

**ANTY-A (ABO1), ANTY-B (ABO2), ANTY-A,B (ABO3)  
ANTY-D (RH1) IgM I, ANTY-D (RH1) IgM II,  
ANTY-D (RH1) TOTEM, ANTY-D (RH1) IgG,  
ANTY-DCE (RH1,2,3), NEG CONTROL, GROUPAKIT**



## **WPROWADZENIE**

Odczynniki, których dotyczy ulotka, są wyrobami medycznymi do diagnostyki *in vitro* (IVDMD) do użytku profesjonalnego.

Odczynniki ANTY-A (ABO1), ANTY-B (ABO2), ANTY-A,B (ABO3) są używane do określania grup krwi układu AB0. Służą do wykrywania obecności antygenów erytrocytowych A i/lub B obecnych na ludzkich krwinkach czerwonych. Odczynniki ANTY-D (RH1) IgM I, ANTY-D (RH1) IgM II, ANTY-D (RH1) Totem i ANTY-D (RH1) IgG służą do wykrywania antygeny D (RH1) obecnego na ludzkich krwinkach czerwonych.

Odczynnik ANTY-DCE (RH1,2,3) umożliwia wykrycie co najmniej jednego z następujących antygenów obecnych na krwinkach czerwonych: D (RH1), C (RH2) lub E (RH3).

Kontrola ujemna NEG CONTROL jest używana przy oznaczaniu grup krwi AB0. Kontrola nie zawiera przeciwciał. Należy stosować ją w tych samych warunkach co używany odczynnik. Kontrola ujemna NEG CONTROL umożliwia interpretację uzyskiwanych wyników.

## **ZASADA OZNACZANIA**

Odczynniki przeznaczone są do wykonywania oznaczeń techniką manualną na szkiełkach lub w probówkach metodą hemaglutynacji. Krwinki czerwone z obecnymi na nich antygenami aglutynują w obecności odczynnika zawierającego odpowiednie przeciwciała:

- zarówno w bezpośredniej metodzie hemaglutynacji, gdzie wchodzi w kontakt z odczynnikiem zawierającym przeciwciała (typ: IgM),
- również w pośredniej metodzie hemaglutynacji: test antyglobulinowy w przypadku użycia przeciwciał IgG. Reakcja przebiega w dwóch etapach: badane krwinki czerwone są poddawane działaniu przeciwciał IgG. Przeciwciała wiążą się z krwinkami czerwonymi zawierającymi odpowiedni antygen. Po myciu dodaje się surowicę antyglobulinową AGH MAESTRIA IGG, która wywołuje aglutynację uczulonych krwinek czerwonych zawierających odpowiedni antygen.

Określanie grup krwi AB0 polega na jednoczesnym wykryciu antygenów A i/lub B na powierzchni ludzkich krwinek czerwonych i obecności lub braku przeciwciał anti-A i/lub anti-B w osoczu. W tym celu jest właściwe określić antygeny erytrocytowe używając znane odczynniki anti-A, anti-B lub anti-A,B (test krwinkowy), a następnie potwierdzenie wyników przez zweryfikowanie obecności odpowiednich przeciwciał w osoczu używając znanych krwinek czerwonych A1, B i ewentualnie A2 i 0 (test osocza).

Dla grupy RH1 konieczne jest użycie odczynnika ANTY-D (RH1) i kontroli ujemnej NEG CONTROL.

## **SKŁAD ODCZYNNIKÓW**

Odczynniki zostały przygotowane z monoklonalnych przeciwciał. Przeciwciała monoklonalne produkowane przez firmę Diagast są uzyskiwane z nadsącza pochodowlanego *in vitro* mysiej lub ludzkiej linii komórkowej. Odczynniki zawierają azydek sodu (< 0,1%), arsenian sodu (0,02%) i albuminę wołową. Odczynniki zostały rozlane do buteleczek z kalibrowanymi zakraplaczami. Odczynniki te są również dostępne w opakowaniu GROUPAKIT.

