



Przeciwciało Anty-IgG/C3d  
Surowica pochodzenia króliczego/  
Linia komórkowa: BRIC-8  
Kod produktu: TS

Do zastosowania w testach antyglobulinowych



### **PRZEZNACZENIE**

Antyludzka globulina firmy BIOSCOT to polispecyficzny odczynnik IgG/C3d do określania grupy krwi (linia komórkowa BRIC-8), który wykryje uczulające (ale nie bezpośrednio aglutynujące) przeciwciała związane z grupami krwi. Odczynnik powinien być stosowany przez personel przeszkolony w zakresie technik serologicznych.

### **WPROWADZENIE**

Zastosowanie oznaczeń antyludzkiej globuliny opisane przez Coombsa, Mouranra i Race'a w latach 1945–6 sprawiło, że stały się one bezcennymi technikami laboratoryjnymi mającymi na celu wykrycie uczulających (ale nie bezpośrednio aglutynujących) przeciwciał. Oryginalne przykłady były specyficzne względem czynnika Rh. Późniejsze doświadczenia dowiodły ogromnej wartości testów antyglobulinowych w wykrywaniu przeciwciał ze specyficzną względem praktycznie każdej znanej, klinicznie istotnej grupy krwi.

### **ZASTOSOWANIA**

#### **Pośredni test antyglobulinowy**

- Do badań przesiewowych surowicy dawców krwi i pacjentów pod kątem obecności przeciwciał
- W badaniach zgodności przez transfuzję krwi
- W fenotypowaniu erytrocytów
- W identyfikacji i miareczkowaniu przeciwciał znajdujących się w surowicach lub eluatach.

#### **Bezpośredni test antyglobulinowy**

- W diagnostyce laboratoryjnej pod kątem anemii hemolitycznej
- W diagnostyce laboratoryjnej pod kątem choroby hemolitycznej u noworodków
- W badaniu podejrzewanych reakcji na transfuzję
- W badaniu tych zaburzeń autoimmunologicznych, które obejmują wiązanie immunoglobulin i/lub dopełniacza do erytrocytów.

#### **Uwaga:**

Wykrywanie pewnych klinicznie istotnych przeciwciał, które aktywują dopełniacz (zwykle w układzie Kidd) jest silniejsze i czasami możliwe jedynie poprzez zastosowanie raczej polispecyficznego odczynnika antyludzkiej globuliny niż monospecyficznego przeciwciała anty-IgG. Znaczenie roztworu do wymywania/ płukania erytrocytów często jest niedoceniane. Bufor fosforanowy z solą fizjologiczną (PBS) o pH 6,8–7,2 jest lepszy niż niebuforowany roztwór soli fizjologicznej o normalnej sile jonowej.

### **ZASADA OZNACZENIA**

Dodanie antyludzkiej globuliny do dokładnie wymytych erytrocytów pokrytych przeciwciałem (immunoglobuliną) i/lub fragmentami trzeciego składnika układu dopełniacza (C3b, C3bi, C3dg lub C3d) generalnie będzie skutkowało wyraźnie widoczną aglutynacją erytrocytów. Antyludzka globulina (polispecyficzna) firmy BIOSCOT jest mieszaniną wybranych rozcieńczeń surowic pochodzenia króliczego, immunizowanych oczyszczonymi przeciwciałami ludzkimi klasy IgG i mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko C3d (linia komórkowa BRIC-8). Odczynnik poddano standaryzacji, aby zapewnić optymalne wykrywanie ludzkich przeciwciał klasy IgG (wszystkich czterech podklas) i fragmentów C3d związanych z erytrocytami we wszystkich rutynowych zastosowaniach diagnostycznych, gdzie odpowiednie jest zastosowanie bezpośrednich lub pośrednich testów antyglobulinowych. Odczynnik nie spowoduje aglutynacji erytrocytów z fragmentami C4d.

Odczynnik zoptymalizowano do stosowania w rekomendowanych technikach analitycznych w postaci dostarczonej, bez konieczności wykonywania dalszych rozcieńczeń ani dodawania innych substancji.

Produkt jest dostarczany w postaci przefiltrowanej na filtrze 0,22 µm.

