



ODCZYNNIKI DO BADAŃ GRUPOWYCH KRWI LUDZKIEJ INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA

Odczynniki poliklonalne anty-Kp^a i anty-Kp^b: do oznaczania pośrednimi metodami antyglobulinowymi

PODSUMOWANIE

Antygeny Kp^a i Kp^b opisano po raz pierwszy kolejno w 1957 i 1958 r. Antygeny układu Kell są w pełni rozwinięte w chwili narodzin. Zarówno przeciwciała anty-Kp^a, jak i anty-Kp^b uczestniczą w poprzetoczeniowych reakcjach hemolitycznych i chorobie hemolitycznej noworodka.

Anty-Kp ^a	Anty-Kp ^b	Fenotyp	Rasa biała ¹	Afroamerykanie ¹
+	0	Kp(a+b-)	Rzadko	0%
+	+	Kp(a+b+)	2,3%	Rzadko
0	+	Kp(a-b+)	97,7%	100%
0	0	K _o	Bardzo rzadko	Bardzo rzadko

PRZEZNACZENIE

Niniejsze odczynniki to odczynniki do grupowania krwi przeznaczone do jakościowego określania obecności lub braku antygeny Kp^a (KEL3) lub antygeny Kp^b (KEL4) na czerwonych krwinkach dawców krwi lub pacjentów wymagających transfuzji krwi, jeżeli badania są wykonywane zgodnie z zalecanymi metodami opisanymi w niniejszej Instrukcji użytkowania.

ZASADA DZIAŁANIA

Odczynniki zawierają przeciwciała przeciwko antygenowi Kp^a lub Kp^b na ludzkich czerwonych krwinkach i powodują pośrednią aglutynację (zlepianie) ludzkich czerwonych krwinek, które zawierają odpowiedni antygen Kell, w fazie antyglobulinowej badania. Brak aglutynacji (brak zlepiania) oznacza zwykle brak odpowiedniego antygeny Kell (patrz **Ograniczenia**).

ODCZYNNIKI

Odczynniki do grupowych badań krwi ludzkiej anty-Kell firmy Lorne przygotowuje się z ludzkiej surowicy rozcieńczonej w roztworze chlorku sodu zawierającym wzmacniacze makrocząsteczkowe (1,9 g%) i albuminę bydlęcą (4,4 g%). Odczynniki nie zawierają ani nie składają się z substancji CMR, substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego ani substancji, które mogą powodować uczulenie lub reakcję alergiczną u użytkownika. Każdy odczynnik jest dostarczany w optymalnym stężeniu dla wszystkich zalecanych metod wymienionych poniżej, bez konieczności dalszego rozcieńczenia lub dodawania. Numer referencyjny partii i data ważności znajdują się na **etykiecie fiolki**.

PRZECZYSZCZANIE

Po otrzymaniu fiolki z odczynnikami należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Długotrwałe przechowywanie w temperaturach poza tym zakresem może spowodować przyspieszony spadek reaktywności odczynnika. Odczynnik został poddany badaniom stabilności podczas transportu w temperaturze 37°C i -25°C, zgodnie z wytycznymi BS EN ISO 23640:2015.

POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Próbki krwi mogą być konserwowane w antykoagulantach EDTA lub jako próbka skrzepnięta. Próbkę należy przebadać jak najszybciej po pobraniu. Jeśli wystąpi opóźnienie w badaniu, próbki należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Próbkę wykazującą znaczny stopień hemolizy lub zanieczyszczenie mikrobiologiczne nie powinny być wykorzystywane do badań. Próbkę krwi wykazującą oznaki lizy mogą dawać niewiarygodne wyniki. Przed badaniem zaleca się (ale nie jest to konieczne) przemywanie wszystkich próbek krwi roztworem PBS lub izotonicznym roztworem soli.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Odczynniki są przeznaczone wyłącznie do diagnostycznego użytku *in vitro*.
- Jeśli fiolka z odczynnikami jest pęknięta lub nieszczelna, należy natychmiast wyrzucić zawartość.
- Nie należy używać odczynników po upływie daty ważności (patrz **etykieta fiolki**).
- Nie należy używać odczynników, jeżeli wytrącił się osad.
- Podczas pracy z odczynnikami należy nosić odzież ochronną, taką jak rękawiczki jednorazowe i fartuch laboratoryjny.
- Odczynniki zostały przefiltrowane przez kapsułkę 0,2 µm w celu zmniejszenia obciążenia biologicznego, ale nie są dostarczane w postaci sterylnej. Po otwarciu fiolki zawartość powinna pozostać zdalna do użycia aż do upływu daty ważności.
- Osocze, z którego wytwarzany jest ten odczynnik, nie jest już pozbawione lipidów, więc zmętnienie odczynnika jest normalnym procesem.
- Odczynniki zawierają <0,1% azotku sodu. Azotek sodu może być toksyczny w przypadku połknięcia i może reagować z ołowiem i miedzią, tworząc wybuchowe azydki metali. Podczas usuwania splukać dużą ilością wody.

