



## MONOKLONAL KAN GRUPLANDIRMA REAKTİFLERİ KULLANIM TALİMATLARI

### Anti-D Duoklon Monoklonal: Tüp, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, Mikroplaka ve Lam Teknikleri için.

#### ÖZET

Rh kan grubu sistemi 1940 yılında keşfedilmiştir. D antijeni, klinik olarak en önemli ABO olmayan kırmızı kan hücresi antijenidir ve Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonlarına ve Yenidoğanın Hemolitik Hastalığına neden olduğu gösterilmiştir.

Anti-D	Fenotip	Beyazlar % <sup>3</sup>	Afro-Amerikalılar % <sup>3</sup>
+	Rh D +ve	83	92
0	Rh D -ve	17	8

#### KULLANIM AMACI

Anti-D reaktifleri, bu Kullanım Talimatlarında (IFU) önerilen tekniklere uygun olarak test edildiğinde, kan donörlerinin veya kan transfüzyonuna ihtiyaç duyan hastaların kırmızı hücrelerinde Rh D antijeninin varlığını veya yokluğunu kalitatif olarak belirlemek için kullanılması amaçlanan bir kan gruplandırma reaktifidir.

#### PRENSİP

Reaktif, insan kırmızı hücrelerinde D antijenine karşı antikorlar içerir ve D antijenini taşıyan insan kırmızı hücrelerinin doğrudan aglütinasyonuna (topaklanmasına) ve testin antiglobulin fazında Kategori D<sup>VI</sup> olan insan kırmızı hücrelerinin dolaylı aglütinasyonuna neden olur. Aglütinasyonun (topaklanmanın) olmaması genellikle insan kırmızı hücrelerinde D antijeninin bulunmadığını gösterir (bkz. Sınırlamalar).

#### REAKTİF

Lorne Monoklonal Anti-D Duoklon kan gruplandırma reaktif, sodyum klorür (%0,9 g), siğir albümini (%2,0 g) ve makromoleküler güçlendirici maddeler (%1,5 g) içeren bir fosfat tamponunda seyreltilmiş, insan monoklonal IgM ve IgG anti-D içeren düşük proteinli, harmanlanmış bir reaktiftir. Hasta numunelerini gruplandırırken, önerilen teknikleri kullanımı sırasında varyantların çoğunluğu (D<sup>VI</sup> dışında) ve yüksek oranda zayıf D (D<sup>VI</sup>) fenotipleri dâhil olmak üzere bu reaktif Rh D pozitif hücreleri doğrudan aglütine edecektir. Reaktifler, CMR maddeleri, endokrin bozucu maddeler veya kullanıcı tarafından hassasiyete veya alerjik reaksiyona neden olabilecek maddeler içermez veya bunlardan oluşmaz. Reaktif, daha fazla seyreltme veya eklemeye ihtiyaç duymadan aşağıda belirtilen tüm önerilen tekniklerle hasta numunelerini kullanım için optimum seyreltme oranında sağlar. Lot referans numarası ve son kullanma tarihi için bkz. Şişe Etiketleri.

IgM / IgG	Hücre Dizisi/ Klonu
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

#### RhD ANTİJENİNİN ZAYIFLAMIŞ İFADESİ

Kolektif D<sup>VI</sup> terimi, normalden daha zayıf bir D antijeni ekspresyonuna sahip olan kırmızı hücreleri tanımlamak için yaygın olarak kullanılır. Zayıf D terimi, kırmızı hücre başına azaltılmış sayıda tam D antijen bölgesi olan bireyleri belirtir. Kısmi D terimi, eksik D antijen epitoplara olan bireyleri belirtir. DVI, çoğu D epitopunun dahil olmadığı kısmi bir D kategorisidir. Duoklon reaktif, doğrudan aglütinasyon yoluyla çoğu kısmi ve zayıf D kırmızı hücre örneğini saptar, ancak DVI hücrelerini saptayamaz. Bu reaktif, IAT fazında DVI ve kısmi D hücrelerini tespit edecektir.

#### SAKLAMA

Reaktif şişeleri alındıktan sonra 2 - 8°C'de saklanmalıdır. Şişeleri bu aralığın dışındaki sıcaklıklarda uzun süreli saklamak, reaktif reaktivitesinin hızla kaybolmasına neden olabilir. Bu reaktif, BS EN ISO 23640:2015 belgesinde açıklandığı gibi 37°C ve -25°C'de taşıma kararlılığı çalışmalarından geçmiştir.

#### NUMUNE TOPLAMA VE HAZIRLAMA

Kan numuneleri EDTA, sitrat, CPDA antikoagülanlarına veya pıhtılaşmış bir numune olarak toplanabilir. Numuneler, toplanmanın ardından mümkün olan en kısa sürede test edilmelidir. Testte bir gecikme olursa numuneleri 2-8°C'de saklayın. Tümünde hemoliz veya mikrobiyal kontaminasyon gösteren numuneler test için kullanılmamalıdır. Lizis olduğuna dair kanıt gösteren kan numuneleri güvenilir olmayan sonuçlar verebilir. Test edilmeden önce tüm kan örneklerinin PBS veya İzotonik salin ile yıkanması tercih edilir (ancak zorunlu değildir).

#### ÖNLEMLER

- Reaktif, yalnızca *in vitro* teşhisinde kullanım için tasarlanmıştır.
- Bir reaktif şişesi çatlaklı veya sızdırıyorsa içeriğini hemen atın.
- Son kullanma tarihi geçen reaktif kullanmayın (bkz. Şişe Etiketleri).
- Bir çökelti varsa reaktif kullanmayın.
- Reaktifler elleçlenirken tek kullanımlık eldivenler ve laboratuvar önlüğü gibi koruyucu giysiler giyilmelidir.
- Reaktif, biyolojik yükü azaltmak için 0,2 µm'lik bir kapsülden filtrelenmiştir, ancak steril olarak sağlanmamıştır. Bir şişe açıldıktan sonra reaktif

bozulmasını veya kontaminasyonunu işaret edebilecek belirgin bir bulanıklık olmadığı sürece içindekiler son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

- Reaktif < %0,1 sodyum azid içerir. Sodyum azid yutulması halinde toksik olabilir ve kurşun ve bakır tesisat ile reaksiyona girerek patlayıcı metal azidler oluşturabilir. Bol su ile yıkayarak bertaraf edin.
- Reaktif üretmek için kullanılan malzemeler kaynağında test edildi ve onaylı mikrobiyolojik testler kullanılarak HIV 1+2 ve HCV antikorları ve HBsAg için negatif bulundu.
- Bilinen hiçbir test, insan veya hayvan kaynaklı ürünlerin bulaşıcı maddeler içermediğini garanti edemez. Her şişenin ve içeriğinin kullanımı ve atılması sırasında özen gösterilmelidir.

#### REAKTİFİN BERTARAFI VE DÖKÜLME DURUMUNDA YAPILACAKLAR

Reaktifin bertaraf edilmesi ve dökülen bir bölgenin dekontaminasyonu hakkında bilgi için istek üzerine temin edilebilecek **Malzeme Güvenlik Veri Sayfalarına** bakın.

#### KONTROLLER VE ÖNERİ

- Her bir test partisine paralel olarak bir pozitif kontrol (ideal olarak R<sub>1r</sub> hücreleri), bir negatif kontrol (ideal olarak rr hücreleri) test edilmesi önerilir. Kontroller beklenen sonuçları göstermiyorsa testler geçersiz kabul edilmelidir.
- Kırmızı hücrelerin antikor veya diğer proteinlerle (HDN, AIHA gibi) kaplanmasına neden olan bir hastalığı olduğu teşhis edilen bir hastadan alınan kırmızı hücreleri gruplandırırken, hastanın kırmızı hücrelerinin Lorne reaktif negatif kontrolü (Monoklonal) kullanılarak test edilmesi önemlidir D Negatif Kontrol (katalog # 650010). Kırmızı hücreler Lorne Monoklonal D Negatif Kontrol (katalog # 650010) kullanılarak aglütine edilirse testler geçersiz kabul edilmelidir.
- Test numuneleri yalnızca **Dolaylı Antiglobulin Testi, Coombs Bio-RadBio-Rad-ID ve Coombs Ortho BioVue Teknikleri** ile kategori D<sup>VI</sup> tespiti yapar.
- Zayıf ve varyant D antijenleri, jel kart, mikrotitre plakası ve lam teknikleri ile zayıf bir şekilde saptanır. Zayıf ve kısmi varyantların tüp test tekniği kullanılarak test edilmesi önerilir.
- Antiglobulin tüp tekniği, yalnızca tüm negatif testler IgG ile duyarlılaştırılmış kırmızı hücrelerle pozitif reaksiyona girerse geçerli kabul edilebilir.
- Kullanmadan önce reaktifin oda sıcaklığına ısınmasına izin verin. Reaktif kullanılır kullanılmaz reaktifi tekrar 2-8°C'de saklayın.
- Önerilen Tekniklerde**, sağlanan şişe damlalığı kullanıldığında bir hacim yaklaşık 50µl'dir.
- Reaktifin kullanımı ve sonuçların yorumlanması, reaktiflerin kullanıldığı ülkelerin gereksinimlerine göre uygun bir şekilde eğitilmiş ve kalifiye personel tarafından yapılmalıdır.
- Diğer tekniklerde kullanım için reaktifin uygunluğunu kullanıcı belirlemelidir.

#### GEREKLİ REAKTİFLER VE MALZEMELER

- Anti-human globulin, örn. Lorne AHG Elite (Kat No. 435010) veya Anti-Human IgG örn. Lorne Anti-Human IgG'si (Kat No. 402010).
- Völümetrik pipetler.
- Cam mikroskop lamları veya beyaz kart levhaları.
- Aplikatör çubukları.
- Cam test tüpleri (10 x 75 mm veya 12 x 75 mm).
- 37°C ± 2°C'ye dengelenmiş su banyosu veya kuru ısı inkübatörü.
- Test tüpü santrifüjü.
- Coombs hücre yıkayıcı.
- Doğrulanmış "U" çukurcuklu mikroplakalar.
- Mikroplaka santrifüjü.
- Plaka çalkalayıcı.
- Otomatik plaka okuyucu.
- Bio-Rad ID Kartları (LISS/Coombs) ve (NaCl, enzim testi ve soğuk aglütininer).
- Bio-Rad ID-Santrifüj.
- Bio-Rad ID-CellStab veya ID-Diluent 2.
- 37°C±2°C'ye dengelenmiş Bio-Rad ID-Kuluçka Makinesi.
- Ortho BioVue Sistem Kasetleri (AHG/Coombs) ve (Nötr).
- Ortho BioVue Sistem Santrifüjü.
- 37°C±2°C'ye dengelenmiş Ortho BioVue Sistemi Isı Bloğu.
- Ortho %0,8 Kırmızı Hücre Seyreltici.
- IgG duyarlılaştırılmış kırmızı hücreler, örn. Lorne Coombs Kontrol Hücreleri (Kat no. 970010).
- PBS çözümü (pH 6,8-7,2) veya İzotonik salin çözümü (pH 6,5-7,5).
- Pozitif (ideal olarak R<sub>1r</sub>) ve negatif (rr) kontrol kırmızı hücreleri.

## ÖNERİLEN TEKNİKLER (KATEGORİ D<sup>VI</sup> OLMAYAN)

### A. Tüp Tekniği

1. PBS veya İzotonik salin içinde %2-3'lük bir kırmızı hücre süspansiyonu hazırlayın.
2. Etiketli bir test tüpüne aşağıdakileri koyun: 1 hacim Lorne Duoklon reaktif ve 1 hacim kırmızı hücre süspansiyonu.
3. İyi karıştırın ve ardından tüm tüpleri 20 saniye 1000 rcf'de veya uygun bir alternatif süre ve kuvvette santrifüjleyin.
4. Kırmızı hücre düğmesini yavaşça yeniden süspansiyon edin ve aglütinasyon için makroskopik olarak okuyun
5. Negatif veya şüpheli sonuç gösteren tüpler (D<sup>VI</sup> ve zayıf D numunelerinde olabileceği gibi), oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmelidir.
6. İnkübasyonun ardından 3. ve 4. adımları tekrarlayın.

### B. Bio-Rad-ID Tekniği (NaCl, enzim testi ve soğuk aglütinin kartları)

1. ID-CellStab veya ID-Diluent 2'de %0,8'lik bir kırmızı hücre süspansiyonu hazırlayın.
2. Gerekli kadar alüminyum folyoyu mikrotüpten çıkarın.
3. Uygun mikrotüpe aşağıdakileri koyun: 50µl test kırmızı hücre süspansiyonu ve 25µl Lorne Duoklon reaktif.
4. ID Kartını(Kartlarını) bir jel kart santrifüjünde santrifüjleyin.
5. Aglütinasyon için makroskopik olarak okuyun.

### C. Ortho BioVue Tekniği (Nötr kartlar)

1. %0,8 Ortho Kırmızı Hücre Seyreltici içinde %0,8'lik bir kırmızı hücre süspansiyonu hazırlayın
2. Gerekli kadar alüminyum folyoyu reaksiyon odacığından çıkarın.
3. Uygun reaksiyon odacığına aşağıdakileri koyun: 50µl test kırmızı hücre süspansiyonu ve 40µl Lorne Duoklon reaktif.
4. Kaseti(leri) bir Ortho BioVue Sistem Santrifüjünde santrifüjleyin.
5. Aglütinasyon için makroskopik olarak okuyun.

### D. Mikroplaka Tekniği, "U" çukurcukları kullanılarak

1. PBS veya İzotonik salin içinde %2-3'lük bir kırmızı hücre süspansiyonu hazırlayın.
2. Uygun çukurcuğa aşağıdakileri koyun: 1 hacim Lorne Duoklon reaktif ve 1 hacim kırmızı hücre süspansiyonu.
3. Çapraz çukurcuk kontaminasyonundan kaçınmaya özen göstererek tercihen bir mikroplaka çalkalayıcı kullanarak iyice karıştırın.
4. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edin (süre kullanıcıya bağlıdır).
5. Mikroplakayı 140 rcf'de 1 dakika boyunca veya uygun bir alternatif süre ve kuvvette santrifüjleyin.
6. Bir mikroplaka çalkalayıcı kullanarak ve ajitasyona dikkat ederek hücre düğmelerini yeniden süspansiyon edin.
7. Makroskopik olarak veya doğrulanmış bir otomatik okuyucu ile okuyun.
8. Herhangi bir zayıf reaksiyon tüp tekniği ile tekrarlanmalıdır.

### E. Lam Tekniği

1. Serum, plazma, PBS veya İzotonik salin içinde %35-45'lik bir kırmızı hücre süspansiyonu hazırlayın veya pıhtılaşması önlenmiş tam kan (kendi plazmasında) kullanın.
2. Etiketli bir cam slayta veya kart levhasına aşağıdakileri koyun: 1 hacim Lorne Duoklon reaktif ve 1 hacim test kırmızı hücre süspansiyonu.
3. Temiz bir aplikatör çubuğu kullanarak reaktif ve hücreleri yaklaşık 20 x 40 mm'lik bir alan üzerinde karıştırın.
4. Lami 30 saniye boyunca yavaşça ileri geri eğin ve 1 dakikalık süre boyunca ara sıra daha fazla karıştırarak lami oda sıcaklığında tutun.
5. Dağınık ışıkta 1 dakika sonra makroskopik olarak okuyun ve fibrin şeritlerini aglütinasyon ile karıştırmayın.
6. Herhangi bir zayıf reaksiyon tüp tekniği ile tekrarlanmalıdır.

## ÖNERİLEN TEKNİKLER (KATEGORİ D<sup>VI</sup> SAPTAMAK İÇİN)

### A. Dolaylı Antiglobulin Tekniği (IAT)

1. PBS veya İzotonik salin içinde %2-3'lük bir kırmızı hücre süspansiyonu hazırlayın.
2. Etiketli bir test tüpüne aşağıdakileri koyun: 1 hacim Lorne Duoklon ve 1 hacim test kırmızı hücre süspansiyonu.
3. İyi karıştırın ve 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
4. Kırmızı hücreleri en az bir kere PBS veya İzotonik salinle yıkayın, salini yıkamalar arasında boşaltmaya özen gösterin ve her yıkamadan sonra her hücre düğmesini yeniden süspansiyon edin. Son yıkamadan sonra salini tamamen boşaltın.
5. Her kuru hücre düğmesine 2 damla AHG veya anti-IgG ekleyin.
6. İyi karıştırın ve ardından tüm tüpleri 20 saniye 1000 rcf'de uygun bir alternatif süre ve kuvvette santrifüjleyin.
7. Her hücre düğmesini yeniden süspansiyon edin ve makroskopik olarak okuyun.
8. IgG duyarılaştırılmış kırmızı hücreler ile tüm negatif reaksiyonların geçerli olduğunu onaylayın.

### B. Bio-Rad-ID Tekniği (LISS/Coombs kartları)

1. ID-CellStab veya ID-Diluent 2'de %0,8'lik bir kırmızı hücre süspansiyonu hazırlayın.
2. Gerekli kadar alüminyum folyoyu mikrotüpten çıkarın.
3. Uygun mikrotüpe aşağıdakileri koyun: 50µl kırmızı hücre süspansiyonu ve 25µl Lorne Duoklon.
4. ID Kartını(Kartlarını) 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
5. ID Kartını(Kartlarını) bir jel kart santrifüjünde santrifüjleyin.
6. Aglütinasyon için makroskopik olarak okuyun.

### C. Ortho BioVue Tekniği (AHG/Coombs kartları)

1. %0,8 Ortho Kırmızı Hücre Seyreltici içinde %0,8'lik bir kırmızı hücre süspansiyonu hazırlayın.
2. Gerekli kadar alüminyum folyoyu reaksiyon odacığından çıkarın.
3. Uygun reaksiyon odacığına aşağıdakileri koyun: 50µl test kırmızı hücre süspansiyonu ve 40µl Lorne Duoklon.
4. Kaseti(leri) 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
5. Kaseti(leri) bir Ortho BioVue Sistem Santrifüjünde santrifüjleyin.
6. Aglütinasyon için makroskopik olarak okuyun.

### TEST SONUÇLARININ YORULMASI

1. **Pozitif:** Kırmızı hücrelerin aglütinasyonu, pozitif test sonucu anlamına gelir ve test prosedürünün kabul edilen sınırlamaları dâhilinde, kırmızı hücre üzerinde D antijeninin varlığını gösterir.
2. **Negatif:** Kırmızı hücrelerde aglütinasyon olmaması, negatif test sonucu anlamına gelir ve test prosedürünün kabul edilen sınırlamaları dâhilinde, kırmızı hücre üzerinde D antijeninin olmadığını gösterir.
3. Reaktif negatif kontrol kullanılarak aglütine edilen hücrelerin test sonuçları hariç tutulacaktır, çünkü aglütinasyonun nedeni büyük olasılıkla reaktifteki makromoleküller güçlendiricilerin hassaslaştırılmış hücreler üzerindeki etkisi olacaktır.