Opakowanie **GROUPAKIT** (Diagast, nr kat.: **70888**) zawiera 1 buteleczkę odczynnika ANTI-A (ABO1), 1 buteleczkę odczynnika ANTY-B (ABO2), 1 buteleczkę odczynnika ANTY-A,B (ABO3), 1 buteleczkę odczynnika ANTY-D (RH1) IgM I oraz 1 buteleczkę NEG CONTROL.

Kontrola ujemna **NEG CONTROL** produkowana przez firmę Diagast jest pozbawiona przeciwciał.

**Skład odczynników został zamieszczony na ostatniej stronie tej ulotki.**

## **ŚRODKI OSTROŻNOŚCI**

Wskazane jest używanie ochronnych rękawic i innych zabezpieczeń oraz postępowanie z dużą ostrożnością w przypadku oznaczeń wykonywanych z próbek ludzkich. Wszystkie produkty, które wchodzi w kontakt z badanymi próbkami powinny być traktowane jak produkty potencjalnie zakaźne. Należy stosować odpowiednie warunki oznaczania, jednorazowy sprzęt oraz stosowne procedury utylizacji zgodne z lokalnymi przepisami.

Nie używać odczynników, jeśli zostały rozlane lub jeśli uszkodzeniu uległo opakowanie.

## PRZECHOWYWANIE

Odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2 – 8°C. Odczynniki zachowują trwałość do daty ważności podanej na opakowaniu. Nie używać odczynników po upływie terminu ważności. Po każdym użyciu odczynniki wstawić do lodówki. Zwrócić uwagę, aby odczynniki nie pozostawały zbyt długo w temperaturze pokojowej.

## ODCZYNNIKI I MATERIAŁY KONIECZNE DO WYKONANIA OZNACZEŃ

- Izotoniczny roztwór soli (0,9% NaCl).
- Inkubator lub łaźnia wodna z temperaturą 37°C.
- Probówki szklane o wymiarach 10 x 75 mm lub 12 x 75 mm, statyw do probówek.
- Mieszadło mechaniczne.
- Jednorazowe płyty do oznaczania grup krwi.
- Pipeta automatyczna o nastawialnej objętości.
- Wirówka 100 – 1200g.
- Próbkki krwi o znanych fenotypach: A, B, O, RH1 i RH-1, RH2 i RH-2, RH3 i RH-3, np. HEMA CQI (Diagast).
- Surowica antyglobulinowa anti-IgG - AGH MAESTRIA IGG (Diagast).
- Krwinki czerwone uczulone IgG.
- Zestaw do identyfikacji częściowego antygenu D, D-SCREEN (Diagast).

## PRÓBKKI - KONTROLE

### Badane próbki krwi

Krew należy pobrać na jeden z antykoagulantów: EDTA, heparyna lub cytrynian do sterylnej zamykanej probówki. Krew przechowywać w zamkniętej jałowej probówce w temperaturze 2 – 8°C. Badanie należy przeprowadzić możliwie szybko, najlepiej w ciągu 48 godzin, dopóki nie są widoczne ślady hemolizy. Przed wykonaniem oznaczenia próbki krwi odwirować przez 3 minuty przy 1200g.

### Próbki krwi ze znanymi fenotypami: HEMA CQI

System analityczny musi być zwalidowany poprzez użycie próbek o znanych fenotypach:

- próbek zawierających antygen odpowiadający przeciwciału znajdującemu się w odczynniku,
- próbek nie zawierających antygenu odpowiadającego przeciwciału znajdującemu się w odczynniku.

Wykonanie oznaczenia na takich próbkach lub na HEMA CQI pozwala na wykrycie błędów proceduralnych lub sprzętowych i na podjęcie odpowiednich działań korekcyjnych.

### Kontrola odczynnika

Przy oznaczaniu grupy RH1, dla każdej próbki, należy przeprowadzić reakcję kontrolną w tych samych warunkach zastępując odczynnik Anti-D (RH1) kontrolą ujemną NEG CONTROL.

W przypadku anomalii w oznaczaniu grup krwi ABO, reakcja kontrolna powinna być przeprowadzana w tych samych warunkach, a odczynniki ABO powinny być zastąpione kontrolą NEG CONTROL.

