

**LORNE LABORATORIES LTD.
WIELKA BRYTANIA**

ODCZYNNIKI MONOKLONALNE DO OZNACZANIA GRUP KRWI I UDZIAKIEJ METODYKA

Anty-A, anty-B i anty-A,B: do testów próbówkowych, DiamMed-ID, mikropytek i metod szkiełkowych

Podsumowanie

W 1900 roku Landsteiner odkrył, że sirowica niektórych pacjentów aglutynuje czerwone krwinki u innych pacjentów. Obecnie znane są cztery fenotypy: 0, A, B i AB. Od tego czasu zidentyfikowano podgrupę w fenotypie A i B.

A	B	A,B	A1	A2	B	0	Fenotyp ABO	Rasa kambiasta w %
+	0	+	0	0	+	0	A	42
0	+	+	+	0	0	0	B	10
0	0	0	+	+	+	0	0	44
+	+	+	0	0	0	0	AB	4

Zasada

Odczynnik spowodują bezpośrednią aglutynację badanych czerwonych krwinek, które zawierają odpowiedni antygen ABO. Brak aglutynacji wskazuje na nieobecność odpowiedniego antygen ABO (patrz ograniczenia).

Odczynniki

Odczynnik monoklonalny do oznaczania grup krwi ABO IgM zawierają mysie przeciwciała monoklonalne rozcieńczone w buforze fosforanowym zawierającym obłonek sodu, EDTA i albuminę białek. Każdy odczynnik jest dostarczany w optymalnym stężeniu do użytku we wszystkich zalecanych metodach badania, bez konieczności dalszego rozcieńczenia i dodawania jakichkolwiek substancji. Numer serii i data ważności są nadrukowane na folie.

Produkt	Krwinki/Klon	Kolor	Barwnik użyty
Anty-A	9113D10	Niebieski	Niebieski
Anty-B	9621A8	Żółty	Tartrazyna
Anty-A,B	152D12 + 9113D10	Bezbarwny	Brak

Przechowywanie

Nie zamrażać. Fiolki z odczynnikami powinny być przechowywane w temp. 2 - 8°C. Przedłużone przechowywanie w innej temperaturze może wywołać przyspieszoną utratę reaktywności odczynnika.

Pobieranie i przygotowywanie próbek

Do typowania antygeny można użyć próbki krwi pobrane z antykoagulantem lub bez. Jeśli próbki nie mogą być przebadane natychmiast po pobraniu należy je przechowywać w 2-8°C. Próbkę pobraną na EDTA i cytrynian powinny być ty powinno w przedziale 48 godzin. Próbkę pobraną na ACD, CPD lub CPDA-1 mogą być przechowane w ciągu 35 dni od pobrania. Przed badaniem próbki należy przepłukać co najmniej dwukrotnie w buforze PBS. Próbkę wskazujące rozpuszczanie elementów morfologicznych mogą nie dać wiarygodnych wyników.

Ostrzeżenia

- Odczynnik jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki in vitro.
- Jeśli fiołka jest pęknięta lub przeciekająca należy ją niezwłocznie wyrzucić.
- Nie używać odczynnika po wygaśnięciu daty ważności.
- Nie używać odczynnika jeżeli widoczne są osady.
- Przy obchodzeniu się z odczynnikami należy zachować ostrożność.
- Odczynnik został przefiltrowany przez kapsułkę 0,2 µl w celu zredukowania bio-osadu. Po otwarciu fiołki, zawartość pozostaje zdana do użycia do daty ważności, pod warunkiem, że nie jest mętna, co może oznaczać, że odczynnik uległ zniszczeniu lub zanieczyszczeniu.
- Odczynnik zawiera mniej niż 0,1% azydku sodu. Azydki sodu może być trujący, może też reagować z ołowiem i miedzią. Instrukcjami kanalizacyjnymi, dajcie w wyniku reakcji wybuchowe azydki metali. Przy usuwaniu odczynnika, zaleć go dużą ilością wody.
- Zaden test nie gwarantuje, że produkty otrzymane z ludzi lub zwierząt nie będą zawierać zainfekowanych substancji. Z fiołkami należy się obchodzić ostrożnie.

Pozbywanie się odczynnika i postępowanie w przypadku rozlania

W celu otrzymania informacji o pozbywaniu się odczynnika i oczyszczeniu rozlanych substancji niebezpiecznych należy zapoznać się z Kartą Charakterystyki Substancji Niebezpiecznych, która dostępna jest na prośbę zainteresowanego.

