

**MONOKLONINIAI REAGENTAI KRAUJO GRUPEI NUSTATYTI  
NAUDOJIMO INSTRUKCIJOS**

**„Anti-K“ monokloninis: testams atlikti mėgintuvėliuose, mikroplokštelėse ant plokštumos ir „Bio-Rad-ID“, „Ortho BioVue“ metodais.**

**SANTRAUKA**

K antigenas buvo atrastas 1946 metais. Antigenas yra visiškai išsivystęs jau gimus ir yra labai imunogeniškas. Nustatyta, kad „anti-K“ antikūnai sukelia hemolizines potransfuzines reakcijas ir naujagimių hemolizinę ligą.

„Anti-K“	„Anti-K“	Fenotipas	Baltaodžiai <sup>1</sup>	Afroamerikiečiai <sup>1</sup>
+	0	K+k-	0,2 %	Retai
+	+	K+k-	8,8 %	2 %
0	+	K+k-	91 %	98 %
0	0	K <sub>o</sub>	Labai retai	

**NUMATYTOJI PASKIRTIS**

Reagentas kraujo grupei nustatyti, skirtas naudoti kokybiniam testui Kell antigenui (KEL1) aptikti ant kraujo donoro ar pacientų, kuriems reikia perpilti kraujo, raudonųjų ląstelių, testus atliekant šioje naudojimo instrukcijoje rekomenduojamais metodais.

**PRINCIPAS**

Reagente yra antikūnų žmogaus raudonųjų ląstelių K antigenui, kuriesukels tiesioginę raudonųjų ląstelių, turinčių Kell antigeną, agliutinaciją (sulipimą). Agliutinacijos (sulipimo) nebuvimas reiškia, kad Kell antigeno nėra (žr. **Ribojimai**).

**REAGENTAS**

„Lorne“ monokloninis „Anti-K“ reagentas kraujo grupei nustatyti yra reagentas su nedideliu baltymų kiekiu, kuriame yra monokloninių MS-56 klonų IgM antikūnų, praskiestų fosfatinio buferiu su natrio chloridu, jaučio albuminiais ir makromolekulinėmis agliutinaciją stiprinančiomis medžiagomis (4,0 g%). Reagento sudėtyje nėra CMR (kancerogeninių, mutageninių ar toksiškų reprodukcijai) 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**.

**LAIKYMAS**

Gautus reagentus reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje. Ilgiau reagentus laikant netinkamoje temperatūroje gali pagreipti reagentų 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 testas atliekamas vėliau, mėginius 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 reagento nenaudokite (žr. **buteliuko etiketę**).
4. Jeigu yra precipitato, reagento nenaudokite.
5. Tvarkant reagentus reikia vilkėti apsauginius drabužius, pavyzdžiui, mūvėti vienkartinės pirštines ir dėvėti laboratorinį apsiaustą.
6. Siekiant sumažinti biologinę taršą reagentas buvo filtruotas per 0,2 μm kapsulę, tačiau tiekiamas nesterilus. Atidarius buteliuką, turinys iki tinkamumo naudoti pabaigos datos yra tinkamas naudoti, jeigu reagentas akivaizdžiai nedrumstas; drumstumas gali rodyti reagento suirimą ar taršą.
7. Reagente yra < 0,1 % natrio azido. Natrio azidas gali būti toksiškas nurijus ir gali reaguoti su vandentiekio švino ir vario vamzdžiais bei sudaryti labai sprogus metalo azidų junginius. Išpylus nuskalaukite dideliu vandens kiekiu.
8. Reagentui gaminti naudojamos pirminės medžiagos buvo tiriamos taikant patvirtintus mikrobiologinius testus, jose antikūnų ŽIV 1+2 bei HCV 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 paprašius.

**KONTROLĖ IR PATARIMAI**

1. Kartu su kiekviena testų partija rekomenduojama atlikti teigiamos (idealiu atveju heterozigotinės) ir neigiamos kontrolės testus. Jeigu tiriant kontrolinius mėginius laukiamų testo rezultatų negaunama, testų rezultatai laikomi nevertinamais.
2. Tipuojant paciento raudonąsias ląsteles svarbu naudoti neigiamos kontrolės reagentą („Mono Rh Control“, „Lorne“ katalogo numeris 640010), nes reagente esančios makromolekulinės agliutinaciją stiprinančios medžiagos reaguodamos su IgG padengtomis ląstelėmis gali sukelti klaidingai teigiamą reakciją.
3. Silpni K antigenai ant gelio plokštelių, mikrotitravimo plokštelėse ir ant plokštumos gali būti aptinkami sunkiau. Silpniems K antigenams testą rekomenduojama atlikti 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.

**REIKALINGOS, BET NETIEKIAMOS MEDŽIAGOS IR REAGENTAI**

**Mėgintuvėlių metodas**

- Stikliniai mėgintuvėliai (10 x 75 mm arba 12 x 75 mm).
- Centrifuga, tinkama centrifuguoti 1 000 g jėga 20 sekundžių.
- PBS tirpalas (pH 6,8–7,2) arba izotoninis fiziologinis tirpalas (pH 6,5–7,5).
- Teigiamos (idealiu atveju Kk) ir neigiamos (kk) raudonųjų ląstelių kontrolės reagentai.

