

MONOKLONÁLIS VÉRCSOPORT-MEGHATÁROZÓ REAGENSEK HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

Anti-D Clone 1 és Clone 2 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 vradók 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 vörösvérsejtek közvetlen agglutinációját (összecsapódását) okozza. Az agglutináció (összecsapódás) hiánya általában a D antigén hiányát jelzi a humán vörösvérsejten (lásd a **Korlátok** című részt).

REAGENSEK

A Lorne Monoclonal IgM Anti-D Clone 1 és Clone 2 vércsoport-meghatározó reagens alacsony fehérjetartalmú reagens, amelyek humán monoklonális IgM antitestet tartalmaznak, nátrium-kloriddal (0,9 g%), szarvasmarha albuminnal (2,0 g%) és makromolekuláris potenciátorokkal (1,5 g%) hígítva. Betegminták tipizálásakor az egyes reagens közvetlenül agglutinálják az Rh D pozitív sejteket, 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 tartalmaznak CMR (rákkeltő, mutagén vagy reprodukciót károsító) anyagokat, endokrin rendszert káros anyagokat, illetve olyan anyagokat, amelyek a felhasználónál szénbilizációt vagy allergiás reakciót okozhatnak. Az egyes reagenset betegmintákon az alábbiakban felsorolt összes ajánlott módszerrel való használathoz optimális hígításban szállítják, további hígítást vagy kiegészítést nem igényelnek. A tétel referenciaszámát és lejárati dátumát lásd az **üveg címkéjén**.

Termék	Sejtvonal/klón
Anti-D Clone 1	RUM-1
Anti-D Clone 2	MS-201

AZ RhD ANTIGÉN CSÖKKENT EXPRESSZIÓJA

A D^u együttes kifejezés széles körben használt azoknak a vörösvérsejteknek a leírására, amelyek a normálnál 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} sejtek egy részleges D kategória, amelyben hiányzik a legtöbb D epitóp. Az 1. és a 2. klón reagens egyaránt közvetlen agglutinációval mutatja ki a részleges és gyenge D vörösvérsejtek legtöbbjét, a D^{VI}-sejteket azonban nem mutatja ki.

TÁROLÁS

A reagensüvegeket a kézhezvételt követően 2–8 °C-on kell tárolni. A megadott hőmérséklet-tartományon kívüli, 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 mintavétel 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 lízise 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

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

- Ne használja a reagenset a lejárati dátumot követően (lásd az **üveg címkéjét**).
- Ne használja a reagenset csapadék jelenléte esetén.
- A reagens kezelésekor védőruházatot, például eldobható kesztyűt és laboratóriumi köpenyt kell viselni.
- A biológiai terhelés csökkentése érdekében a reagenset 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.
- A reagens < 0,1% nátrium-azidot tartalmaznak. A nátrium-azid lenyelve mérgező lehet, illetve az ólom- és rézvezetékekkel reakcióba léphet és robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet. Ártalmatlanításakor nagy mennyiségű vízzel öblítse le.
- A termékek előállításához használt anyagokat a forrásnál megvizsgálták, és jóváhagyott mikrobiológiai vizsgálatokkal negatívnak találták HIV 1+2 és HCV antitestek, valamint HBsAg szempontjából.
- 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

- Javasolt az egyes vizsgálati tételekkel párhuzamosan egy pozitív (ideálisan R₁r sejtek) és egy negatív kontroll (ideálisan rr sejtek) vizsgálata. A vizsgálatokat érvénytelennek kell tekinteni, ha a kontrollok nem a várt eredményeket mutatják.
- Azon betegek vörösvérsejtjeinek tipizálásakor, akiknél olyan betegséget diagnosztizáltak, amely a vörösvérsejtek antitesttel vagy más fehérjékkel (például újszülöttkori hemolitikus betegség vagy autoimmun hemolitikus anémia) bevonását okozza, fontos a beteg vörösvérsejtjeinek Lorne reagens-negatív kontroll (Monoclonal D Negative Control (katalógusszám: 650010)) használatával történő vizsgálata.
- A gyenge és részleges D antigénvariánsokat rosszul detektálja a gélykártyás, a mikroiter lemezes és a tárgylemezes módszer. Javasolt a gyenge és részleges D variánsok kémcsöves módszerrel történő vizsgálata.
- Használat előtt hagyja a reagenst szobahőmérsékletre felmelegedni. Használat után a reagenst azonnal tegye vissza 2–8 °C-on történő tárolásra.
- Az **Ajánlott módszerek** című részben egy térfogat körülbelül 50 µl az üveghez mellékelt cseppentő használata esetén.
- A reagens használatát és az eredmények értelmezését megfelelően képzett és képesített személyzetnek kell végeznie annak az országnak a követelményeivel összhangban, ahol a reagenset használják.
- A felhasználónak kell meghatározni a reagens más módszerekkel végzett felhasználásra való alkalmasságát.

SZÜKSÉGES REAGENSEK ÉS ANYAGOK

- Volumetrikus pipetták.
- Bio-Rad ID-kártyák (NaCl, enzimteszt és hideg agglutininek).
- Bio-Rad ID-centrifuga.
- Bio-Rad ID-CellStab vagy ID-Diluent 2 oldat.
- Ortho BioVue kazetták (neutrális).
- Ortho BioVue centrifuga.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent hígítóoldat.
- Üveg mikroszkóp-tárgylemezek vagy fehér kártyalapok.
- Applikátorpálcák.
- Üveg kémcsövek (10 x 75 mm-es vagy 12 x 75 mm-es).
- Kémcsőcentrifuga.
- Validált, „U” lyukakkal rendelkező mikrolemezek.
- Mikrolemez-centrifuga.
- Lemezrázó készülék.
- PBS-oldat (pH 6,8–7,2) vagy izotóniás sóoldat (pH 6,5–7,5).
- Pozitív (ideálisan R₁r) és negatív (rr) kontroll vörösvérsejtek.

AJÁNLOTT MÓDSZEREK

A. Kémcsöves módszer

- Készítsen 2-3%-os vörösvérsejt-szuspenziót PBS-ben vagy izotóniás sóoldatban.
- Tegyen egy felcímkézett kémcsöbe: 1 térfogat Lorne Anti-D reagenst és 1 térfogat vörösvérsejt-szuspenziót.

- Alaposan keverje össze, majd centrifugálja az összes csövet 20 másodpercig 1000 rcf-en vagy annak megfelelő, eltérő idő és erő alkalmazásával.
- Óvatosan szuszpendálja újra a vörösvérsejt-üledéket, és makroszkóposan olvassa le az agglutinációt.
- A negatív vagy megkérdőjelezhető eredményt mutató csöveket (ahogy gyenge D minták esetén megtörténhet) 15 percig szobahőmérsékleten kell inkubálni.
- Az inkubálást követően ismételje meg a 3. és a 4. lépést.

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

- Készítsen 0,8%-os vörösvérsejt-szuszpenziót ID-CellStab vagy ID-Diluent 2 oldatban.
- Távolítsa el az alumíniumfóliát a szükséges számú mikrocsoőről.
- Tegyen a megfelelő mikrocsoőbe: 50 µl vörösvérsejt-szuszpenziót és 25 µl Lorne Anti-D reagenst.
- Centrifugálja az ID-kártyá(ka)t Bio-Rad gélkártya-centrifugában.
- Olvassa le makroszkóposan az agglutinációt.

C. Ortho BioVue módszer (neutrális kazetták)

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

D. Mikrolemezes módszer („U” lyukakkal)

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

E. Tárgylemezes módszer

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

A VIZSGÁLAT EREDMÉNYEINEK ÉRTELMEZÉSE

- Pozitív:** A vörösvérsejtek agglutinációja pozitív vizsgálati eredményt jelent, és a vizsgálati eljárás elfogadott korlátain belül a D antigén jelenlétét jelzi a vörösvérsejteken.
- Negatív:** A vörösvérsejtek agglutinációjának hiánya negatív eredményt jelent, és a vizsgálati eljárás elfogadott korlátain belül a D antigén hiányát jelzi a vörösvérsejteken.
- 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

- Az összes kémcsöves és mikrolemezes vizsgálatot közvetlenül a centrifugálás után olvassa le.
- A tárgylemezes vizsgálatokat egy percen belül kell értelmezni a specifitás biztosítása és annak elkerülése érdekében, hogy a negatív eredményt a reagens száradása miatt tévesen pozitívnak értelmezzék.
- Az ajánlottól eltérő hőmérsékleten végzett vizsgálatok eredményeinek értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

KORLÁTOK

- A Lorne Anti-D nem alkalmas enzimkezelt sejtekkel, LISS-ben szuszpendált sejtekkel vagy indirekt antiglobulin (IAT) módszerekkel történő alkalmazásra.
- A tárolt vér gyengébb reakciókat mutathat, mint a friss vér.
- Az IgG-szenzibilizált sejtek (pl. AIHA, HDN) vizsgálatokor hamis pozitív agglutináció figyelhető meg a reagensben lévő makromolekuláris potenciátoroknak köszönhetően.

- 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

- A forgalomba hozatal előtt minden Lorne Anti-D monoklonális reagenstét megvizsgálták a jelen használati útmutatóban felsorolt ajánlott vizsgálati módszerekkel. A vizsgálatok megfelelték 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.
- A betegek D vércsoport-meghatározására szolgáló Anti-D vércsoport-meghatározó reagens nem léphetnek reakcióba a D^{VI}-sejtekkel a felhasználásra ajánlott módszer(ek) alkalmazása esetén.
- A forrás monoklonális antitestek specifitását antigén-negatív sejtek paneljével mutatták ki.
- A reagens hatékonyságát a National Institute of Biological Standards and Controls-tól (Nemzeti Biológiai Szabványügyi és Ellenőrzési Intézet, NIBSC) kapott alábbi minimális hatékonysági referenciaszabvány alapján vizsgálták meg:
 - Anti-D referencia 99/836.
- A reagensek minőség-ellenőrzését olyan vörösvérsejtekkel végezték, amelyek fenotípusait egy egyesült királyságbeli vértranszfúziós központban igazolták, és amelyeket felhasználás előtt PBS-sel vagy izotóniás sóoldattal mostak.

NYILATKOZAT

- A felhasználó felelős a reagens teljesítményéért, ha azokat az **Ajánlott módszerek** című részben említettekől eltérő módszerekkel használják.
- Az **Ajánlott módszerek** című résztől való bármilyen eltérést használat előtt validálni kell⁶.

IRODALOMJEGYZÉK

- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
- Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 192.
- 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
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 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.

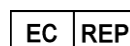
RENDELKEZÉSRE ÁLLÓ REAGENSMÉRETEK

	Üvegméret	Katalógusszám	Vizsgálatok üvegenként
Anti-D Clone 1 Monoclonal	10 ml	730010	200
	1000 ml	730000*	20 000
	5000 ml	730000x5*	100 000
Anti-D Clone 2 Monoclonal	10 ml	710010	200
	1000 ml	710000*	20 000
	5000 ml	710000x5*	100 000

*Ez a méret csak további gyártási célú felhasználásra (For Further Manufacturing Use, FFMU) szolgál, 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



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Málta