. Az összes kémcsöves és mikrolemezes vizsgálatot közvetlenül a centrifugálás után olvassa le.
2. A mosási lépéseket megszakítás nélkül végezze el, majd centrifugálja és olvassa le a vizsgálatokat azonnal az anti-humán globulin hozzáadása után, mivel a késlekedés az antigén-antitest komplexek disszociációját eredményezheti, ami hamis negatív vagy gyenge pozitív reakciókhoz vezethet.
3. A tárgylemezes vizsgálatokat legfeljebb 1 perc elteltével kell értelmezni a specifikitás biztosítása és annak elkerülése érdekében, hogy a negatív eredményt a reagens száradása miatt tévesen pozitívnak értelmezzék.
4. Az ajánlottól eltérő hőmérsékleten végzett vizsgálatok eredményeinek értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

KORLÁTOK

1. A Lorne Anti-D nem alkalmas enzimkezelt sejtekkel vagy LISS-ben szuszpendált sejtekkel történő alkalmazásra.
2. A vörösvérsejt-szuspenziók előállításához használjon a dokumentum „Ajánlott módszerek” című részében leírtaktól eltérő oldatok alkalmazását használat előtt validálni kell. Egyes oldatok hamis pozitív vagy hamis negatív reakciót válthatnak ki.
3. A tárolt vér gyengébb reakciókat mutathat, mint a friss vér.
4. Előfordulhat, hogy az IgG-szenzibilizált sejtek vizsgálatok hamis pozitív agglutináció figyelhető meg.
5. Hamis pozitív vagy hamis negatív eredmények a következők miatt is előfordulhatnak:
 - A vizsgálati anyagok szennyeződése
 - Nem megfelelő tárolás, sejtkoncentráció, inkubációs idő vagy hőmérséklet
 - Nem megfelelő vagy túlzott centrifugálás
 - Az ajánlott módszerektől való eltérés

SPECIÁLIS TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

1. A forgalomba hozatal előtt minden Lorne Anti-D Duoclone monoklonális reagenstételt megvizsgáltak a jelen használati útmutatóban felsorolt ajánlott vizsgálati módszerekkel. A vizsgálatok megfeleltek a „Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom” (Vértranszfúziós szolgáltatásokra vonatkozó irányelvek az Egyesült Királyságban) és a „Common Technical Specifications” (Általános módszertani előírások) jelenlegi verziójában/kiadásában meghatározott vizsgálati követelményeknek.
2. A forrás monoklonális antitestek specifikitását antigén-negatív sejtek paneljével mutatták ki.
3. A reagens hatékonyságát a Intézet National Institute of Biological Standards and Controls-tól (Nemzeti Biológiai Szabványügyi és Ellenőrzési, NIBSC) kapott alábbi minimális hatékonysági referenciaszabvány alapján vizsgálták meg:
 - Anti-D referencia 99/836.
4. A reagens minőség-ellenőrzését olyan vörösvérsejtekkel végezték, amelyek fenotípusait egy egyesült királyságbeli vértranszfúziós központban igazolták, és amelyeket felhasználás előtt PBS-sel vagy izotóniás sóoldattal mostak.

NYILATKOZAT

1. A felhasználó felelős a reagens teljesítményéért, ha azt az **Ajánlott módszerek** című részben említettektől eltérő módszerekkel használják.
2. Az **Ajánlott módszerek** című résztől való bármilyen eltérést használat előtt validálni kell⁶.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 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, 6th Edition 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.

RENDELKEZÉSRE ÁLLÓ REAGENS MÉRTEK

Üvegméret	Katalógusszám	Vizsgálatok üvegenként
10 ml	740010	200
1000 ml	740000*	20 000
5000 ml	740000x5*	100 000

*Ez a méret csak további gyártási célú felhasználásra (For Further Manufacturing Use, FFMU) szolgál, és ezért nincs CE-jelöléssel ellátva.



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Egyesült Királyság
Telefon: +44 (0) 118 921 2264
Fax: +44 (0) 118 986 4518
E-mail: info@lornelabs.com

EC	REP	Advena Ltd. Tower Business Centre, 2 nd Fl., Tower Street, Swatar, BKR 4013, Málta
----	-----	--