

MONOKLONINIAI REAGENTAI KRAUJO GRUPEI NUSTATYTI NAUDOJIMO INSTRUKCIJOS

Monokloniniai reagentai „Anti-D“ „Clone 1“ IR „Clone 2“: testams atlikti „Bio-Rad-ID“, „Ortho BioVue“ metodais, mėgintuvėliuose mikroplokštelėse ir ant plokštumos.

SANTRAUKA

Rh kraujo grupių sistema buvo atrasta 1940 metais. D antigenas yra klinikinio požiūriu svarbiausias ne ABO grupės raudonųjų kraujo ląstelių antigenas, lemiantis hemolizines potransfuzines reakcijas ir naujagimių hemolizinę ligą.

„Anti-D“	Fenotipas	Baltaodžiai % ³	Afroamerikiečiai % ³
+	Rh D +	83	92
0	Rh D +	17	8

NUMATYTOJI PASKIRTIS

„Anti-D“ reagentai yra reagentai kraujo grupei nustatyti, skirti naudoti kokybiniam testui siekiant nustatyti RhD antigeno buvimą ar nebuvimą ant kraujo donoro ar pacientų, kuriems reikia perpilti kraujo, raudonųjų ląstelių, testą atliekant šioje naudojimo instrukcijoje rekomenduojamais metodais.

PRINCIPAS

Reagentuose yra antikūnų žmogaus raudonųjų ląstelių D antigenui, kurie sukels tiesioginę raudonųjų ląstelių, turinčių D antigeną, agliutinaciją (sulipimą). Agliutinacijos nebuvimas rodo, kad ant žmogaus raudonųjų ląstelių D antigeno nėra (žr. **Ribojimai**).

REAGENTAI

„Lorne“ monokloniniai IgM „Anti-D“, „Clone 1“ ir „Clone 2“ reagentai kraujo grupei nustatyti yra reagentai su nedideliu baltymų kiekiu, kuriame yra monokloninių IgM antikūnų, praskiestų natrio chloridu (0,9 g %), jautio albuminiais (2,0 g %) ir makromolekuliniemis agliutinaciją stiprinančiomis medžiagomis (1,5 g%). Tipuojant paciento mėginius rekomenduojamais metodais kiekvienas reagentas tiesiogiai agliutinuos RhD teigiamas ląsteles, įskaitant daugumą variantų (bet ne D^{VI}) ir didelę dalį silpnų D (D^{VI}) fenotipų. 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 su pacientų mėginiais 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
„Anti-D“ „Clone 1“	RUM-1
„Anti-D“ „Clone 2“	MS-201

SILPNESNĖ RhD ANTIGENO RAIŠKA

Ląstelėms, kuriose antigeno D raiška yra silpnesnė nei normali, apibūdinti plačiai naudojamas bendras terminas D^{VI}. Terminas „silpnas D“ apibūdina asmenis, kurių raudonojoje ląstelėje viso D antigeno kiekis yra mažesnis. Terminas „dalinis D“ apibūdina asmenis su trūkstamais D antigeno epitopais. D^{VI} ląstelės yra nepilno D ląstelių kategorija, kuriai trūksta daugumos D epitopų. „Clone 1“ ir „Clone 2“ reagentai tiesioginės agliutinacijos būdu aptiks daugumą dalinio ir silpno D raudonųjų ląstelių pavyzdžių, tačiau neaptiks D^{VI} ląstelių.

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 reikia kuo greičiau iširti. 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 precipitato, 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 tinkamo 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 nurijus ir gali reaguoti su vandentiekio švino ir vario vamzdžiais bei sudaryti labai sprogius metalo azidų junginius. Išpylę nuskalaukite dideliu vandens kiekiu.
8. Produktams gaminti naudojamos pirminės medžiagos buvo tiriamos taikant patvirtintus mikrobiologinius testus, jose antikūnų ŽIV 1+2, HCV ir HBsAg neaptikta.
9. 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**, o jie pateikiami paprasčiau.

KONTROLĖ IR PATARIMAI

1. Kartu su kiekviena testų partija rekomenduojama atlikti teigiamos (idealiu atveju R_{1r} ląstelių) ir neigiamos (idealiu atveju rr ląstelių) kontrolės testus. Jeigu tiriant kontrolinius mėginius laukiamų testo rezultatų negaunama, testų rezultatai laikomi nevertinamais.
2. Tipuojant paciento, kuriam diagnozuota liga, kai raudonosios ląstelės pasidengia antikūnais ar kitais baltymais (pavyzdžiui, HDN, AIHA), paciento raudonąsias ląsteles svarbu tirti naudojant „Lorne“ reagento neigiamą kontrolę („Monoclonal D Negative Control“ (katalogo numeris 650010)).
3. Silpni ir daliniai D antigenai ant gelio plokštelių, mikrotitravimo plokštelėse ir ant plokštumos gali būti aptinkami prasčiau. Silpnus ir dalinius D antigeno variantus rekomenduojama tirti mėgintuvėliuose.
4. Prieš naudodami reagentus, leiskite jiems sušilti iki patalpos temperatūros. Panaudoję reagentą, jį iš karto padėkite saugoti 2–8 °C temperatūroje.
5. Skyriuje **Rekomenduojami metodai** vienas tūris yra apytiksliai 50 μl naudojant buteliuką su lašintuvu.
6. Reagentus naudoti ir rezultatus interpretuoti turi tinkamai išmokyti ir kvalifikuoti darbuotojai, laikydamiesi šalies, kurioje naudojami reagentai, reikalavimų.
7. Naudotojas privalo nustatyti reagentų tinkamumą naudoti taikant kitus metodus.