## WYKONANIE OZNACZENIA

### a) Metoda szkiełkowa w temperaturze pokojowej (18 – 25°C) - nie dotyczy ANTY-D (RH1) IgG

- Na idealnie czyste szkiełko nanieść zakraplaczem z fiolki 1 kroplę odczynnika.
- Obok kropli odczynnika nanieść 25 µl nieprzemitych krwinek. Zwrócić uwagę, aby obie krople nie wchodziły w kontakt między sobą.
- Czystą bagietką wymieszać odczynnik i krew rozprowadzając je po polu o średnicy 2 do 3 cm.
- Inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 sekund, bez mieszania.
- Wykonując powoli okrężne ruchy szkiełkiem lub jednorazową płytą w czasie 3 minut, obserwować makroskopowo pojawianie się aglutynatów.
- Natychmiast odczytać wynik testu.

### b) Bezpośrednia metoda probówkowa w temperaturze pokojowej (18 – 25°C) - nie dotyczy ANTY-D (RH1) IgG

- Przygotować 5% zawiesinę badanych krwinek czerwonych w izotonicznym roztworze soli.
- Używając zakraplacza wprowadzić 1 kroplę odczynnika do probówki.
- Dodać 50 µl zawiesiny krwinek czerwonych.
- Delikatnie wstrząsając probówką doprowadzić do powstania jednorodnej zawiesiny i następnie wirować 1 minutę przy 500 g.
- Delikatnie wstrząsnąć probówką w celu rozbicia osadu krwinek. Obserwować makroskopowo pojawienie się jakiegokolwiek aglutynacji.

### c) Pośredni test antyglobulinowy - tylko dla ANTY-D (RH1) TOTEM

- W przypadku, gdy reakcja jest słaba lub wynik jest ujemny, wstrząsnąć probówką i inkubować w temperaturze 37°C przez 15 minut.
- Przemyć krwinki czerwone 2 razy w izotonicznym roztworze soli i odrzucić płyn z ostatniego mycia.
- Dodać 50 µl odczynnika antyglobulinowego AGH MAESTRIA IGG do krwinek czerwonych. Wymieszać, następnie odwirować przy 120g przez 1 minutę.
- Delikatnie wstrząsnąć probówką w celu rozbicia osadu krwinek. Obserwować makroskopowo pojawienie się jakiegokolwiek aglutynacji.

### d) Pośredni test antyglobulinowy - tylko dla ANTY-D (RH1) IgG

- Przygotować 5% zawiesinę badanych krwinek czerwonych w izotonicznym roztworze soli.
- Używając zakraplacza wprowadzić 1 kroplę odczynnika do probówki.
- Dodać 50 µl zawiesiny krwinek czerwonych.
- Delikatnie wstrząsając probówką doprowadzić do powstania jednorodnej zawiesiny i inkubować w temperaturze 37°C przez 15 minut.
- Przemyć krwinki czerwone 2 razy w izotonicznym roztworze soli i odrzucić płyn z ostatniego mycia.
- Dodać 50 µl odczynnika antyglobulinowego AGH MAESTRIA IGG do krwinek czerwonych. Wymieszać, następnie odwirować przy 120g przez 1 minutę.
- Delikatnie wstrząsnąć probówką w celu rozbicia osadu krwinek. Obserwować makroskopowo pojawienie się jakiegokolwiek aglutynacji.