**„Bio-Rad-ID“ mikrotitravimo metodas**

- „Bio-Rad ID“ kortelės (NaCl, fermentų testas ir šalčio agliutininai).
- „Bio-Rad“ ID centrifuga.
- „Bio-Rad“ „ID-CellStab“ reagentas arba „ID-Diluent 2“ skiediklis.

**„Ortho BioVue“ tipavimo metodas**

- „Ortho BioVue System“ kasetės (neutralios).
- „Ortho BioVue System“ centrifuga.
- „Ortho“ 0,8 % raudonųjų ląstelių skiediklis.

**Mikrotitravimo plokštelės metodas**

- Validuotos U formos šulinėlių mikrotitravimo plokštelės.
- Mikrotitravimo plokštelių centrifuga.
- Mikrotitravimo plokštelių purtyklė.

**Plokštumos metodas**

- Mikroskopiniai stikleliai ar baltos plokštelės.
- Aplikaciniai pagaliukai.
- Laikmatis arba chronometras

**Visi metodai**

- Tūrį matuojančios pipetės.

**REKOMENDUOJAMI METODAI**

**A. Mėgintuvėlių metodas**

1. PBS ar izotoniniame fiziologiniame tirpale paruoškite 2–3 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Į paženklinatą mėgintuvėlį įlašinkite vieną „Lorne“ reagento tūrį ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrį.
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 arba 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 agliutininių kortelės)

1. „ID-CellStab“ reagente ar „ID-Diluent 2“ skiediklyje paruoškite 0,8 % raudonųjų ląstelių suspensiją.
2. Nuo reikiamo skaičiaus mikromėgintuvėlių su NaCl, fermentų testais ir šalčio agliutininių ID kortelių nuimkite aliuminio foliją.
3. Į atitinkamą mikromėgintuvėlį įlašinkite: 50 µl raudonųjų ląstelių suspensijos ir 25 µl „Lorne“ reagento.
4. ID kortelės centrifuguokite „Bio-Rad ID“ 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 neutralių kasečių reakcijos kamerų skaičiaus nuimkite aliuminio foliją.
3. Į atitinkamą reakcijos kamerą įlašinkite: 50 µl raudonųjų ląstelių suspensijos ir 40 µl „Lorne“ 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“ 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 išsklaidykite ląstelių sankaupas kontroliuojamai purtydami mikroplokštelių purtyklėje.
7. Įvertinkite makroskopiškai arba validuotą automatinį 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. Jei to padaryti neįmanoma, galima naudoti kraują su antikoagulantais mėginį.
2. Ant paženklinto stiklelio ar plokštelės užlašinkite: vieną „Lorne“ reagento tūrį ir 1 raudonųjų ląstelių suspensijos tūrį.
3. Švari aplikaciniu pagaliuku maždaug 20 x 40 mm plote reagentą sumaišykite su ląstelėmis.
4. Plokštelę laikydami patalpos temperatūroje, lėtai ją 1 minutę vartykite į priekį ir atgal.
5. Po 1 minutės išsklaidytoje 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, tai reiškia, kad ant raudonųjų ląstelių yra K antigenas.
2. **Neigiamas:** testą atlikus paisant priimtinių procedūros ribų, raudonųjų ląstelių agliutinacijos nebuvimas rodo neigiamą testo rezultatą, o tai reiškia, kad ant raudonųjų ląstelių K antigeno nėra.
3. **Kontrolė:** Ląstelių, agliutinavusių su neigiama kontrole, testo rezultatus reikia atmesti, nes agliutinaciją tikriausiai sukėlė jautrintų ląstelių reagentė 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 specifiškumas 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. Tiriant ilgiau laikytą kraują reakcijos gali būti silpnesnės nei su šviežiu krauju.
2. 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 šio reagento serija buvo iširta taikant šiose naudojimo instrukcijose išvardytus rekomenduojamus tyrimo metodus. Testai atitiko galiojančios „Jungtinės Karalystės rekomendacijų kraujo

perpylimo tarnyboms“ versijos leidime ir Bendrosiose techninėse specifikacijose nurodytus reikalavimus.

2. Monokloninių antikūnų specifiškumas įrodytas naudojant antigenams neigiamų ląstelių rinkinį.
3. Reagento kokybės kontrolė atliekama naudojant raudonąsias ląsteles, kurių fenotipas buvo patikrintas JK kraujo perpylimo centre, prieš naudojant jas nuplovus PBS ar izotoniniu fiziologiniu tirpalu.

## ATSAKOMYBĖS RIBOJIMAS

1. Tais atvejais, kai testas atliekamas taikant kitus metodus, nei nurodyta skyriuje **Rekomenduojami metodai**, už reagentų veikimą atsako naudotojas.
2. Prieš naudojant visus nukrypimus nuo **Rekomenduojamų metodų** reikia validuoti<sup>9</sup>.

## LITERATŪRA

1. Marion E. Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 186.
2. Issitt P. D. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 12.
3. AABB Technical Manual, 16<sup>th</sup> edition, AABB 2008.
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6<sup>th</sup> Edition 2002. The Stationary Office.
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.

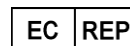
## TIKIAMIŲ REAGENTŲ DYDŽIAI

Buteliuko dydis	Katalogo numeris	Testų, kuriuos galima atlikti su vienu buteliuku, skaičius
10 ml	760010	200
1 000 ml	760000*	20 000

\*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, 2<sup>nd</sup> Flr.,  
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta