

MONOCLONAL BLOOD GROUPING REAGENTS
DIRECTIONS FOR USE

Anti-Fy^a: For Indirect Antiglobulin Techniques.

SUMMARY

The Fy^a and Fy^b antigens were reported in 1950 and 1951 respectively. Anti-Fy^a and anti-Fy^b have both been implicated in immediate and delayed Haemolytic Transfusion Reactions and Haemolytic Disease of the Newborn.

Anti-Fy ^a	Anti-Fy ^b	Phenotype	Caucasians %	Afro-Americans %
+	0	Fy(a+b-)	17	9
0	+	Fy(a-b+)	34	22
+	+	Fy(a+b+)	49	1
0	0	Fy(a-b-)	Very Rare	68

PRINCIPLE

The reagent will cause indirect agglutination (clumping) of test red cells, that carry the Fy(a) antigen, in the antiglobulin phase of testing. No agglutination generally indicates the absence of the Fy(a) antigen (see Limitations).

REAGENTS

This Monoclonal IgG blood grouping reagent contains human monoclonal antibodies diluted in a phosphate buffer containing sodium chloride and bovine albumin. Each reagent is supplied at optimal dilution for use with all the recommended techniques stated below without the need for further dilution or addition. For lot reference number and expiry date see Vial Label.

Product	Cell Line/Clone
Anti-Fya	DG-FYA-02

STORAGE

Do not freeze. Reagent vials should be stored at 2 - 8°C on receipt. Prolonged storage at temperatures outside this range may result in accelerated loss of reagent reactivity. This reagent has undergone transportation stability studies at 37°C and -25°C as described in document EN13640:2002.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Blood samples drawn with or without anticoagulant may be used for antigen typing. If testing is delayed, then store specimens at 2-8°C. EDTA and citrate samples should be typed within 48 hours. Samples collected into ACD, CPD or CPDA-1 may be tested up to 35 days from the date of withdrawal. All blood samples should be washed at least twice with PBS or Isotonic saline before being tested.

PRECAUTIONS

1. The reagents are intended for *in vitro* diagnostic use only.
2. If a reagent vial is cracked or leaking, discard the contents immediately.
3. Do not use the reagents past the expiration date (see Vial Label).
4. Do not use the reagents if a precipitate is present.
5. Protective clothing should be worn when handling the reagents, such as disposable gloves and a laboratory coat.
6. The reagents have been filtered through a 0.2 µm capsule to reduce the bio-burden. Once a vial has been opened the contents should remain viable until the expiry date as long as there is no marked turbidity, which can indicate reagent deterioration or contamination.
7. The reagents contain < 0.1% sodium azide. Sodium azide may be toxic if ingested and may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal flush away with large volumes of water.
8. Materials used to produce the reagents were tested at source and found to be negative for HIV 1+2 and HCV antibodies and HBsAg using approved microbiological tests.
9. No known tests can guarantee that products derived from human or animal sources are free from infectious agents. Care must be taken in the use and disposal of each vial and its contents.

DISPOSAL OF REAGENT AND DEALING WITH SPILLAGES

For information on disposal of the reagents and decontamination of a spillage site see Material Safety Data Sheets, available on request.

CONTROLS AND ADVICE

1. It is recommended a positive control (ideally heterozygous cells) and a negative control be tested in parallel with each batch of tests. Tests must be considered invalid if controls do not show expected results.
2. The antiglobulin techniques can only be considered valid if all negative tests react positively with IgG sensitised red cells.
3. In the Tube Technique one volume is approximately 50µl when using the vial dropper provided.
4. The use of the reagents and the interpretation of results must be carried out by properly trained and qualified personnel in accordance with the requirements of the country where the reagents are in use.
- i. User must determine suitability of the reagents for use in other techniques.

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED

- Anti-human globulin i.e. Lorne Polyspecific AHG Elite (Cat # 435010) or Anti-IgG i.e. Lorne Monospecific Anti-IgG (Cat # 402010).
- Coombs cell washer.
- DiaMed ID-Cards (LISS/Coombs).
- DiaMed ID-Centrifuge.
- DiaMed ID-CellStab.
- DiaMed ID-Incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Glass test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- IgG sensitised red cells i.e. Lorne Coombs Control Cells (Cat # 970010).
- Ortho BioVue System Cassettes (AHG/Coombs).
- Ortho BioVue System Centrifuge.
- Ortho BioVue System Heat Block equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- PBS solution (pH 6.8-7.2) or Isotonic saline solution (pH 6.5-7.5).
- Positive (ideally heterozygous) and negative control red cells.
- Volumetric pipettes.
- Water bath or dry heat incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.

RECOMMENDED TECHNIQUES

A. Indirect Antiglobulin Technique (IAT)

1. Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS or Isotonic saline.
2. Place in a labelled test tube: 1 volume of Lorne reagent and 1 volume of test red cell suspension.
3. Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
4. Wash test red cells 1 time with PBS or Isotonic saline, taking care to decant saline after the wash.
5. Add 2 volumes of anti-human globulin or anti-IgG to each dry cell button.
6. Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
7. Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination.
8. Confirm validity of all negative reactions with IgG sensitised red cells.

B. DiaMed-ID Micro Typing Technique

1. Prepare a 0.8% suspension of washed test red cells in the ID-Diluent.
2. Remove aluminium foil from as many microtubes as needed.
3. Place in appropriate microtube: 50µl of test red cell suspension and 25µl of Lorne reagent.
4. Incubate the LISS/Coombs ID-Card(s) for 15 minutes at 37°C.
5. Centrifuge the LISS/Coombs ID-Card(s) in the DiaMed ID-Card centrifuge.
6. Read macroscopically for agglutination.

C. Ortho BioVue Typing Technique

1. Prepare a 0.8% suspension of washed test red cells in 0.8% Ortho Red Cell Diluent.
2. Remove aluminium foil from as many reaction chambers as needed.
3. Place in appropriate reaction chamber: 50µl of test red cell suspension and 40µl of Lorne reagent.
4. Incubate the cassette(s) for 15 minutes at 37°C.
5. Centrifuge cassette(s) for 5 minutes in an Ortho BioVue System Centrifuge.
6. Read macroscopically for agglutination.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

1. **Positive:** Agglutination of the test red cells constitutes a positive test result and within accepted limitations of test procedure, indicates the presence of the appropriate antigen on the test red cells.
2. **Negative:** No agglutination of the test red cells constitutes a negative result and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the absence of the appropriate antigen on the test red cells.

STABILITY OF THE REACTIONS

1. Washing steps should be completed without interruption and tests centrifuged and read immediately after addition of the reagent. Delays may result in dissociation of antigen-antibody complexes, causing false negative or weak positive results.
2. Caution should be exercised in the interpretation of results of tests performed at temperatures other than those recommended.

LIMITATIONS

1. Red cells that have a positive DAT due to a coating of IgG cannot be typed by the Indirect Antiglobulin Technique.
2. Suppressed or diminished expression of certain blood group antigens may conversely give rise to false negative reactions and so caution should always be exercised when assigning genotypes on the basis of test results.
3. False positive or false negative results may also occur due to:
 - Contamination of test materials

- Improper storage, cell concentration, incubation time or temperature
- Improper or excessive centrifugation
- Deviation from the recommended techniques

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. The reagents have been validated by the procedures mentioned in the **Recommended Techniques**.
2. Prior to release, each lot of Lorne Anti-Fya reagent is tested by the **Recommended Techniques** against a panel of antigen-positive red cells to ensure suitable reactivity.
3. Specificity of source monoclonal antibodies is demonstrated using a panel of antigen-negative cells.
4. The Quality Control of the reagents was performed using red cells that had been washed twice with PBS or Isotonic saline prior to use.
5. The reagents comply with the recommendations contained in the latest issue of the Guidelines for the UK Blood Transfusion Services in the United Kingdom.

DISCLAIMER

1. The user is responsible for the performance of the reagents by any method other than those mentioned in the **Recommended Techniques**.
2. Any deviations from the **Recommended Techniques** should be validated prior to use⁶.

BIBLIOGRAPHY

1. Widman FK. Technical Manual, 9th Edition. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1985; Chapter 8
2. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6th Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2
3. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter 7
4. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
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.