### **MATERIAŁY**

W skład odczynnika Antyludzka globulina (kod produktu TS) wchodzi zawiesina przeciwciał antyludzkich klasy IgG pochodzenia króliczego i anty-ludzkiego C3d z linii komórkowej BRIC-8, w roztworze buforowym zawierającym makrocząsteczkowe immunostymulanty chemiczne. Odczynnik zawiera azydek sodu 0,1% (w/v) i materiał pochodzenia wołowego. Zawartość każdej fiolki o pojemności 10 ml wystarcza do wykonania około 125 oznaczeń.

### **ŚRODKI OSTROŻNOŚCI**

- W badaniach linii komórkowej pochodzenia mysiego użytej do wyprodukowania tego odczynnika uzyskano wyniki ujemne testów na obecność wirusów obecnych w materiale pochodzenia mysiego (Mouse Antibody Production, MAP). W badaniach materiału od ludzkich dawców, wykorzystanego do produkcji antysurowicy pochodzenia króliczego uzyskano wyniki ujemne testów na obecność przeciwciał anty-HIV1, anty-HIV2, anty-HCV, HBsAg i kiły. Należy zachować ostrożność podczas stosowania odczynników, niszczenia każdego z zużytych opakowań i usuwania ich zawartości.
- Odczynnik zawiera azydek sodu w stężeniu 0,1% (w/v). Azydek sodu może być trujący po spożyciu. Istnieje również ryzyko powstania silnie wybuchowych soli w reakcji z ołowiem lub miedzią, wchodzącymi w skład rur instalacji wodno-kanalizacyjnej. Wylwane odpady należy spłukać dużą ilością wody.
- Odczynnik powinien być klarowny. Zmętnienie może oznaczać skażenie bakteryjne. Nie należy używać odczynnika, jeżeli doszło do wytrącenia osadu, żelu fibrynowego lub jeżeli w roztworze widoczne są drobinny.
- Odczynnik jest przeznaczony wyłącznie do profesjonalnej diagnostyki *in vitro*.
- Materiał pochodzenia wołowego uzyskano ze źródeł zatwierdzonych przez Departament Rolnictwa USA (USDA) lub innych udokumentowanych źródeł. Badanie zwierząt, od których pobrano materiał, potwierdziło brak zakaźności i niskie ryzyko przenoszenia zakaźnych encefalopatii gąbczastych.
- Produkt należy unieszkodliwić przez zanurzenie na całą noc w odpowiednio stężonym roztworze środków odkażających lub przez autoklawowanie.

### **WSKAZÓWKI DLA UŻYTKOWNIKÓW**

Aby potwierdzić prawidłowość wyniku ujemnego, należy dodać jedną kroplę erytrocytów uczulonych przeciwciałami IgG (krwinek kontrolnych testu Coombsa) do próbki, ponownie odwirować i ocenić pod kątem aglutynacji. W wypadku braku aglutynacji test należy uznać za nieważny i powtórzyć.

Przedstawiona charakterystyka odczynnika odnosi się do procedur zawartych w niniejszej ulotce dołączonej do opakowania. Przydatność do metod innych niż opisane musi zostać określona przez użytkownika.

W przypadku zmian w analitycznym działaniu urządzenia lub uszkodzenia opakowania należy skontaktować się z Działem Kontroli Jakości firmy Millipore (UK) Ltd.

### **SPOSÓB PRZECHOWYWANIA**

Otwarte lub zamknięte odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2–8°C do daty ważności podanej na etykiecie produktu.

Przechowywanie produktu w niewłaściwej temperaturze (np. zbyt wysoka temperatura przechowywania lub wielokrotne rozmrażanie i zamrażanie) może przyspieszyć utratę reaktywności odczynników.

### **POBIERANIE MATERIAŁU DO BADAŃ**

Pobieranie próbek do badań nie wymaga specjalnego przygotowania pacjenta. Krew należy pobrać zatwierdzoną metodą. Krew należy pobrać na antykoagulanty EDTA lub cytrynian. Badanie próbki należy przeprowadzić 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 silną hemolizę lub zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Przechowywanie próbek w niewłaściwej temperaturze (np. zbyt wysoka temperatura przechowywania lub wielokrotne rozmrażanie i zamrażanie) może prowadzić do uzyskania fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych wyników oznaczeń.