- Materiały użyte do wytworzenia odczynników zbadano u źródła i stwierdzono ujemne wyniki badań na obecność przeciwciał przeciwko HIV 1+2 i HCV oraz HBsAg przy użyciu zatwierdzonych testów mikrobiologicznych.
- Żadne znane badania nie mogą zagwarantować, że produkty pochodzące od ludzi lub zwierząt są wolne od czynników zakaźnych. Podczas używania i utylizacji każdej fiolki i jej zawartości należy zachować ostrożność.

UTYLIZACJA ODCZYNNIKA I POSTĘPOWANIE W PRZYPADKU ROZLANIA

Informacje na temat utylizacji odczynników i odkażania miejsca rozlania znajdują się w dostępnych na żądanie **kartach charakterystyki**.

PRÓBY KONTROLNE I PORADY

- Badanie dodatnich (najlepiej komórek heterozygotycznych) i ujemnych prób kontrolnych powinno być wykonane równolegle z każdą serią badań. Badania należy uznać za nieważne, jeśli próby kontrolne nie dostarczają oczekiwanych wyników.
- Metody antyglobulinowe można uznać za ważne tylko wtedy, gdy wszystkie ujemne testy reagują dodatnio z czerwonymi krwinkami uczulonymi przez IgG.
- Odczynniki zawierają wzmacniacze makrocząsteczkowe, które mogą powodować fałszywie dodatnie reakcje z komórkami uczulonymi przez IgG. Zaleca się badanie komórek pacjenta wraz z osoczem pacjenta w celu zbadania reakcji fałszywie dodatnich.
- Przed użyciem należy odczekać, aż odczynnik ogrzeje się do temperatury pokojowej. Natychmiast po użyciu odczynnika należy ponownie umieścić go w temperaturze 2-8°C.
- W **metodzie próbówkowej** jedna część wynosi około 50 µl przy użyciu kroplomierza dołączonego do fiolki.
- Wykorzystanie odczynników i interpretacja wyników muszą zostać przeprowadzone przez odpowiednio przeszkolony i wykwalifikowany personel zgodnie z wymogami obowiązującymi w kraju, w którym odczynniki są używane.

WYMAGANE ODCZYNNIKI I MATERIAŁY, KTÓRE NIE STANOWIĄ CZĘŚCI ZESTAWU

Metoda próbówkowa

- Odczynnik przeciwko globulinie ludzkiej, tj. Lorne AHG Elite (nr kat. 435010 lub 415010), lub przeciwko IgG, tj. Lorne Anti-Human IgG (nr kat. 402010 lub 401010).
- Myjka do komórek Coombsa
- Szklane próbówki (10 x 75 mm lub 12 x 75 mm)
- Roztwór PBS (pH 6,8-7,2) lub izotoniczny roztwór soli fizjologicznej (pH 6,5-7,5)
- Czerwone krwinki uczulone przez IgG, tj. komórki kontrolne Coombsa firmy Lorne (nr kat. 970010)
- Dodatnie (najlepiej heterozygotyczne) i ujemne próby kontrolne czerwonych krwinek
- Inkubator z kąpielą wodną lub inkubator z suchym ciepłem zrównoważony do 37°C ± 2°C

Metoda mikrooznaczania Bio-Rad-ID

- Karty Bio-Rad ID (LISS/Coombs lub Coombs Anti-IgG)
- Wirówka Bio-Rad ID
- Roztwór Bio-Rad ID-CellStab lub ID-Diluent 2
- Inkubator Bio-Rad ID zrównoważony do 37°C ± 2°C