### REAKSİYONLARIN KARARLILIĞI

1. Tüm tüp ve mikroplaka testlerini santrifüjlemeden hemen sonra okuyun.
2. Yıkama adımlarını kesintiye uğratmadan tamamlayın ve santrifüjleyin. Testleri anti-insan globulin eklendikten hemen sonra okuyun, çünkü gecikme antijen-antikor komplekslerinin ayrışmasına neden olarak yanlış negatif veya zayıf pozitif reaksiyonlara yol açabilir.
3. Spesifliği sağlamak ve reaktifin kuruması nedeniyle negatif bir sonucun yanlışlıkla pozitif olarak yorumlanması olasılığını önlemek için lam testleri maksimum bir dakika sonra yorumlanmalıdır.
4. Önerilen sıcaklıklar dışındaki sıcaklıklarda yapılan testlerin sonuçlarının yorumlanmasında dikkatli olunmalıdır.

### SINIRLAMALAR

1. Lorne Anti-D, enzimle işlem görmüş hücreler veya LISS'te süspansiyon edilmiş hücreler ile kullanım için uygun değildir.
2. Kırmızı hücre süspansiyonları yapmak için belgedeki "Önerilen Teknikler" bölümlerinde açıklananlar dışında solüsyonların kullanılması kullanımdan önce doğrulanmalıdır. Bazı solüsyonlar yanlış pozitif veya yanlış negatif reaksiyonlara yol açabilir.
3. Saklanmış kan, taze kandan daha zayıf reaksiyonlar verebilir
4. IgG duyarılaştırılmış hücreler test edilirken yanlış pozitif aglütinasyon görülebilir.
5. Yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar şu nedenlerle de ortaya çıkabilir:
  - Test malzemelerinin kontaminasyonu
  - Yanlış saklama, hücre konsantrasyonu, inkübasyon süresi veya sıcaklığı
  - Yanlış veya aşırı santrifüjleme
  - Önerilen tekniklerden sapma

### SPEŞİFİK PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

1. Satışa sunulmadan önce Lorne Anti-D Duoklon monoklonal reaktifin her lotu, bu Kullanım Talimatlarında (IFU) listelenen önerilen test yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Testler, "Birleşik Krallık'ta Kan Transfüzyon Hizmetleri Yönergeleri"nin ve "Ortak Teknik Özellikler"nin güncel versiyonunda/sayısında belirtilen test gerekliliklerine uygundur.
2. Kaynak monoklonal antikorların özgüllüğü, bir antijen-negatif hücre paneli kullanılarak gösterilir.
3. Reaktifin gücü, Ulusal Biyolojik Standartlar ve Kontroller Enstitüsü'nden (NIBSC) alınan aşağıdaki minimum etki referans standartlarına göre test edilmiştir:
  - Anti-D referans 99/836.
4. Reaktiflerin Kalite Kontrolü, bir Birleşik Krallık kan transfüzyon merkezi tarafından doğrulanan ve kullanımdan önce PBS veya İzotonik salin ile yıkanmış olan fenotiplere sahip kırmızı hücreler kullanılarak gerçekleştirildi.

### SORUMLULUK REDDİ

1. Reaktifin **Önerilen Tekniklerde** belirtilenler dışındaki herhangi bir yöntem ile kullanıldığında performansından kullanıcı sorumludur.
2. **Önerilen Tekniklerden** herhangi bir sapma, kullanımdan önce doğrulanmalıdır.

### KAYNAKÇA

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AAB Technical Manual, 16<sup>th</sup> edition, AAB 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, 6<sup>th</sup> 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.

## MEVCUT REAKTİF BOYUTLARI

Şiše Boyutu	Katalog Numarası	Şiše başına test sayısı
10 ml	740010	200
1000 ml	740000*	20.000
5000 ml	740000x5*	100.000

\*Bu boyut yalnızca İleri İmalat Kullanımı İçindir (FFMU) ve bu nedenle CE işareti taşımaz.



**Lorne Laboratories Limited**  
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate  
Danehill  
Lower Earley  
Berkshire, RG6 4UT  
Birleşik Krallık  
Tel: +44 (0) 118 921 2264  
Faks: +44 (0) 118 986 4518  
E-posta: info@lornelabs.com

EC	REP	Advena Ltd. Tower Business Centre, 2 <sup>nd</sup> Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta
----	-----	---