## WYMAGANE MATERIAŁY NIEMCHODZĄCE W SKŁAD ZESTAWU

### **Pośredni test antyglobulinowy – sól fizjologiczna o normalnej sile jonowej (NISS):**

- Probówka
- Bufor fosforanowy z solą
- Inkubator 37°C
- Timer
- Wirówka (1500 g)
- Eryocyty uczulone przeciwciałami IgG (krwinki kontrolne testu Coombsa)

### **Pośredni test antyglobulinowy – sól fizjologiczna o niskiej sile jonowej (LISS):**

- Probówka
- Bufor fosforanowy z solą
- Sól fizjologiczna o niskiej sile jonowej
- Inkubator 37°C
- Timer
- Wirówka (1500 g)
- Eryocyty uczulone przeciwciałami IgG (krwinki kontrolne testu Coombsa)

### **Bezpośredni test antyglobulinowy:**

- Probówka
- Bufor fosforanowy z solą
- Timer
- Wirówka
- Eryocyty uczulone przeciwciałami IgG (krwinki kontrolne testu Coombsa)

## ZALECANE TECHNIKI OZNACZANIA

Użytkownik musi zweryfikować zastosowanie automatycznych urządzeń do wymywania krwinek.

### **1. POŚREDNI TEST ANTYGLOBULINOWY – sól fizjologiczna o normalnej sile jonowej (NISS):**

- 1.1 Do wyraźnie oznaczonej, czystej, szklanej probówki dodać 2 krople (80 µl) badanej surowicy.
- 1.2 Dodać jedną kroplę (40 µl) 3-5% zawiesiny badanych erytrocytów, które zostały przemyte trzykrotnie i ponownie zawieszono w buforze PBS.
- 1.3 Roztwór dokładnie wymieszać i inkubować w temperaturze 37°C przez 30–60 minut.
- 1.4 Przemyć krwinki cztery razy w buforze PBS, dbając o to, aby całkowicie dekantować płyn do wymywania, i dokładnie zawieszając odwirowane krwinki po każdym przemyciu. Dokładnie zdekantować bufor PBS po ostatnim myciu.
- 1.5 Dodać 2 krople (80 µl) Antyludzkiej globuliny (polispecyficznej) firmy BIOSCOT do osuszonych krwinek na dnie probówki. Roztwór dokładnie wymieszać i odwirować z prędkością 1000 rcf przez 20 sekund.
- 1.6 Ponownie zawiesić krwinki, delikatnie wstrząsając, i odczytać wynik makroskopowo. Uwaga: Gwałtowne wstrząsanie może zaburzyć słabą aglutynację.
- 1.7 Ważność wszystkich ujemnych wyników oznaczeń antyglobulinowych powinna być potwierdzona poprzez dodanie erytrocytów uczulonych przeciwciałami IgG (krwinek kontrolnych testu Coombsa).

### **2. POŚREDNI TEST ANTYGLOBULINOWY – sól fizjologiczna o niskiej sile jonowej (LISS):**

- Użycie zawiesiny badanych krwinek w roztworze LISS umożliwia skrócenie czasu inkubacji do 15 minut. Czulość testu antyglobulinowego LISS zależy od użycia jednakowych objętości surowicy do zawiesiny erytrocytów. Dlatego zaleca się, aby podczas dodawania surowicy i zawiesiny krwinek stosować pipety półautomatyczne. Badane eryocyty powinny być przemyte dwukrotnie buforem PBS i jednokrotnie roztworem LISS, zanim zostaną przygotowane w postaci 3–5% roztworu w LISS.
- 2.1 Do wyraźnie oznaczonej, czystej, szklanej probówki dodać 1 kroplę (40 µl) badanej surowicy.
  - 2.2 Dodać jednakową objętość (40 µl) 3–5% zawiesiny krwinek badanych w roztworze LISS.
  - 2.3 Roztwór dokładnie wymieszać i inkubować w temperaturze 37°C przez 15 minut. Kontynuować etapy 1.4–1.7, jak podano w opisie dla pośredniego testu antyglobulinowego (NISS).