AVAILABLE REAGENT SIZES

	Vial Size	Catalogue Number
Lorne Monoclonal Anti-Fya	2 ml	774002
	1000 ml	774000*

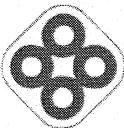
*This size is For Further Manufacturing Use (FFMU) only and is therefore not CE marked.

For the availability of other sizes, please contact:

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

TABLE OF SYMBOLS

LOT	Batch Number		<i>In-vitro Diagnostic</i>
REF	Catalogue Reference		Store At
	Expiry Date		Manufacturer
	Read Pack Insert		



LORNE LABORATORIES LTD.
WIELKA BRYTANIA



0843

ODCZYNNIKI DO OZNACZANIA GRUP KRWI LUDZKIEJ

METODYKA

Anti - Fy^a : Do pośrednich technik antyglobulinowych

Podsumowanie

Antygeny Fy^a i Fy^b zostały odkryte odpowiednio w 1950 i 1951 roku. Wywołują one bezpośrednie i opóźnione reakcje potransfuzyjne oraz Hemolityczną Chorobę Noworodków.

Anty-Fy ^a	Anty-Fy ^b	Fenotyp	Rasa kaukaska %	Afro-Amerykanie %
+	0	Fy(a+b-)	17	9
0	+	Fy(a-b+)	34	22
+	+	Fy(a+b+)	49	1
0	0	Fy(a-b-)	bardzo rzadki	68

Zasada

Odczynnik spowoduje, w antyglobulinowej fazie badania, pośrednią aglutynację badanych krwinek posiadających odpowiedni antygen Duffy. Brak aglutynacji zazwyczaj wskazuje na nieobecność odpowiedniego antygenu Duffy (Patrz ograniczenia).

Odczynnik

Odczynnik monoklonalny IgG anty-Fy^a jest przygotowany z rozcieranych ludzkich monoklonalnych przeciwciał w roztworze chlorku sodu zawierającym wielkoząsteczkowe substancje wzmacniające i albuminę bydlęcą. Odczynnik jest dostarczany w optymalnym stężeniu do użytku we wszystkich zalecanych metodach badaniach opisanych niżej, bez konieczności dodawania jakichkolwiek substancji. Seria i data ważności są nadrukowane na nalepkach fiolek.

Produkt	Linia komórkowa/klon
Anty - Fy ^a	DG-FYA-02

Przechowywanie

Nie zamrażać. Fiołki z odczynnikami powinny być przechowywane w temp. 2 - 8°C. Przedłużone przechowywanie w innej temperaturze może wywołać przyśpieszoną utratę reakcyjności odczynnika. Odczynnik może być transportowany zgodnie z przeprowadzonymi badaniami w temperaturze 37°C oraz - 25°C jeśli jest to zgodne z normą EN13640:2002

Pobieranie i przygotowywanie próbek

Do typowania antygenu 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. Próbki pobrane na EDTA lub cytrynian należą przebadawać w ciągu 48 godzin od pobrania. Próbki pobrane na ACD, CPD lub CPDA-1 mogą być przebadane w ciągu 35 dni od pobrania. Przed badaniem próbki należy przepłukać co najmniej dwukrotnie w buforze PBS.

Ostrzeżenia

1. Odczynnik jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki in vitro
2. Jeśli fiołka jest pęknięta lub przecięta należy ją niezwłocznie wyrzucić
3. Nie używać odczynnika po wygaśnięciu daty ważności
4. Nie używać odczynnika jeżeli widoczne są osady
5. Przy obchodzeniu się z odczynnikiem należy założyć fartuch oraz jednorazowe rękawice ochronne

6. Odczynnik został przefiltrowany przez kapsułkę 0.2 µl w celu zredukowania bio-osadu. Po otwarciu fiolki, zawartość pozostaje zdatna do użycia do daty ważności, pod warunkiem, że nie jest mętna, co może oznaczać, że odczynnik uległ zniszczeniu lub zanieczyszczeniu.
7. Odczynniki zawierają < 0.1% azydku sodu. Azydek sodu może być trujący, może też reagować z ołówkiem i miedzianymi instalacjami kanalizacyjnymi, dając w wyniku reakcji wybuchowe azydki metalu. Przy usuwaniu odczynnika, zalać go dużą ilością wody.
8. Materiały do produkcji odczynników zostały przebadane przy pomocy testów mikrobiologicznych; nie stwierdzono obecności HBsAg ani przeciwca HIV 1+2 i HCV.
9. Żaden test nie gwarantuje, że produkty otrzymane z ludzi lub zwierząt nie będą zawierać zainfekowanych substancji. Z fiolkami należy się obchodzić ostrożnie.