Kontrola

- Zalca się badać równoległe kontrole dodatnią i kontrolę ujemną w każdej serii testów. W przypadku nie pogwienienia się oczekiwanym wynikiem, badanie powinno być uzane za niezane.
- Przy typowaniu czerwonych krwinek od pacjenta należy pamiętać o kontroli ujemnej odczynnika, ponieważ wzmacniacze wielkoagregacyjne w odczynniku mogą dać fałszywe dodatnie reakcje z krwinkami opiszczonymi IgG.
- Próbki krwi słabych podgrup A i B (np. Ax) mogą dać fałszywe ujemne lub słabe reakcje w technice szkiełkowej, mikropytekowej i kartach żelowych. Dlatego zaleca się ponowne przebadanie słabych podgrup przy pomocy techniki próbówkowej.
- U pacjentów powyżej szóstego miesiąca powinną się potwierdzić wyniki oznaczania grup krwi badające sirowicę lub osocze na obecność znanego krwinek grupy A, B.
- W zalecanych metodach badania? 1 objętość to ok. 40 µl (dostarczany w zestawie aplikator do fiolki).
- Badanie odczynników i interpretacja wyników muszą być przeprowadzone przez wykwalifikowany personel medyczny zgodnie z wytycznymi krajów, gdzie przeprowadzane jest badanie.
- Użytkownik sam określa przydatność odczynnika do zastosowania w innych technikach badania.

Potrzebne odczynniki i materiały

- Aplikatory
- Czyznik do mikropytek
- Karty ID DiamMed (Neutral)
- Wirlówka-ID DiamMed
- Rozcieńczalnik-ID DiamMed, np. ID-CellStab
- Szkiełka mikroskopowe
- Szkiełka probówki (10 x 75 mm lub 12 x 75 mm)
- Wirlówka do płytek
- Wytrąsarka do płytek
- PBS: NaCl 0,9%, pH 7,0 +/- 0,2 w temp. 22°C +/- 1°C
- Kontrola dodatnia (najlepiej A₂B) i kontrola ujemna (Grupa 0)
- Wirlówka do probówek
- Mikropytek i dolkami U-kształnymi
- Płyny młaciezkowe

Zalecane metody badania

- A. Technika próbówkowa**
- Przygotować 2-3% zawiesinę przemytych czerwonych krwinek w PBS
- Umieścić w oznaczonej probówce: 1 objętość odczynnika Lorne anty-A/B0 i 1 objętość badanej zawiesiny czerwonych krwinek
- Dobrze wymieszać i inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 minutę
- Odkwitrować wszystkie probówki przez 10 sekund w 10000 ref lub z inną odpowiednią siłą i w innym odpowiednim czasie
- Deklaracje warstwanic płamie z bitych krwinek i odczytać makroskopowo aglutynację
- Próbki, które budzą wątpliwości oraz te z wynikiem ujemnym powinny być inkubowane przez 15 minut w temperaturze pokojowej
- Po inkubacji powtórzyć krok 4 i 5

B. Technika DiamMed-ID

- Przygotować 0,8% zawiesinę przepłukanych czerwonych krwinek w rozcieńczalniku ID
- Ustać folie aluminiową z wymaganą ilością probówek
- Umieścić w odpowiedniej probówce: 50 µl zawiesiny badanych czerwonych krwinek i 25 µl odczynnika Lorne anty-A/B0
- Inkubować Kartę ID przez 10 minut w 90 ref lub z inną odpowiednią siłą i w innym odpowiednim czasie
- Odczytać makroskopowo aglutynację

C. Technika mikropytekowa przy użyciu dolkami U-kształnymi

- Przygotować 2-3% zawiesinę przemytych czerwonych krwinek w PBS
- Umieścić w odpowiednim dolku: 1 objętość odczynnika Lorne anty-A/B0 i 1 objętość badanej zawiesiny czerwonych krwinek
- Dokładnie wymieszać, najlepiej przy użyciu wyrzaski do płytek, uważając, by nie doszło do zanieczyszczenia mikry dolkami
- Inkubować w temperaturze pokojowej przez 15 minut (czas zależy od użytkownika)

5. Odwirować mikropłytkę przez 1 minutę w 140 ref lub z inną odpowiednią siłą i w innym odpowiednim czasie
6. Delikatnie wstrząsnąć płatkę zbitych czerwonych krwinek przy użyciu wyrząsarki do płytek
7. Odczytać makroskopowo lub przy pomocy czynnika
8. Słabe reakcje powinny być potwierdzone metodą próbówką

D. Technika szkiełkowa

1. Przygotować 35-45% zawiesinę badanych czerwonych krwinek w surowicy, osoczu lub PBS.
2. Umieścić na oznaczonym szkiełku mikroskopowym: 1 objętość odczynnika Lorne anti-ABO i 1 objętość badanej zawiesiny czerwonych krwinek.
3. Używając czystego aplikatora, wymieszać odczynnik i krwinki na powierzchni ok. 20 x 40 mm.
4. Delikatnie przechylić szkiełko w tę i z powrotem przez 30 sekund trzymając go w temperaturze pokojowej, nieznacznie co jakiś czas przez 2 minuty
5. Odczytać makroskopowo aglutynację po 2 minutach przy rozproszonym świetle. Nie pomylić włókien fibrynowych z aglutynacją
6. Słabe reakcje powinny być potwierdzone metodą próbówką