### **3. BEZPOŚREDNI TEST ANTYGLOBULINOWY**

Bezpośredni test antyglobulinowy jest wykorzystywany do pokazania adsorpcji przeciwciał IgG i/lub fragmentów dopełniacza do erytrocytów in vivo. Badane próbki krwi powinny być świeżo pobrane (mniej niż 24 godziny), najlepiej na antykoagulant EDTA.

- 3.1 Przygotować 3–5% zawiesinę badanych erytrocytów w buforze PBS.
- 3.2 Do wyraźnie oznaczonej, czystej, szklanej probówki dodać 1 kroplę (40 µl) zawiesiny krwinek. Kontynuować etapy 1.4–1.7, jak podano w opisie dla pośredniego testu antyglobulinowego (NISS).

## OGRANICZENIA METODY

Zanieczyszczenie surowicą ludzką i/lub niewystarczające wymycie zneutralizuje antyludzką globulinę.

Zakrzepłe próbki krwi nie powinny być schładzane przed przeprowadzeniem bezpośredniego testu antyglobulinowego.

Zanieczyszczenie badanego materiału lub odchylenia od zalecanych technik oznaczania mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych.

## CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW

Odczynnik polispecyficzny przeciwko ludzkim przeciwciałom IgG/C3d Antyludzka globulina (linia komórkowa BRIC-8), kod produktu TS, badano przy użyciu każdej z zalecanych technik, wykonując oznaczenia próbek pobranych na antykoagulant EDTA lub cytrynian od dawców, pacjentów oraz noworodków. Całkowitą liczbę testów (n) oraz czulość i swoistość obliczono dla każdej z metod i przedstawiono w tabeli poniżej.

Metoda	Antyludzka globulina, kod produktu			
	Czulość		Swoistość	
	n	%	n	%
IAT (NISS)	0	0	51	100
IAT (LISS)	19	100	157	100
DAT	13	100	47	100

Skróty: IAT = Pośredni test antyglobulinowy. DAT = Bezpośredni test antyglobulinowy. NISS = roztwór soli fizjologicznej o normalnej sile jonowej. LISS = roztwór soli fizjologicznej o niskiej sile jonowej.

### **Definicje pochodzą ze wspólnych specyfikacji technicznych (WST):**

**Czulość diagnostyczna:** Prawdopodobieństwo, że wyrób daje wynik pozytywny w obecności diagnozowanego markera.

**Specyficzność diagnostyczna:** Prawdopodobieństwo, że wyrób daje wynik negatywny przy braku diagnozowanego markera.

## PIŚMIENNICTWO

- a) Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. and Race, R.R. Detection of Weak and „incomplete” Rh agglutinins: A new test. *Lancet* 1945; ii:15.
- b) Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. and Race, R.R. A new test for the detection of weak or „incomplete” antibodies. *Brit. J. Exp. Path.* 1945; 26:225.
- c) Pirofsky, B. A seminar on problems encountered in pretransfusion testing. Washington DC. American Association of Blood Banks, 1972:59.
- d) Garratty, G. A seminar on problems encountered in pretransfusion testing. Washington DC. American Association of Blood Banks, 1972:33.
- e) Walker, R.H. Ed Technical Manual. 10th ed Washington, DC. American Association of Blood Banks, 1990; 147-157.
- f) Issitt, P. and Anstee D.J. Applied blood group serology. 4th ed Miami. Montgomery Scientific Publication, 1998.
- g) Dacie, J.V., Crookston, J.H. and Christenson, W.N. Incomplete cold antibodies: Role of complement in sensitisation to antiglobulin serum by potentially haemolytic antibodies. *Brit. Haematol* 3.77: 1957.
- h) Bruce, M et al., A serious source of error in Antiglobulin Testing. *Transfusion* 26; 177-181 (1986).
- i) Garratty, G. „The significance of IgG on the Red Cell Surface.” *Transfusion Medicine Reviews* Tom 1. Nr 1. (Kwiecień 1987) s. 47-57.
- j) Freedman, J. „The significance of Complement on the Red Cell Surface.” *Transfusion Medicine Reviews* Tom 1. Nr 1. (Kwiecień 1987) s. 58-70.
- k) Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 5th Edition 2001. The Stationary Office.



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

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

PI134/d  
2013-02