Pozbywanie się odczynnika i postępowanie w przypadku rozlania

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

Kontrole

1. Zaleca się badać równolegle kontrolę dodatnią (najlepiej heterozygotyczną) i kontrolę ujemną w każdej partii testów. W przypadku nie pojawienia się oczekiwanych wyników, badania powinny być uznane za nieważne.
2. Techniki antyglobulinowe mogą być uznane za ważne jeśli wszystkie ujemne testy reagują dodatnio z czerwonymi krwinkami uwrażliwionymi IgG
3. W technice probówkowej 1 objętość to ok. 50 µl (dostarczany w zestawie aplikator)
4. Badanie odczynników i interpretacja wyników muszą być przeprowadzone przez wykwalifikowany personel medyczny zgodnie z wymogami kraju, gdzie przeprowadzane jest badanie.
5. Użytkownik sam określa przydatność odczynnika do zastosowania w innych technikach badania.

Potrzebne odczynniki i materiały

- Globulina anty-ludzka, t.j. Lorne Polyspecific AHG Elite (Cat # 435010) lub anty-IgG, t.j. Lorne Monospecific anty-IgG (Cat # 402010)
- Myjnia Coombsa
- Karty ID DiaMed (LISS/Coombs)
- Wirówka-ID DiaMed
- Rozcieńczalnik-ID DiaMed, np. ID-CellStab
- Inkubator-ID DiaMed nastawiony na 37°C +/- 2°C
- Szklane probówki (10 x 75 mm lub 12 x 75 mm)
- Czerwone krwinki uwrażliwione IgG, tj. Lorne Coombs Control Wells (Cat # 970010)
- Karty Ortho BioVue (AHG/Coombc)
- Wirówka Ortho BioVue
- Inkubator Ortho BioVue nastawiony na 37°C +/- 2°C
- 0,8% diluent do krwinek czerwonych produkcji Ortho
- PBS: NaCl 0.9%, pH 7.0 +/- 0.2 w temp. 22°C +/- 1°C
- Kontrola dodatnia (najlepiej heterozygotyczna) i kontrola ujemna
- Pipety miareczkowe
- Łaźnia wodna lub suchy inkubator nastawiony na temp. 37 +/- 2°C

Zalecane metody badania

A Pośrednia Technika Antyglobulinowa (IAT)

1. Przygotować 2-3% zawiesinę przemytych czerwonych krwinek w PBS.
2. Umieścić w oznaczonej probówce: 1 objętość odczynnika monoklonalnego Lorne Fy^a i 1 objętość badanej zawiesiny czerwonych krwinek
3. Dobrze wymieszać i inkubować przez 15 minut w 37°C
4. Przemyć jednokrotnie czerwone krwinki w PBS lub w LISS, dekantować po płukaniu.
5. Dodać 2 objętości globuliny anty-ludzkiej lub anty-IgG do suchej plamki zbitych krwinek
6. Wymieszać dokładnie i odwirować wszystkie probówki przez 20 sekund w 1000 rcf lub z inną odpowiednią siłą i w innym odpowiednim czasie
7. Delikatnie wstrząsnąć plamkę zbitych krwinek i odczytać makroskopowo aglutynację
8. Potwierdzić ważność wszystkich ujemnych reakcji za pomocą czerwonych krwinek uwrażliwionych IgG

B. Technika DiaMed-ID

1. Przygotować 0.8% zawiesinę przepłukanych czerwonych krwinek w rozcieńczalniku ID
2. Wziąć Kartę ID LISS/Coombs i usunąć folię aluminiową z wymaganej ilości próbówek
3. Umieścić w odpowiedniej probówce: 50 µl 0.8% zawiesiny badanych czerwonych krwinek i 25 µl odczynnika Fy^a Lorne
4. Inkubować Kartę/y ID LISS/Coombs przez 15 minut w 37°C
5. Odwirować Kartę/y ID LISS/Coombs w wirówce DiaMed ID
6. Odczytać makroskopowo aglutynację