REIKALINGI REAGENTAI IR MEDŽIAGOS

- Tūrij matuojančios pipetės.
- „Bio-Rad ID“ kortelės (NaCl, fermentų testas ir šalčio 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 stikleliai 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 (idealiu atveju R_{1r}) ir neigiamos (rr) raudonųjų ląstelių kontrolės reagentai.

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-D“ reagento tūrij ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrij.
3. Visus mėgintuvėlius kruopščiai centrifuguokite 20 sekundžių 1 000 rcf ar kita tinkama jėga tinkamą laiką.
4. Švelniai išsklaidykite raudonųjų ląstelių sankaupą ir makroskopiškai įvertinkite agliutinaciją.
5. Visus mėgintuvėlius, kuriuose testo rezultatas yra neigiamas (taip gali atsitikti tiriant silpno D mėginius) ar abejotinas, reikia 15 min. laikyti patalpos temperatūroje.

6. Po inkubacijos pakartokite 3 ir 4 veiksmus.

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

1. „ID-CellStab“ reagentu 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-D“ reagento.
4. ID kortelę (-es) centrifuguokite „Bio-Rad“ gelio kortelių centrifugoje.
5. Makroskopiškai įvertinkite agliutinaciją.

C. „Ortho BioVue“ metodas (neutralios kortelės)

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-D“ reagento.
4. Kortelę (-es) 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: 1 „Lorne“ „Anti-D“ 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 tinkamą laiką.
6. Atsargiai išskaidykite 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 stiklo ar plokštelės užlašinkite: vieną „Lorne“ „Anti-D“ reagento tūrį ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrį.
3. Švairiu 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 išskaidytoje šviesoje makroskopiškai įvertinkite rezultatą; fibrino siūlų nespainiokite 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, o tai reiškia, kad ant raudonųjų ląstelių yra D antigenas.
2. **Neigiamas:** testą atlikus paisant priimtinių procedūros ribų, raudonųjų ląstelių agliutinacijos nebuvimas rodo neigiamą testo rezultatą, o tai reiškia, kad ant raudonųjų ląstelių D antigeno nėra.
3. **Kontrolė:** Ląstelių, agliutinuojusių su neigiama kontrole, testo rezultatus reikia atmesti, nes agliutinaciją tikriausiai sukėlė jautrintų ląstelių reagentu esančios makromolekulinės agliutinaciją skatinančios medžiagos.

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 1 minutės.
3. Jeigu testas atliekamas kitoje temperatūroje, nei rekomenduojama, testo rezultatus reikia vertinti atsargiai.

RIBOJIMAI

1. „Lorne“ „Anti-D“ reagento negalima naudoti su fermentais apdorotų ląstelių suspensija silpname izotoniniame fiziologiniame tirpale (LISS) ar netiesioginio antiglobulinų testo (IAT) metodui.
2. Tiriant ilgiau laikytą kraują reakcijos gali būti silpnesnės nei su šviežiu krauju.
3. Dėl reagentu esančių makromolekulinių agliutinaciją stiprinančių medžiagų tiriant IgG jautrintas ląsteles, pvz., autoimuninės hemolizinės ligos (AIHA), naujagimių hemolizinės ligos (HDN) atveju, galima klaidingai teigiama agliutinacija.
4. 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.

SPECIALIOSIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

1. Prieš išleidžiant kiekviena „Lorne“ „Anti-D“ 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. „Anti-D“ grupės nustatymo reagentai, skirti pacientams nustatyti D grupės antigenams, naudojant rekomenduojamus metodus nereaguos su DVI ląstelėmis.
3. Monokloninių antikūnų specifiskumas įrodytas naudojant antigenams neigiamų ląstelių rinkinį.
4. Reagentų galia buvo tirta naudojant toliau nurodytus minimalios galios pamatinius standartus, gautus iš nacionalinio biologinių standartų ir kontrolės instituto (NIBSC):
 - „Anti-D“ etalonas 99/836
5. 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 validuoti⁶.

LITERATŪRA

1. Issitt P. D. 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 M. L., 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.

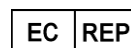
TIEKIAMŲ REAGENTŲ DYDŽIAI

	Buteliuko dydis	Katalogo numeris	Testų, kuriuos galima atlikti su vienu buteliuku, skaičius
„Anti-D Clone 1 Monoclonal“	10 ml	730010	200
	1 000 ml	730000*	20 000
	5000 ml	730000 x 5*	100 000
„Anti-D Clone 2 Monoclonal“	10 ml	710010	200
	1 000 ml	710000*	20 000
	5 000 ml	710000 x 5*	100 000

*Šis dydis skirtas naudoti tik tolesnei gamybai (FFMU), todėl CE ženklą neženklina.



„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 Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta