

Anty-D Linia komórkowa: MS-201
Kod produktu: TP

Anty-D Linia komórkowa: RUM-1
Kod produktu: GG

Odczynniki monoklonalne IgM pochodzenia ludzkiego do oznaczeń grup krwi.

Do stosowania w oznaczeniach na szkiełkach mikroskopowych, w probówkach, mikroplątkach oraz w mikrometodzie kolumnowej i żelowej.



PRZEZNACZENIE

Odczynniki monoklonalne BIOSCOT Anty-D (linia komórkowa MS-201) oraz Anty-D (linia komórkowa RUM-1) IgM pochodzenia ludzkiego służą do oznaczeń antygeny grupowe krwi D na szkiełkach mikroskopowych, w probówkach, mikroplątkach oraz w mikrometodzie kolumnowej i żelowej przez pracowników przeszkolonych w zakresie badań serologicznych.

WPROWADZENIE

Układ grupowy krwi Rh

Aktualna wiedza oraz diagnostyka laboratoryjna przeciwciał anty-D opiera się na badaniach Levine'a i Stetsona z 1939 r. oraz Landsteinerja i Weinerja z 1940 r.

Antygen RhD nie występuje u około 15% osób rasy białej. W ciąży RhD-dodatniej lub po przetoczeniu niezgodnej krwi następuje szybka odpowiedź immunologiczna, która może wywoływać chorobę hemolityczną noworodków lub ciężką hemolizę poprzetoczeniową.

Słabe lub częściowe odmiany antygeny D

Słaba odmiana antygeny D („słaby” antygen D) charakteryzuje się mniejszą liczbą miejsc antygenowych D w erytrocytach. Częściowa odmiana antygeny D („częściowy” antygen D) charakteryzuje się niepełną liczbą epitopów D na erytrocytach. Antygen D kategorii VI (D^{VI}) to częściowy antygen D niezawierający większości epitopów D. Odczynnik BIOSCOT Anty-D (kod produktu GG) wykrywa większość przypadków słabych i częściowych odmian antygeny D w teście bezpośredniej aglutynacji jednak nie wykrywa antygenów D^{VI}. Odczynniki BIOSCOT TP i GG Anty-D nadają się szczególnie do oznaczeń grup krwi. Do oznaczeń słabych lub częściowych odmian antygeny D nie zaleca się stosowania metody na szkiełkach mikroskopowych ani na mikroplątkach.

ZASADA DZIAŁANIA ODCZYNNIKA

Podczas stosowania zgodnie z zaleceniami dodatni wynik testu polega na aglutynacji (zlepianiu) krwinek czerwonych wykazujących ekspresję odnośnego antygeny po dodaniu odczynnika. Ujemny wynik testu w postaci braku aglutynacji erytrocytów oznacza, że dany antygen nie występuje w próbce.

Odczynniki zoptymalizowano do użycia w zalecanych technikach analitycznych bez konieczności dodatkowych rozcieńczeń ani dodawania innych substancji.

Dostarczane są odczynniki po filtracji (0,22 µm).

MATERIAŁY

Odczynnik do oznaczeń grup krwi Anty-D (kod produktu TP) zawiera przeciwciała uzyskane z linii komórkowej MS-201. Odczynnik do oznaczeń grup krwi Anty-D (kod produktu CG) zawiera przeciwciała uzyskane z linii komórkowej RUM-1. Odczynniki zawierają przeciwciała monoklonalne IgM pochodzenia ludzkiego w roztworze buforu zawierającego wielkocząsteczkowe potencjatory chemiczne, 0,1% (w/v) roztwór azydku sodu oraz materiał pochodzenia bydłowego. Jedna fiołka 10 ml umożliwia przeprowadzenie ok. 250-400 oznaczeń.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Wszystkie produkty krwiopochodne należy traktować jako potencjalnie zakaźne. W badaniach dawców linii komórkowych z których uzyskano opisywane odczynniki potwierdzono ujemne wyniki testów na obecność przeciwciał przeciwko ludzkiemu wirusowi nabytego upośledzenia odporności (HIV), wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV), antygenów powierzchniowych wirusa zapalenia wątroby typu B (HbsAg), wirusa Epstein-Barra (EBV) oraz wirusów obecnych w materiale pochodzenia mysiego (Mouse Antibody Production, MAP). Żaden znany test nie daje całkowitej pewności, że odczynniki wytwarzane z ludzkiej krwi są wolne od czynników zakaźnych. Należy zachować ostrożność podczas stosowania odczynników, niszczenia zużytych opakowań i usuwania ich zawartości.
2. Odczynniki zawierają środek konserwujący — roztwór azydku sodu o stężeniu 0,1% (w/v). Azydek sodu może być trujący po spożyciu. Istnieje również ryzyko powstania silnie wybuchowych soli w reakcji z ołowiem i miedzią wchodzącymi w skład rur instalacji wodno-kanalizacyjnej. Wylewane odpady należy spłukać dużą ilością wody.

3. Odczynniki powinny być klarowne; zmętnienie może oznaczać skażenie bakteryjne. Nie należy używać odczynników, które zawierają widoczne drobiny, osad lub żel fibrynowy (osad włóknika).
4. Odczynniki są przeznaczone wyłącznie do diagnostyki in vitro prowadzonej przez wykwalifikowany personel.
5. Materiał pochodzenia wołowego wykorzystany w tym produkcie uzyskano metodami zatwierdzonymi przez USDA lub z udokumentowanych źródeł. Uzyskano ujemne wyniki badań zwierząt, od których pobrano materiał, w kierunku zakaźności i ryzyka przenoszenia zakaźnych encefalopatii gąbczastych.
6. Produkty należy utylizować przez autoklawowanie lub zanurzenie w odpowiednio stężonym roztworze środków odkażających do rana następnego dnia.

UWAGI DLA UŻYTKOWNIKÓW

Zaleca się wykonywanie kontroli dodatniej i ujemnej dla każdej serii odczynnika. Jeżeli wynik kontroli różni się od oczekiwanego, wynik oznaczenia należy uznać za fałszywy.

Nie ma konieczności stosowania kontroli do każdego oznaczenia. Stosowanie odczynników kontrolnych (np. BIOSCOT Monoclonal Control (kod produktu: TT) zaleca się jedynie w przypadku oznaczeń grup krwi pacjentów z autoprzeciwciałami lub zaburzeniami białkowymi. W takich przypadkach kontrole należy wykonywać równoległe z każdym oznaczeniem przy użyciu odczynnika.

Przedstawiona charakterystyka odczynników odnosi się do procedur opisanych w niniejszej instrukcji. Przydatność odczynników w metodach innych niż opisane użytkownik musi określić samodzielnie.

W przypadku zmian charakterystyki analitycznej lub uszkodzenia opakowania należy się skontaktować z Działem Kontroli Jakości firmy Millipore (UK).

WARUNKI PRZECHOWYWANIA

Zamknięty lub otwarty odczynnik należy przechowywać w temperaturze 2-8 °C do daty ważności oznaczonej na etykiecie produktu.

Przechowywanie odczynników w niewłaściwej temperaturze (np. w warunkach podwyższonej temperatury lub wielokrotne rozmrażanie i zamrażanie) może przyspieszyć utratę ich reaktywności.

POBIERANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

Nie ma potrzeby przygotowania pacjenta przed pobraniem próbki. Próbki krwi żyłnej należy pobierać w typowy sposób a badanie należy wykonać jak najszybciej po pobraniu krwi. W razie opóźnienia badania próbki należy przechowywać w temp. 2-8 °C. Odczynnik nie nadaje się do oznaczeń próbek wykazujących makroskopową hemolizę lub zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Przechowywanie próbek w temperaturze innej od zalecanej może skutkować uzyskaniem fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych wyników oznaczeń.

WYMAGANE MATERIAŁY NIEWCHODZĄCE W SKŁAD ZESTAWU

Metoda na szkiełku mikroskopowym

- Szkiełko podstawowe
- Sól fizjologiczna lub zgodna surowica (osocze)
- Minutnik laboratoryjny

Metoda mikroplątkowa

- Mikroplątka ze studzienkami „U”
- Sól fizjologiczna (roztwór izotoniczny)
- Minutnik laboratoryjny
- Wirówka (RCF 100)
- Mieszadło do mikroplątek
- Automatyczny czytnik mikroplątek (wyposażenie opcjonalne)

Mikrometoda kolumnowa

- Kasety systemu Ortho BioVue® Neutral
- Sól fizjologiczna (roztwór izotoniczny), sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS) lub rozpuszczalnik do erytrocytów Ortho® (0,8%)
- Mikropipety o objętości dozowania 10, 40 i 50 µl
- Minutnik laboratoryjny
- Wirówka kompatybilna z kasetami systemu Ortho BioVue
- Czytnik (opcjonalny)

Metoda probówkowa

- Probówka
- Sól fizjologiczna (roztwór izotoniczny)
- Inkubator (temp. inkubacji 37 °C)
- Minutnik laboratoryjny
- Wirówka (RCF 1000)

Mikrometoda żelowa

- Karta „NaCl, enzymy test and cold agglutinins” DiaMed ID
- Sól fizjologiczna (roztwór izotoniczny), Sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS) lub rozpuszczalnik Diluent 2 DiaMed ID
- Mikropipety o objętości dozowania 10, 25 i 50 µl
- Minutnik laboratoryjny
- Wirówka kompatybilna z kartami DiaMed ID
- Czytnik (opcjonalny)

ZALECANE METODY

1. METODA SZKIEŁKOWA

- 1.1. Przygotować 35-50% zawiesinę badanych krwinek czerwonych w autologicznym (lub zgodnym grupowo) osoczu, surowicy lub soli fizjologicznej.
- 1.2. Na czyste, oznakowane szkiełko mikroskopowe nanieść 1 kroplę (40 µl) odczynnika Anty-D.
- 1.3. Dodać 1 kroplę (40 µl) zawiesiny badanych krwinek czerwonych.
- 1.4. Wymieszać antysurowicę z krwinkami na powierzchni o średnicy około 2 cm przez delikatne poruszanie szkiełkiem. Po 2 minutach makroskopowo odczytać wynik testu. Należy zwrócić uwagę, by nie interpretować wysychania mieszaniny jako aglutynacji.

2. METODA PROBÓWKOWA

- 2.1. Przygotować zawiesinę 3-5% roztworu badanych erytrocytów w izotonicznej soli fizjologicznej.
- 2.2. Do oznakowanej próbówki wprowadzić 1 kroplę (40 µl) odczynnika Anty-D.
- 2.3. Dodać 1 kroplę (40 µl) zawiesiny badanych krwinek czerwonych.
- 2.4. Roztwór wymieszać i odwirować z przyspieszeniem 1000 RCF przez 20 sekund.
- 2.5. Ostrożnie wstrząsnąć próbówką, aby oderwać erytrocyty od ścianek próbówki, a następnie makroskopowo skontrolować obecność aglutynacji.
- 2.6. Próbkę z wynikiem ujemnym lub słabo dodatnim należy inkubować w temp. 37 °C przez 5 min, a następnie powtórzyć etapy 2.4 oraz 2.5. Celem inkubacji jest wzmocnienie reakcji w przypadku słabych lub częściowych odmian antygeny D.

3. TECHNIKA MIKROPLYTKOWA

- 3.1. Przygotować zawiesinę 3-5% roztworu badanych erytrocytów w izotonicznej soli fizjologicznej.
- 3.2. Do odpowiednich studzienek mikroplastyki wprowadzić 1 kroplę (40 µl) odczynnika Anty-D.
- 3.3. Dodać do odpowiednich studzienek równą objętość (40 µl) zawiesiny erytrocytów.
- 3.4. Wymieszać zawartość studzienek ręcznie lub mieszadłem do mikroplastyk.
- 3.5. Inkubować mikroplastykę w temp. pokojowej przez 15-20 minut.
- 3.6. Wirować z przyspieszeniem 100 RCF przez 40 sekund.
- 3.7. Odtworzyć zawiesinę erytrocytów ręcznie lub za pomocą wytrząsarki do mikroplastyk.
- 3.8. Odczytać wynik makroskopowo lub za pomocą czytnika. Wynik uzyskany w czytniku mikroplastyk wymaga weryfikacji przez użytkownika.

4. MIKROMETODA ŻELOWA

- 4.1. Przygotować 3-5% zawiesinę badanych erytrocytów w izotonicznej soli fizjologicznej lub PBS albo 0,8% zawiesinę w roztworze Diluent 2 DiaMed ID.
- 4.2. Dodać 10 µl 3-5% zawiesiny (lub 50 µl 0,8% zawiesiny) erytrocytów do mikropróbówki lub karty systemu DiaMed ID.
- 4.3. Do odpowiedniej mikropróbówki dodać 25 µl odczynnika Anty-D.
- 4.4. Ostrożnie wymieszać i odwirować kartę systemu ID, przestrzegając czasu oraz przeciążenia podanych przez producenta karty systemu ID.
- 4.5. Odczytać wynik makroskopowo lub za pomocą czytnika. Wynik uzyskany w czytniku mikroplastyk wymaga weryfikacji przez użytkownika.

5. MIKROMETODA KOLUMNOWA

- 5.1. Przygotować 3-5% zawiesinę badanych erytrocytów w izotonicznej soli fizjologicznej lub PBS albo 0,8% zawiesinę w rozpuszczalniku do erytrocytów Ortho.
- 5.2. Dodać 10 µl zawiesiny 3-5% (lub 50 µl zawiesiny 0,8%) erytrocytów do komory reakcyjnej kasety Ortho BioVue.
- 5.3. Do odpowiedniej komory reakcyjnej dodać 40 µl odczynnika Anty-D.
- 5.4. Ostrożnie wymieszać i odwirować kartę, przestrzegając czasu oraz przeciążenia podanych przez producenta kasety.
- 5.5. Odczytać wynik makroskopowo lub za pomocą czytnika. Wynik uzyskany w czytniku mikroplastyk wymaga weryfikacji przez użytkownika.