C. Technika Ortho BioVue

1. Przygotować 0.8% zawiesinę czerwonych krwinek w 0.8% rozcieńczalniku Ortho BioVue
2. Wziąć Kartę Ortho BioVue AHG/Coombs i usunąć folię aluminiową z wymaganej ilości próbówek
3. Umieścić w odpowiedniej probówce: 50 µl 0.8% zawiesiny badanych czerwonych krwinek i 40 µl odczynnika Fy^a Lorne
4. Inkubować Kartę/y w inkubatorze Ortho BioVue przez 15 minut w 37°C
5. Odwirować Kartę/y w wirówce Ortho BioVue przez 5 minut
6. Odczytać makroskopowo aglutynację

Interpretacja wyników

1. Wynik dodatni: Aglutynacja czerwonych krwinek oznacza wynik dodatni badania; przyjawszy ograniczenia procedury testu, wskazuje na obecność odpowiedniego antygenu Duffy na badanych czerwonych krwinkach.
2. Wynik ujemny: Brak aglutynacji czerwonych krwinek oznacza ujemny wynik badania; przyjawszy ograniczenia procedury testu, wskazuje na nieobecność odpowiedniego antygenu Duffy na badanych czerwonych krwinkach

Stabilność reakcji

1. Cykle płukania powinny być przeprowadzone zaraz po sobie, próbki odwirowane, a wyniki odczytane natychmiast po dodaniu odczynnika. Wszelkie opóźnienia mogą spowodować dysocjację związków antygen-przeciwciała, dając fałszywe zanione lub zawyżone wyniki.
2. Należy ostrożnie interpretować wyniki badań przeprowadzonych w innej temperaturze niż zalecana

Ograniczenia

1. Czerwone krwinki, które mają dodatni DAT, z powodu opłaszczenia IgG, nie mogą być typowane Pośrednią Techniką Antyglobulinową
2. Obniżona ilość niektórych przeciwciał grup krwi może dać fałszywe ujemne reakcje, dlatego należy uważać przy oznaczaniu genotypów na podstawie wyników badania
3. Fałszywe dodatnie lub ujemne wyniki mogą również wystąpić wskutek:
 - Kontaminacji badanego materiału
 - Niewłaściwego stężenia krwinek, czasu inkubacji lub niewłaściwej temperatury
 - Niewłaściwego lub nadmiernego odwirowywania
 - Niezastosowania się do zalecanych technik badania

Informacje szczegółowe

1. Odczynniki zostały scharakteryzowane poprzez procedury wymienione w ‘zalecanych metodach badania’
2. Przed wypuszczeniem na rynek każda seria odczynnika Lorne anti-Fy^a została przebadana na panelu czerwonych krwinek zawierających antigen wg ‘zalecanych metod badania’ w celu zapewnienia właściwej reaktywności
3. Obecność zanieczyszczających przeciwciał do抗原ów o występowalności w statystycznej próbie $\geq 1\%$ została wykluczona przy pomocy testów, w których zastosowano odpowiednie czerwone krwinki pozbawione antygenu lub przy pomocy testów, w których zastosowano odczynniki uprzednio wchłonięte w celu usunięcia zakłócających swoistości.
4. Kontrola jakości odczynników została przeprowadzona z użyciem czerwonych krwinek przemytych w PBS przed użyciem
5. Odczynniki są zgodne z rekomendacjami zawartymi w ostatnim wydaniu Wytycznych UK Blood Transfusion Services.

Zrzeczenie 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. Widman FK. Technical Manual, 9th Edition. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1985; Chapter 8
2. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6th Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2
3. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter 7
4. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
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.

Dostępne rozmiary odczynników

	Rozmiar fiołki	Numer katalogowy
Odczynnik monoklonalny Lorne Fya	2 ml	774004
	1000 ml	774000

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

TABELA SYMBOLI

LOT	Numer serii	IVD	diagnostyka in-vitro
REF	Numer katalogowy		temperatura przechowywania
	data przydatna do użycia		producent
	patrz instrukcja		