

# LORNE LABORATORIES LTD. WIELKA Brytania

## ODCZYNNIKI DO OZNACZANIA GRUP KRWI LUDZKIEJ METODYKA

### anty-Lu<sup>a</sup> i anty-Lu<sup>b</sup>. Do pośrednich technik antyglobulinowych

#### Podsumowanie

Antygeny Lu<sup>a</sup> i Lu<sup>b</sup> zostały odkryte w 1945 roku. Ich ekspresja na czerwonych krwinkach jest zdeterminowana. Anty-Lu<sup>a</sup>, w odróżnieniu od anty-Lu<sup>b</sup>, nie powoduje na ogół hemolizy reakcji potransfuzyjnych. Natomiast zarówno anty-Lu<sup>a</sup> jak i anty-Lu<sup>b</sup> powodują hemolizy Choroba Noworodków.

Anty-Lu <sup>a</sup>	Anty-Lu <sup>b</sup>	Fenotyp	Wysypowanie w %
+	0	Lu(a+b-)	0,15
+	+	Lu(a+b+)	7,5
0	+	Lu(a-b+)	92,35
0	0	Lu(a-b-)	bardzo rzadki

#### Zasada

Odczynnik spowoduje w antyglobulinowej fazie badania, pośrednią aglutynację badanych krwinek posiadających Brak aglutynacji zawsze wskazuje na nieobecność odpowiedniego antygenu Lu<sup>a</sup> (Lu<sup>b</sup>) (Patrz ograniczenia).

#### Odczynniki

Odczynniki Lorne ludzki anty-Lu<sup>a</sup> i anty-Lu<sup>b</sup> są przygotowywane z ludzkiej surowicy rozciełzonej w roztworze chlorku sodu zawierającym wielko cząsteczkowe substancje wzmacniające i albuminy bydlęce. Odczynniki są dostarczane w optymalnym stężeniu do użycia we wszystkich zalecanych metodach badaniach opisanych niżej, bez konieczności dodawania jakichkolwiek substancji. Seria i data ważności są nadrukowane na nalepce folki.

#### Przechowywanie

Nie zamrażać. Fiolki z odczynnikami powinny być przechowywane w temp. 2 - 8°C. Przechowana przechowywane w innej temperaturze może wywołać przyspieszoną utratę reakcyjności odczynnika. Odczynnik pozostaje stabilny do 7 dni pod warunkiem przechowywania w temperaturze poniżej 30°C.

#### Pobieranie i przygotowywanie próbek

Do wypowania 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. Probki pobrane na EDTA lub cytrynian należy przebadać w ciągu 48 godzin od pobrania. Probki pobrane na ACD, CPD lub CPD-A-1 mogą być przebadane w ciągu 35 dni od pobrania. Przed badaniem próbki należy przepłukać co najmniej dwukrotnie w buforze PBS.

#### Ostrzeżenia

- Odczynnik jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki in vitro
- Jeśli folka jest pełniona lub przecieka należy ją niezwłocznie wyrzucić
- Nie używać odczynnika po wygasnięciu daty ważności
- Nie używać odczynnika jeżeli widoczne są osady
- Przy obchodzeniu się z odczynnikami należy zachować furtuch oraz jednorazowe rękawice ochronne
- Odczynnik został przefiltrowany przez kapsułkę 0,2 µl w celu zredukowania bio-osadu. Po otwarciu folki, 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 < 0,1% azydka sodu. Azydki sodu może być trujący, może też reagować z ołowiem i miedzią. Instalacje kanalizacyjne, dające w wyniku reakcji wybuchowe azydki metali. Przy usuwaniu odczynnika, zaleca się dużą ilość wody.
- Żaden test nie gwarantuje, że produkty otrzymane z ludzi lub zwierząt nie będą zawierały zainfekowanych substancji. Z folkami należy się obchodzić ostrożnie.
- Materiały do produkcji odczynników zostały przebadane przy pomocy testów mikrobiologicznych, nie stwierdzono obecności HBsAg ani przeciwciał HIV 1-2 i HCV