OGRANICZENIA METODY

Odczynnik BIOSCOT Anty-D (kod produktu TP) wykrywa niektóre przypadki słabych i częściowych odmian antygeny D w teście bezpośredniej aglutynacji jednak nie wykrywa antygenów D^{vi} (zgodnie z wytycznymi UKBTS i BCSH). Nie należy stosować tego produktu do detekcji antygeny D na krwinkach dawców. Odczynnik Anty-D (kod produktu GG) wykrywa większość przypadków słabych i częściowych odmian antygeny D jednak nie wykrywa antygenów D^{vi}. Jeśli konieczna jest detekcja fenotypów D^{vi}, zaleca się stosowanie odczynników do oznaczeń grup krwi BIOSCOT Anty-D IgM/IgG (kod produktu BM).

Do oznaczenia słabych lub częściowych odmian antygeny D nie zaleca się stosowania metody na szkiełkach mikroskopowych ani na mikroplastykach.

Wyniki oznaczenia mogą być fałszywie dodatnie w przypadku krwinek z dodatnim wynikiem bezpośredniego testu antyglobulinowego (DAT). W celu wykrycia wyników fałszywie dodatnich zaleca się wykonywanie kontroli z użyciem odczynnika BIOSCOT Monoclonal Control (kod produktu: TT).

Stosowanie twardych mikroplastyk polistyrenowych jest korzystniejsze niż stosowanie płytek z PCV. Przydatność każdej partii mikroplastyk należy zweryfikować w warunkach stosowanych przez użytkownika.

W technice mikroplastykowej bardzo istotne jest odpowiednie stężenie erytrocytów. W zawiesinach o zbyt małym stężeniu po odwirowaniu może tworzyć się pojedyncza warstwa krwinek W zawiesinach o zbyt dużym stężeniu mogą występować wyniki fałszywie ujemne. Bardzo istotne jest wstrząsanie po odwirowaniu próbek. Nadmierne wstrząsanie może osłabiać wynik reakcji i prowadzić do wyników fałszywie ujemnych. Należy określić i zweryfikować optymalny czas wstrząsania i szybkość wirowania.

Nieprawidłowe przechowywanie lub użytkowanie kart DiaMed ID lub kaset Ortho BioVue może być przyczyną błędnych wyników oznaczenia. Karty i kasety należy przechowywać i użytkować zgodnie z zalecanymi instrukcjami producentów.

Kontaminacja badanego materiału lub nieprzestrzeganie zalecanych zasad oznaczenia mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich lub ujemnych.

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Stosując zalecane techniki przeprowadzono badania próbek pobranych na EDTA, cytrynian lub na skrzep od zdrowych dawców, pacjentów leczonych w warunkach klinicznych oraz noworodków z odczynnikami Anty-D (linia komórkowa: MS-201, kod: TP) oraz Anty-D (linia komórkowa: RUM, kod: GG). Zestaw próbek był reprezentatywny dla wszystkich głównych fenotypów grupy RhD. Całkowitą liczbę testów (n) oraz czułość i swoistość obliczoną dla każdej z metod przedstawiono w tabeli poniżej.

METODA	Anty-D (kod produktu TP)			
	CZUŁOŚĆ		SWOISTOŚĆ	
	n	%	n	%
Probówkowa	1217	99,6	300	100
Mikroplastykowa	8266	99,9	2256	100
Na szkiełku mikrosk.	1290	98,8	368	100
Żelowa	287	99,6	217	100
Kolumnowa	281	96,8	225	100

METODA	Anty-D (kod produktu GG)			
	CZUŁOŚĆ		SWOISTOŚĆ	
	n	%	n	%
Probówkowa	968	99,9	237	100
Mikroplastykowa	902	99,8	226	100
Na szkiełku mikrosk.	493	99,8	126	100
Żelowa	286	100	218	100
Kolumnowa	281	99,6	225	100

Definicje zgodnie z Common Technical Specifications (CTS):

Czułość diagnostyczna: Prawdopodobieństwo uzyskania dodatniego wyniku badania próbki zawierającej substancję docelową.

Swoistość diagnostyczna: Prawdopodobieństwo uzyskania ujemnego wyniku badania próbki niezawierającej substancji docelowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom, 5th Edition. The Stationary Office, 2001.
2. Race, R.R. and Sanger, R. Blood Groups in Man, 6th Edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.
3. Issitt, P.D. and Anstee, D.J. Applied Blood Group Serology, 4th Edition. Montgomery Publication, 1998.

PRODUCENT

Millipore (UK) Ltd
Fleming Road
Kirkton Campus
Livingston, EH54 7BN
Wielka Brytania

Tel.: +44 (0)1506 404000
Faks: +44 (0)1506 404001

PI128/d
2011-10