Metoda oznaczania Ortho BioVue

- Kasety systemu Ortho BioVue (AHG Polyspecific lub AHG Anti-IgG)
- Wirówka systemu Ortho BioVue.
- Blok cieplny systemu Ortho BioVue zrównoważony do 37°C ± 2°C
- Płyn rozcieńczający Ortho 0.8% Red Cell Diluent

Wszystkie metody

- Pipety wolumetryczne

ZAŁECANE METODY

A. Pośrednia metoda antyglobulinowa (IAT)

- Przygotować 2-3% zawiesinę krwinek czerwonych w roztworze PBS lub izotonicznymi roztworze soli fizjologicznej.
- Umieścić w oznakowanej próbówce: 1 część odczynnika Lorne i 1 część zawiesiny czerwonych krwinek.
- Dokładnie wymieszać i inkubować w temperaturze 37°C przez 15 minut.
- Przepłukać czerwone krwinki 4 razy za pomocą roztworu PBS lub izotonicznego roztworu soli fizjologicznej, zwracając uwagę, aby zlać roztwór soli fizjologicznej pomiędzy płukaniem, a następnie odtworzyć zawiesinę z każdej próbki czerwonych krwinek po każdym płukaniu. Całkowicie zlać roztwór soli fizjologicznej po ostatnim płukaniu.
- Dodać 2 części odczynnika przeciwko globulinie ludzkiej lub przeciwko IgG do każdej suchej próbki krwinek.
- Dokładnie wymieszać i odwirować wszystkie próbki przez 20 sekund z siłą 1000 rcf lub przez stosowny inny czas z odpowiednią siłą.
- Delikatnie odtworzyć zawiesinę czerwonych krwinek i zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.
- Potwierdzić ważność wszystkich ujemnych reakcji za pomocą czerwonych krwinek uczulonych przez IgG.

B. Metoda mikrooznaczania Bio-Rad-ID

- Przygotować 0,8% zawiesinę krwinek czerwonych w roztworze ID-CellStab lub ID-Diluent 2.
- Usunąć folię aluminiową z wymaganej liczby mikropróbówek na kartach ID LISS/Coombs lub Coombs Anti-IgG.
- Umieścić w odpowiedniej mikropróbówce: 50 µl zawiesiny czerwonych krwinek i 25 µl odczynnika Lorne.
- Inkubować kartę/karty ID przez 15 minut w temperaturze 37°C.
- Odwirować kartę/karty ID w wirówce na karty Bio-Rad ID.
- Zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.

C. Metoda oznaczania Ortho BioVue

- Przygotować 0,8% zawiesinę krwinek czerwonych w 0,8% roztworze Ortho Red Cell Diluent.
- Usunąć folię aluminiową z wymaganej liczby komór reakcyjnych na kasetach AHG Polyspecific lub AHG Anti-IgG.
- Umieścić w odpowiedniej komorze reakcyjnej: 50 µl zawiesiny czerwonych krwinek i 40 µl odczynnika Lorne.
- Inkubować kasetę/kasety przez 15 minut w temperaturze 37°C.
- Odwirować kasetę/kasety przez 5 minut w wirówce systemu Ortho BioVue.
- Zbadać makroskopowo w kierunku aglutynacji.

INTERPRETACJA WYNIKÓW BADAŃ

- Wynik dodatni:** Aglutynacja czerwonych krwinek stanowi dodatni wynik badania, a przy zaakceptowanych ograniczeniach procedury testowej wskazuje na obecność stosownego antygenu Kell na czerwonych krwinkach.
- Wynik ujemny:** Brak aglutynacji czerwonych krwinek stanowi ujemny wynik badania, a przy zaakceptowanych ograniczeniach procedury testowej wskazuje na brak stosownego antygenu Kell na czerwonych krwinkach.

STABILNOŚĆ REAKCJI

- Czynności płukania należy wykonywać bez przerywania; próbki należy odwirować i odczytać wyniki natychmiast po dodaniu odczynnika. Opóźnienia mogą powodować dysocjację kompleksów antygen-przeciwciała, prowadząc do fałszywie ujemnych lub słabo pozytywnych wyników.
- Należy zachować ostrożność podczas interpretacji wyników badań przeprowadzonych w temperaturach innych niż **zalecane**.

