



Instrukcja użycia

Wyd. 002/07-2021

Opis	Nr katalogowy
Anti-A A-11H5 (monoklonalny) 10 ml	01110
Anti-A BIRMA1 (monoklonalny) 10 ml	01210
Anti-B B-6F9 (monoklonalny) 10 ml	02110
Anti-B LB2 (monoklonalny) 10 ml	02210
Anti-AB A-5E10-B-2D7 (monoklonalny) 10 ml	03110

WYRÓB MEDYCZNY DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

PODSUMOWANIE

W 1900 roku Karl Landsteiner odkrył, że surowica niektórych osobników aglutynuje erytrocyty innych. Rozpoznano cztery różne fenotypy grup krwi: 0, A, B i AB. Od tego czasu zidentyfikowano już podgrupy A i B.

Odsetek grup krwi AB0 u rasy kaukaskiej

Antygen		Przeciwciało				Fenotyp	Rasa
A	B	A1	A2	B	0	AB0	kaukaska %
+	0	0	0	+	0	A	42
0	+	+	+	0	0	B	10
0	0	+	+	+	0	0	44
+	+	0	0	0	0	AB	4

Tabela 1: Częstość występowania antygenów

ZASTOSOWANIE

Mysie monoklonalne przeciwciała IgM anty-A, anty-B i anty-AB są przeznaczone do swoistego i jakościowego wykrywania erytrocytów, które niosą odpowiedni antygen AB0 i są odpowiednie do użycia w technikach szkiełkowych, płytkowych punktowych, mikropłytkowych i probówkowych. Powyższe techniki opierają się na zasadzie bezpośredniej hemaglutynacji. Po dodaniu erytrocytów do odczynników testowych zachodzi specyficzna reakcja antygen-przeciwciało, jeśli odpowiedni antygen jest obecny na erytrocytach. Na tę reakcję wskazuje widoczna aglutynacja erytrocytów. Brak aglutynacji krwinek czerwonych wskazuje – biorąc pod uwagę ograniczenia metod badawczych – brak odpowiedniego antygeny (ujemny wynik testu). Odczynniki anty-A A-11H5 i anty-AB A-5E10-B-2D7 są odpowiednie do reakcji aglutynacji, a tym samym do identyfikacji Ax.

INFORMACJE O PRODUKCJI

Przeciwciała monoklonalne stosowane do oznaczania grup krwi A, B i 0 są izotypu IgM i są pobierane z mysich komórek hybrydomy. Przeciwciała są rozcieńczane w buforze zawierającym 0,9% chlorek sodu, albuminę bydlęcą (bez stabilizatora), EDTA i odczynniki ułatwiające ponowne zawieszenie osadu komórek po odwirowaniu. Konserwant: < 0,1% azydek sodu. Surowice testowe anty-A i anty-B są barwione odpowiednio na niebiesko i żółto w celu łatwiejszej identyfikacji. Odczynniki te zostały zoptymalizowane do użycia bez dalszego rozcieńczania lub dodatków. Numer serii i data ważności są podane na etykiecie fiołki.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki testowe należy przechowywać w temperaturze 2-8°C do daty ważności podanej na etykiecie produktu. Po pierwszym otwarciu produktu ponownie szczelnie go zamknąć i przechowywać w temperaturze 2-8°C.

POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

Próbki krwi do oznaczenia grupy krwi AB0 należy pobierać aseptycznie do probówek z EDTA lub cytrynianem. Próbkę należy przetestować jak najszybciej po pobraniu. W przypadku opóźnienia w testowaniu próbkę należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Próbki wykazujące hemolizę lub skażenie mikrobiologiczne nie powinny być testowane, ponieważ może to skutkować fałszywie dodatnimi lub fałszywie ujemnymi wynikami. Wszystkie próbki krwi należy dwukrotnie przemyć 0,9% roztworem NaCl przed badaniem metodą probówki, płytki punktowej lub mikropłytki. Stosując technikę szkiełkową przygotować 35-45% zawiesinę badanych erytrocytów (krew pełna); stosując technikę płytkową należy użyć krew pełną lub przygotować 10% zawiesinę badanych erytrocytów w 0,9% roztworze NaCl.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Odczynniki są przeznaczone wyłącznie do użytku laboratoryjnego do diagnostyki in vitro.
- Odczynniki są przeznaczone do użytku przez upoważnionych operatorów przeszkolonych w zakresie technik serologicznych.
- Odczynniki nie są przeznaczone do samodzielnego stosowania.
- Nie używać tych odczynników po upływie daty ważności.
- Wyrzucić zawartość uszkodzonych fiołek.
- Odczynniki zostały przefiltrowane przez filtr 0,2 µm w celu zmniejszenia obciążenia biologicznego.
- Po otwarciu fiołki zawartość powinna zachować stabilność do upływu terminu ważności. Wyrzucić zawartość, jeśli po otwarciu pojawi się zmętnienie lub zanieczyszczenie.
- CE-Immundiagnostika GmbH nie gwarantuje, że produkty pochodzące od ludzi lub zwierząt są wolne od czynników zakaźnych. Należy zachować ostrożność podczas używania i usuwania każdej fiołki i jej zawartości.
- Podczas korzystania z tych produktów należy nosić odzież ochronną, jak na przykład fartuch i jednorazowe rękawiczki.

UTYLIZACJA ODCZYNNIKA I POSTĘPOWANIE W PRZYPADKU ROZLANIA

Informacje na temat usuwania odczynnika i dekontaminacji miejsca rozlania znajdują się w Karcie Charakterystyki Mieszczyny, dostępnej na żądanie od CE-Immundiagnostika GmbH.

KONTROLE I PORADY

- Dodatnie i ujemne krwinki kontrolne należy badać równolegle z każdą serią testów. Testy należy uznać za nieważne, jeśli kontrole nie wykazują oczekiwanych reakcji.
- Ponieważ odczynniki nie zawierają wzmacniaczy wielkocząsteczkowych, jest bardzo mało prawdopodobne, że w krwinkach opłaszczonych IgG wystąpią fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne reakcje.
- Słabe antygeny (Ax lub Bweak) mogą nie zostać zidentyfikowane. Wskazane jest ponowne przetestowanie niejednoznacznych wyników przy użyciu metody probówkowej.
- Objętość kropli uzyskana z zakraplacza z fiołki wynosi około 35-45 µl.
- Odczyt i interpretacja wyników musi być przeprowadzona przez odpowiednio przeszkolony i wykwalifikowany personel, zgodnie z wymogami kraju, w którym odczynniki są używane.
- Odczynniki te należy używać wyłącznie zgodnie z niniejszą instrukcją użycia.

WYMAGANE MATERIAŁY I ODCZYNNIKI

- 0,9% roztwór NaCl
- Szklane probówki
- Uchwyt na probówki
- Wirówka do probówek
- Pipety wolumetryczne
- Mikropłytki, wytrząsarka do płytek
- Płyta
- Szklane szkiełko mikroskopowe
- Bagietki do mieszania
- Krwinki kontrolne dodatnie i ujemne
- Czasomierz

REKOMENDOWANE TECHNIKI

A. METODA PROBÓWKOWA

1. Przygotować 2-4% zawiesinę erytrocytów w 0,9% roztworze NaCl.
2. Umieścić 1 objętość odczynnika i 1 objętość zawiesiny testowych erytrocytów w oznakowanej probówce.
3. Dokładnie wymieszać i od razu wirować przy 400 g przez 1 minutę (przy 1500 obr./min lub w innym odpowiednim czasie i z odpowiednią siłą).
4. Natychmiast odczytać wynik: delikatnie wstrząsnąć probówką, aby usunąć osad erytrocytów z dna probówki i odczytać makroskopowo wynik aglutynacji; zapisać wynik.