#### 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.

#### Kontrola

- Zaleca się badać równoległe kontrole dodatnią (najlepiej heterozygotyczną) i kontrolę ujemną, w każdej partii testów. W przypadku nie pojawienia się oczekiwanych wyników, badania powinny być uznane za nieważne.
- Techniki antyglobulinowe mogą być uznane za ważne jeśli wszystkie ujemne testy reagują dodatnio z czerwonymi krwinkami uwarzliwionymi IgG
- W zalecanych metodach badania 1 objętość to ok. 40 µl (dostarczany w zestawie aplikator)
- Badanie odczynników i interpretacja wyników muszą być przeprowadzane przez wykwalifikowany personel medyczny zgodnie z wymogami kraju, gdzie przeprowadzane jest badanie.
- Użytkownicy sam określa przydatność odczynnika do zastosowania w innych technikach badania.

#### Potrzebne odczynniki i materiały

- Globulina anty-ludzka, t<sub>3</sub> Lorne Polyspecific AHG Elite (Cat # 435010) lub anty-IgG, t<sub>3</sub> Lorne Monospecific anty-IgG (Cat # 401010)
- Mylina Coombsa
- Karty ID DiaMed (LISS/Coombs)
- Witrowka-ID DiaMed
- Rozcieńczalnik-ID DiaMed, np. ID-CellSAB
- Inkubator-ID DiaMed nastawiony na 37°C +/- 2°C
- Szklane probówki (10 x 75 mm lub 12 x 75 mm)
- Czerwone krwinki uwarzliwione IgG, t<sub>3</sub> Lorne Coombs Control Wells (Cat # 970010)
- PBS: NaCl 0,9%, pH 7,0 +/- 0,2 w temp. 22°C +/- 1°C
- Kontrola dodatnia (najlepiej heterozygotyczna) i kontrola ujemna
- Pipety miareczkowe
- Łażna wodna lub suchy inkubator nastawiony na temp. 37 +/- 2°C

#### Zalecane metody badania

##### A. Pośrednia Technika Antyglobulinowa (IAT)

- Przygotować 2-3% zawiesinę czerwonych krwinek w PBS.
  - Umieścić w oznaczonej probówce: 1 objętość odczynnika Lorne anty-Lu<sup>a</sup> (anty-Lu<sup>b</sup>) i 1 objętość badanej zawiesiny czerwonych krwinek
  - Dobrze wymieszać i inkubować przez 15 minut w 37°C
  - Przemycie czterokrotnie czerwone krwinki w PBS, dekantować solankę pomiędzy płukankami oraz zawiesić ponownie pianką zbytki czerwonych krwinek po każdym płukaniu. Dekantować całkowicie solankę po ostatnim płukaniu
  - Dodać 2 objętości globuliny anty-ludzkiej lub anty-IgG do każdej suchej pianki zbytki czerwonych krwinek
  - Wymieszać dokładnie i odwirować wszystkie probówki przez 20 sekund w 10000 rtf lub z inną odpowiednią siłą i w innym odpowiednim czasie
  - Delikatnie wstrząsnąć pianką zbytki krwinek i odczytać makroskopowo aglutynację
  - Powtórzyć ważność wszystkich ujemnych reakcji za pomocą czerwonych krwinek uwarzliwionych IgG
- ##### B. Technika DiaMed-ID
- Przygotować 0,8% zawiesinę przepłukanych czerwonych krwinek w rozcieńczalniku ID
  - Wziąć Kartę ID LISS/Coombs i usunąć folię aluminiową z wymaganej ilości probówek
  - Umieścić w odpowiedniej probówce: 50 µl 0,8% zawiesiny badanych czerwonych krwinek i 25 µl odczynnika Lorne anty-Lu<sup>a</sup> (anty-Lu<sup>b</sup>)
  - Inkubować Kartę ID LISS/Coombs przez 15 minut w 37°C
  - Odczytać Kartę ID LISS/Coombs przez 10 minut w 90 rtf lub z inną odpowiednią siłą i w innym odpowiednim czasie

#### Interpretacja wyników

- Wynik dodatni: Aglutynacja czerwonych krwinek oznacza wynik dodatni badania, przyjąwszy ograniczenia procedury testu, wskazuje na obecność odpowiedniego antygenu na badanych czerwonych krwinkach.
- Wynik ujemny: Brak aglutynacji czerwonych krwinek oznacza ujemny wynik badania, przyjąwszy ograniczenia procedury testu, wskazuje na nieobecność odpowiedniego antygenu na badanych czerwonych krwinkach

### Stabilność reakcji

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

### Ograniczenia

1. Czerwone krwinki, które mają dodani DAT, z powodu opłaszczenia IgG, nie mogą być typowane Pośrednią Techniką Antyglobulinową
2. Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom o niskiej częstotliwości mogą się okazać substancjami zanieczyszczającymi w antystrumieniu do oznaczenia grup krwi. Co więcej, niektóre antygeny (np. Bg, Sd<sup>a</sup>) mogą się znajdować w stanie wzbudzonej na czerwonych krwinkach. Te zjawiska mogą być źródłem rzadkich fałszywych reakcji dodatnich, które mogą mieć miejsce w więcej niż 1 serii o danej specyficzności
3. Nie jest możliwe zagwarantowanie braku zanieczyszczających przeciwciał; czerwone krwinki zawierające antygeny o niskiej częstotliwości lub wzbudzone antygeny nie zawsze są dostępne do badań
4. Obniżona ilość niektórych przeciwciał lub wzbudzone antygeny nie zawsze są dostępne do badań oznaczaniu genotypów na podstawie wyników badania
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 sęczenia krwinek

### Informacje szczegółowe

1. Odczynniki zostały scharakteryzowane poprzez procedury wymienione w 'zalecanych metodach badania'
2. Przed wypuszczeniem na rynek każda seria Lorne anti-Lu<sup>a</sup> i anti-Lu<sup>b</sup> została przebadana na panelu czerwonych krwinek zawierających antygen wg 'zalecanych metod badania' w celu zapewnienia właściwej reaktywności
3. Obecność zanieczyszczających przeciwciał do antygenów o występowalności w statystycznej próbie  $\geq 1\%$  została wykłuczona przy pomocy testów, w których zastosowano odpowiednio czerwone krwinki pozbawione antygeny swoistości
4. Przeciwciała do Xg<sup>a</sup>, Do<sup>a</sup>, Yt<sup>a</sup>, Co<sup>a</sup>, Wt<sup>a</sup>, Bg<sup>a</sup> i V<sup>w</sup> mogą nie być wykluczone w standardowych badaniach specyficzności, a wykrycie będzie zależało od dostępności odpowiednich krwinek. To samo można powiedzieć o Yt<sup>b</sup> i M<sup>b</sup> oraz innych antygenach o niskiej częstotliwości, których obecność może nie być wykłuczona o rutynowym badaniu specyficzności - wykrycie będzie zależało od dostępności odpowiednich krwinek
5. Kontrola jakości odczynników została przeprowadzona z użyciem czerwonych krwinek przemitych w PBS przed użyciem
6. Odczynniki są zgodne z rekomendacjami zawartymi w ostatnim wydaniu Wytocznych UK Blood Transfusion Services

### Zrządzenie 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, 9<sup>th</sup> Edition. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1985;
2. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6<sup>th</sup> Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2
3. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8<sup>th</sup> Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter 7
4. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> 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

Ludzkie anti-Lu <sup>a</sup> Lorne	Rozmiar fiołki	Numer katalogowy
	2 ml	330002
	1000 ml	330000
Ludzkie anti-Lu <sup>b</sup> Lorne	2 ml	331002
	1000 ml	331000

W celu uzyskania innych objętości należy skontaktować się z:

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