OGRANICZENIA

- Czerwone krwinki, które mają dodatni wynik DAT z powodu powłoki IgG, nie mogą być poddane badaniu grupowemu za pomocą **pośredniej metody antyglobulinowej**.
- Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom niskiej częstotliwości mogą występować jako nieoczekiwane zanieczyszczenia w surowicach odpornościowych grup krwi. Ponadto niektóre antygeny (np. Bg, Sd^a) mogą występować na czerwonych krwinkach w stanie nasilonym. Zjawiska te mogą być przyczyną rzadkich fałszywie dodatnich reakcji, które mogą wystąpić w przypadku więcej niż jednej partii o określonej swoistości.
- Nie można stwierdzić całkowitego braku wszystkich zanieczyszczających przeciwciał, ponieważ czerwone krwinki zawierające antygeny niskiej częstotliwości lub antygeny w stanie nasilonym nie zawsze są dostępne na potrzeby badania.
- Stłumiona lub ograniczona ekspresja niektórych antygenów grup krwi może natomiast powodować reakcje fałszywie ujemne – dlatego należy zawsze zachować ostrożność podczas ustalania genotypów na podstawie wyników badań.
- Wyniki fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne mogą również wystąpić z następujących przyczyn:
 - zanieczyszczenie materiałów testowych;
 - niewłaściwe przechowywanie, stężenie komórek, czas inkubacji lub temperatura;
 - niewłaściwe lub nadmierne odwirowanie;
 - odstępstwo od zalecanych metod;

SWOISTY CHARAKTER DZIAŁANIA

- Przed dopuszczeniem do obrotu każdą partię odczynników przebadano przy użyciu zalecanych metod testowych wymienionych w niniejszej instrukcji użytkownika. Badania były zgodne z wymogami testowymi określonymi w aktualnej wersji/wydaniu „Wytocznych dotyczących transfuzji krwi w Wielkiej Brytanii” (Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom).
- Obecność zanieczyszczających przeciwciał przeciwko antygenom o częstości występowania równej 1% lub wyższej w populacji losowej została wykluczona albo w badaniach z zastosowaniem odpowiednich czerwonych krwinek ujemnych pod względem antygenu, albo w badaniach z wykorzystaniem odczynników, które zostały uprzednio przyswojone w celu usunięcia niezgodnych swoistości.
- Przeciwciała przeciwko Xg^a, Do^a, Yt^a, Co^b, Wt^a, Bg^a i V^w nie mogą zostać wykluczone w rutynowych badaniach swoistości, a ich wykrycie będzie zależało od dostępności odpowiednich komórek w próbce. To samo można powiedzieć o Yt^b, M^a i V^w oraz innych antygenach niskiej częstotliwości, które nie mogą zostać wykluczone w drodze rutynowego badania swoistości, a ich wykrycie będzie zależało od dostępności odpowiednich komórek w próbce.
- Kontrolę jakości odczynników przeprowadzono przy użyciu czerwonych krwinek z fenotypami, które zostały zweryfikowane przez brytyjskie centrum krwiodawstwa i zostały przed użyciem przemycie za pomocą roztworu PBS lub izotonicznego roztworu soli fizjologicznej.

OGRANICZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI

- Użytkownik końcowy ponosi odpowiedzialność za działanie odczynników podczas korzystania z dowolnej metody innej niż wymienione **zalecane metody**.
- Wszelkie odstępstwa od **zalecanych metod** powinny zostać zweryfikowane przed użyciem⁵.

LITERATURA

- Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; str. 186.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; rozdz. 6.
- AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
- 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.

DOSTĘPNE WIELKOŚCI OPAKOWAŃ ODCZYNNIKÓW

	Pojemność fiołki	Numer katalogowy	Badań na fiołkę
Poliklonalne anty-Kp^a	2 ml	321002	40
Poliklonalne anty-Kp^b	2 ml	322002	40

TABELA SYMBOLI

Symbol	Definicja	Symbol	Definicja
	Producent	REF	Numer katalogowy
	Ograniczenie temperatury		Data ważności RRRR-MM-DD
IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Sprawdzić w instrukcji użycia
EC REP	Upoważniony przedstawiciel	LOT	Numer serii
	Oznakowanie CE		



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



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