B. METODA MIKROPLYTKOWA

Przygotowanie mikroplatek:

Mikroplateki wykonane przez różnych producentów/dostawców mają różne właściwości statyczne, które mogą powodować nieswoiste reakcje krwinek czerwonych i białek. Zaleca się wstępne przygotowanie nieużywanych mikroplatek przed użyciem, aby ograniczyć do minimum gromadzenie się czerwonych krwinek. Zalecamy stosowanie studzienek „U” wykonanych z tworzywa sztucznego.

1. Umieścić 1 objętość 22% albuminy wołowej (BSA) w odpowiednich dołkach.
2. Dokładnie wymieszać poprzez delikatne wstrząsanie lub używając wytrząsarki do mikroplatek, aby zapewnić równomierne pokrycie dołków.
3. Inkubować w temperaturze pokojowej (18-25°C) przez 10 do 15 minut.
4. Wylać BSA i wyrzucić do odpowiedniego pojemnika na odpady.
5. Przepłukać mikroplatekę co najmniej 10 razy wodą z kranu.
6. Następnie dwukrotnie przepłukać mikroplatekę wodą destylowaną lub dejonizowaną.
7. Przechylić i potrząsnąć mikroplateką, aby usunąć nadmiar wody.
8. Przed użyciem pozostawić mikroplatekę do wyschnięcia.

Alternatywne techniki mogą być stosowane pod warunkiem, że zostały zatwierdzone przez użytkownika.

Procedura:

1. Przygotować 2 - 4% zawiesinę testowanych erytrocytów w 0,9% roztworze NaCl. (Zalecenie: 2% zawiesina)
2. Przy użyciu zakraplacza z fiolki umieścić 30 µl odpowiedniego odczynnika w oznakowanych dołkach mikroplateki.
3. Do mikroplateki dodać 30 µl przygotowanej wcześniej zawiesiny badanych erytrocytów.
4. Mieszać przez 30 sekund ręcznie lub za pomocą wytrząsarki.
5. Odwirować mikroplatekę przez 1 minutę przy 400 g (przy 1500 obr./min lub w odpowiednim alternatywnym czasie i z odpowiednią siłą).
6. W razie potrzeby krótko wstrząsnąć mikroplateką przy użyciu wytrząsarki.

Zapisać wynik i siłę reakcji, równoległe testując krwinki kontroli dodatniej i ujemnej. Urządzenia do odczytu, jeśli są używane, muszą być zatwierdzone. Korzystanie z dodatkowych środków wizualnych, takich jak np. lusterka lub szkła powiększające, może ułatwić odczyt wyników.

C. METODA SZKIELKOWA

1. Z krwi pełnej przygotować 35-45% zawiesinę badanych erytrocytów.
2. Umieścić 1 objętość odczynnika i 1 objętość krwi pełnej na szkiełku.
3. Używając czystej bagietki, dokładnie wymieszać obie objętości na obszarze około 20x40mm.
4. Powoli poruszać szkiełkiem w przód i w tył.
5. Odczytać wynik makroskopowo po maksimum 2 minutach i zapisać.

6. Nieprawidłowe postępowanie lub przekroczony czas inkubacji może prowadzić do artefaktów spowodowanych wysychaniem i test należy uznać za nieważny.

D. METODA PŁYTKOWA

1. Z krwi pełnej przygotować 35-45% zawiesinę badanych erytrocytów lub 10% zawiesinę badanych erytrocytów w 0,9% roztworze NaCl.
2. Umieścić 1 objętość odczynnika + 1 objętość zawiesiny badanych erytrocytów na płytce.
3. Używając czystej bagietki dokładnie wymieszać obie objętości.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5-10 minut.
5. Odczytać wynik makroskopowo i zapisać.