Interpretacja wyników

1. Wynik dodatni: Aglutynacja czerwonych krwinek oznacza wynik dodatni badania; przyjaśnienie ograniczenia procedury testu, wskazuje na obecność odpowiedniego antygenu ABO na badanych czerwonych krwinkach.
2. Wynik ujemny: Brak aglutynacji czerwonych krwinek oznacza ujemny wynik badania; przyjaśnienie ograniczenia procedury testu, wskazuje na nieobecność odpowiedniego antygenu ABO na badanych czerwonych krwinkach
3. Rozbieżności: Jeśli wyniki uzyskane grupami krwi A, B i AB nie są skorelowane z wynikami grup A₁, A₂, B i 0 należy przeprowadzić dodatkowe badania
4. Należy odrzucić wyniki aglutynacji uzyskane przy pomocy kontroli ujemnej, jako że taka aglutynacja jest najprawdopodobniej skutkiem działania wielko cząsteczkowych substancji wzmagających aktywność odczynnika na uwrażliwionych krwinkach

Stabilność reakcji

1. Odczytać wszystkie wyniki tuż po odwirowaniu
2. Testy szkiełkowe powinny być zinterpretowane w przeciągu dwóch minut w celu uzyskania odpowiedniej specyficzności, a także w celu zapewnienia, by wynik ujemny nie został odczytany jako dodatni w wyniku wyschnięcia odczynnika
3. Należy ostrożnie interpretować wyniki uzyskane w innych temperaturach niż zalecane

Ograniczenia

1. Antygeny ABO nie są w pełni rozwinięte przy urodzeniu, dlatego próbki krwi pobrane od noworodków mogą dać słabsze reakcje
2. Probki słabych podgrup A i B (np. Ax) mogą dać fałszywie ujemne lub słabe reakcje w badaniach z techniką szkiełkową oraz przy użyciu mikropłytek i kart żelowych. Zaleca się w tych przypadkach ponowne przebadanie techniki próbówką.
3. Odczynniki monoklonalne anti-A i monoklonalne anti-B nie zostały zwalidowane do wykrywania antygenów Ax, A₃, Bx i B₃. Dlatego Lorne nie gwarantuje reaktywności odczynników monoklonalnych anti-A i anti-B na słabe podgrupy A i B.
4. Krew przechowywana może dać słabsze reakcje niż krew świeża
5. Fałszywe dodatnie lub ujemne wyniki mogą również wystąpić wskutek:
 - Niewłaściwego czasu inkubacji lub niewłaściwej temperatury
 - Niewłaściwego lub nadmiernego odwirowywania
 - Niewłaściwego przechowywania badanych materiałów
 - Niezastosowania się do zalecanych technik badania
 - Niewłaściwego stężenia krwinek
 - Zanieczyszczeniem próbek krwi pepowinowej galaretką Whartona

Informacje szczegółowe

1. Odczynniki zostały scharakteryzowane poprzez procedury wymiersono w 'zalecanych metodach badania'
2. Przed wypuszczeniem na rynek każda seria Lorne Monoclonal anti-A, anti-B oraz anti-A,B została przebadana wg. zalecanych metod badania na panelu czerwonych krwinek zawierających antygen w celu zapewnienia właściwej reaktywności
3. Specyficzność źródłowych przeciwciał monoklonalnych jest pokazana za pomocą panelu krwinek pozbawionych antygenem
4. Moc odczynników została porównana z minimalną wartością referencyjną ustaloną przez National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC):
Standard referencyjny anti-A 88722 (i/lub)
Standard referencyjny anti-B 88724

5. Lorne anti-B nie reaguje z krwinkami „nabyte B”
6. Odczynniki monoklonalne ABO nie wykrywają antygenów takich jak T, Th i Kad.
7. Kontrola jakości odczynników została przeprowadzona na czerwonych krwinkach przemysłowych dwukrotnie w PBS
8. Odczynniki są zgodne z rekomendacjami zawartymi w ostatnim wydaniu Wytycznych UK Blood Transfusion Services

Zręcznie się odpowiedzialności

1. Producent nie ponosi odpowiedzialności za wyniki uzyskane przy zastosowaniu innych technik badania niż zalecane.
2. Przed zastosowaniem innych metod niż zalecane, należy potwierdzić ich skuteczność.

Bibliografia

1. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256, 495-497
2. Messeter L et al. Mouse monoclonal antibodies with Anti-A, Anti-B and Anti-A,B specificities, some superior to human polyclonal ABO reagents. Vox Sang 1984; 46, 185-194
3. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6th Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2.
4. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition, Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter 7.
5. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6
6. BSCH Blood Transfusion Task Force. Guidelines for microplate techniques in liquid-phase blood grouping and antibody screening. Clinical Laboratory Haematology 1990; 12, 437-460.
7. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
8. 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

Dołepne rozmiary odczynników:

Rozmiar fiolek	Numer katalogowy
Lorne Monoclonal anti-A	600005
10 ml	600010
1000 ml	600000
Lorne Monoclonal anti-B	610005
10 ml	610010
1000 ml	610000
Lorne Monoclonal anti-A,B	620005
10 ml	620010
1000 ml	620000

Lorne Laboratories Limited,
PO Box 6
TWYFORD
Reading, RG10 9NJ
England
Tel: +44 (0) 118 934 2400
Fax: +44 (0) 118 934 2788
E-mail: info@lornelabs.com