Nieprawidłowe postępowanie lub przekroczony czas inkubacji może prowadzić do artefaktów spowodowanych wysychaniem.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

1. **Dodatni:** Aglutynacja badanych erytrocytów wskazuje, w ramach przyjętych ograniczeń procedury testowej (patrz poniżej), obecność odpowiedniego antygeny AB0 na badanych erytrocytach.
2. **Ujemny:** Brak aglutynacji badanych erytrocytów wskazuje, w ramach przyjętych ograniczeń procedury testowej (patrz poniżej), na brak odpowiedniego antygeny AB0 na badanych erytrocytach.

Rozbieżności: Jeżeli wyniki uzyskane dla antygenów na badanych erytrocytach nie korelują z wykrytymi alloprzeciwciałami grupy krwi, wymagane są dalsze badania.

OGRANICZENIA

1. Antygeny AB0 nie są w pełni rozwinięte po urodzeniu, dlatego słabsze reakcje mogą wystąpić w przypadku próbek pępowinowych lub noworodkowych.
2. W przypadku stosowania przeciwciał monoklonalnych próbki krwi ze słabymi podgrupami A lub B mogą powodować fałszywie ujemne lub słabe reakcje podczas badania przy użyciu szkiełek lub mikroplatek. Wskazane jest ponowne przetestowanie słabych podgrup przy użyciu techniki probówkowej.
3. Przechowywana krew może dawać słabsze reakcje niż świeża krew.
4. Wyniki fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne mogą również wystąpić z powodu:
 - Zanieczyszczenia materiałów testowych
 - Niewłaściwego przechowywania, stężenia erytrocytów, czasu inkubacji lub temperatury
 - Niewłaściwego lub przekroczzonego wirowania
 - Odstępstwa od zalecanych technik
5. Podczas stosowania techniki płytkowej punktowej i próbek krwi pełnej może czasami wystąpić tworzenie się rulonów, które przypominają słabą aglutynację i mogą być interpretowane jako fałszywie dodatnia reakcja. Zjawisko to nie wynika z przyczyn immunologicznych. Można spodziewać się powstawania rulonów we krwi z heparyną oraz u pacjentów leczonych ekspanderami osocza (np. dekstranem), jak również u pacjentów z plazmocytomą (wysoka zawartość białka, zmieniony skład białka), w zaburzeniach onkologicznych (nieprawidłowy hemogram) i zaburzeniach krzepnięcia. Próbkę krwi od tych pacjentów należy zawsze badać techniką probówkową, ponieważ generalnie tego zjawiska nie można zweryfikować przy użyciu zawiesiny erytrocytów. Obecność słabych antygenów (A₃, A_x, B_{weak}) należy wykazać techniką probówkową, ze względu na większą czułość, w stosowanych przypadkach po 30 minutach inkubacji. Niezwykle słabe reakcje lub brak reakcji mogą być prawdopodobnie spowodowane obecnością podgrup A i B. Próbkę krwi od pacjentów cierpiących na niektóre schorzenia mogą wykazywać reakcje fałszywie dodatnie/fałszywie ujemne. Próbkę krwi pępowinowej zanieczyszczoną galaretką Whartona mogą wykazywać fałszywie dodatnie reakcje. Nie stosować pośredniego



Instrukcja użycia

Wyd. 002/07-2021

Anti-A, Anti-AB, Anti-B

testu Coombsa (ICT) z monoklonalnymi odczynnikami mysimi i surowicami AHG. Reaktywne autoaglutyniny są często potencjalnym źródłem błędów w typowaniu krwi AB0. Obecność tych przeciwciał jest nieprzewidywalna. Wystarczająco duża liczba tych przeciwciał może powodować niespecyficzne reakcje przy wykazywaniu izoaglutynin z limfocytami A(-1) i B, a także niespecyficzne reakcje z surowicami testowymi anti-A, anti-B i anti-AB, jeśli są testowane nieprzemycie krwinki lub próbki zawieszone w surowicy lub osoczu. Oznaczenia AB0 i izoaglutynin są zatem niezbędne do oznaczania grup krwi. Wszelkie rozbieżności między oznaczeniami AB0 i izoaglutynin wymagają dalszych badań, niezależnie od siły reakcji w surowicy lub krwinkach pacjenta. Nie stosować odczynników monoklonalnych przygotowanych z mysich komórek hybrydom do bezpośrednich testów antyglobulinowych z odczynnikami AHG.

- Do oznaczania antygenów AB0 i Rh zawsze używać dwóch różnych klonów.

STABILNOŚĆ REAKCJI

- Odczytać wszystkie wyniki bezpośrednio po odwirowaniu probówek i mikroplitek.
- Testy szkiełkowe należy zinterpretować w ciągu 2 minut, aby zapewnić swoistość i uniknąć możliwości błędnego zinterpretowania wyniku ujemnego jako dodatniego z powodu wysuszenia odczynnika.
- Badania należy uznać za nieważne, jeżeli zostały przeprowadzone w temperaturach innych niż zalecane.

CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Charakterystyka działania oceniana jest zgodnie ze Wspólnymi Specyfikacjami Technicznymi (CTS: Decyzja Komisji UE z dnia 03.02.2009).

- Odczynniki zostały przetestowane przy użyciu wszystkich zalecanych procedur.
- Każda seria jest badana zgodnie z wymaganiami Wspólnych Specyfikacji Technicznych dla wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro i spełnia wymagania.
- Swoistość przeciwciał monoklonalnych jest wykazana przy użyciu panelu erytrocytów antygenowo ujemnych.
- Kontrolę jakości odczynników przeprowadzono przy użyciu erytrocytów lub krwi pełnej, które zostały dwukrotnie przemycie 0,9% roztworem soli fizjologicznej.
- Przetestowano ponad 1000 próbek z czułością i swoistością >99%.

OGRANICZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI

- Użytkownik jest odpowiedzialny za działanie odczynników inną metodą niż zalecane.
- Wszelkie odstępstwa od zalecanych technik należy sprawdzić przed użyciem.

LITERATURA

- Kohler C. & Milstein C. (1975), Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256, 495-497.
- Lee H.H., Rouger P., Germain C., Muller A. & Salmon C. (1983).
The production and standardisation of monoclonal antibodies as AB blood group typing reagents. Symposium of International Association of Biological Standardisation on monoclonal antibodies.
- Human Blood Groups, by Geoff Daniels, Wydanie 1, Blackwell Science, Oxford 1995.
- HMSO, Guidelines for Blood Transfusion Services., Wydanie 2, 1994.

WYKAZ SYMBOLI

	Numer serii		Tylko do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy		Przechowywać w temp. 2-8°C
	Data ważności		Wytwórca
	Zapoznać się z instrukcją		

NUMERY KATALOGOWE

Nr kat.	Produkt	Ilość
01110	Anti-A (Klon 11H5)	1 x 1 x 10 ml
		5 x 1 x 10 ml
		10 x 1 x 10 ml
		50 x 1 x 10 ml
01210	Anti-A (Klon Birma-1)	1 x 1 x 10 ml
		5 x 1 x 10 ml
		10 x 1 x 10 ml
		50 x 1 x 10 ml
02110	Anti-B (Klon 6F9)	1 x 1 x 10 ml
		5 x 1 x 10 ml
		10 x 1 x 10 ml
		50 x 1 x 10 ml
02210	Anti-B (Klon LB-2)	1 x 1 x 10 ml
		5 x 1 x 10 ml
		10 x 1 x 10 ml
		50 x 1 x 10 ml
03110	Anti-AB (Klony: A: 5E10 B: 2D7)	1 x 1 x 10 ml
		5 x 1 x 10 ml
		10 x 1 x 10 ml
		50 x 1 x 10 ml

	Dystrybutor	Farmator Sp. z o.o. ul. Na Zapleczu 4B 87-100 Toruń, Polska
	Tłumaczenie	