## INTERPRETACJA WYNIKÓW TESTU

- Jeśli występuje aglutynacja (krwinki czerwone wyodrębniają się jako jedna lub więcej grudek), to wynik reakcji jest dodatni i antygen odpowiadający użytemu odczynnikowi jest obecny na badanych krwinkach czerwonych.
- Jeśli aglutynacja nie występuje (zawiesina jest jednorodna), to wynik reakcji jest ujemny i antygen odpowiadający użytemu odczynnikowi nie występuje na badanych krwinkach czerwonych.
- Grupę krwi z układu AB0 można jednoznacznie określić tylko wtedy, jeśli występuje zgodność między wynikami testu z badanymi krwinkami i wynikami testu z badanym osoczem. W przypadku rozbieżności, pomocne przy wydawaniu wyniku i ustalaniu przyczyn anomalii może być „Auto” kontrola, „Allo” kontrola lub kontrola „odczynnika”.
- „Auto” kontrola – w tych samych warunkach testuje się osocze obok własnych krwinek czerwonych.
- „Allo” kontrola – w tych samych warunkach testuje się osocze obok panela znanych krwinek czerwonych grupy 0 (wykrycie przeciwciał anti-erytrocytowych innych niż anti-A lub anti-B).
- Kontrola „odczynnika” – w tych samych warunkach testuje się krwinki czerwone obok kontroli ujemnej.
- Antygen D jest obecny wówczas, gdy występuje aglutynacja z ANTY-D (RH1) IgM lub ANTY-D (RH1) TOTEM metodą bezpośredniej hemaglutynacji na szkiełku lub w probówce. Jeśli aglutynacji się nie obserwuje, co może mieć miejsce w przypadku słabego lub częściowego antygenu D, to wówczas należy zastosować odczynniki ANTY-D (RH1) TOTEM lub ANTY-D (RH1) IgG w pośrednim teście antyglobulinowym.
- Wynik ujemny w pośrednim teście antyglobulinowym powinien być potwierdzony reakcją z krwinkami czerwonymi uczulonymi IgG.
- Wynik reakcji jest interpretowalny wtedy, gdy:
  - kontrola odczynnika z użyciem kontroli ujemnej NEG CONTROL daje wynik ujemny,
  - system analityczny jest zwalidowany przy użyciu próbek o znanych fenotypach.
- Bezpośredni test antyglobulinowy wykonany na krwinkach czerwonych daje wynik ujemny.

## OGRANICZENIA METODY

- Oznaczenia powinny być wykonywane tylko przez wykwalifikowany personel.
- Należy używać tylko kalibrowanych zakraplaczy, które są dostarczane przez producenta w zestawie.
- Wynik reakcji musi być interpretowany natychmiast po wirowaniu i rozbiciu osadu krwinek.
- Należy stosować czysty sprzęt i nie zanieczyszczony (bakteriologicznie lub w inny sposób) produkty.
- Należy przestrzegać:
  - warunków przechowywania i dat ważności,
  - procedur wykonania,
  - kalibracji używanego sprzętu.

- Słabe fenotypy A i/lub B mogą być niewykryte metodą szkiełkową, ponieważ jest to metoda mniej czuła niż metoda probówkowa. W konsekwencji, w przypadku rozbieżności między testem krwinkowym i testem osocza i w przypadku obecności słabego fenotypu, należy powtórzyć oznaczenie bardziej czułą metodą.
- W pośrednim teście antyglobulinowym należy stosować odczynnik AGH MAESTRIA IGG.
- Należy stosować NEG CONTROL jako kontrolę ujemną.
- Nie wolno stosować ANTY-D (RH1) metodą manualną, która pociąga za sobą enzymatyczną obróbkę krwinek czerwonych.
- Odczynnik ANTY-D (RH1) IgM nie może być stosowany w pośrednim teście antyglobulinowym.
- W przypadku stosowania ANTY-D (RH1) TOTEM często mogą pojawiać się rozbieżności w wynikach bezpośredniej metody hemaglutynacji i wynikach pośredniego testu antyglobulinowego. Może to być spowodowane obecnością słabego i/lub częściowego antygeny D.
- Fałszywie dodatnie reakcje mogą pojawić się w przypadku:
  - gdy stosowana jest metoda bezpośredniej hemaglutynacji, a badana próbka zawiera zimne aglutyny,
  - gdy stosowany jest pośredni test antyglobulinowy, a badane krwinki czerwone aglutynują w bezpośrednim teście antyglobulinowym.

Te możliwości wyznaczają racjonalne przesłanki dla jednoczesnego użycia kontroli NEG CONTROL.

## CHARAKTERYSTYKA WYKONANIA

- Dla zalecanych metod odczynnik spełniają wymagania Common Technical Specifications dla wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
- Ocenę odczynników ANTY-A (AB01), ANTY-B (AB02), ANTY-A,B (AB03) przeprowadzono na 15 000 próbek (dawcy krwi, pacjenci, noworodki) pobranych na zalecane antykoagulanty (EDTA, heparyna, cytynian). Badania wykazały 100% swoistość dla każdego odczynnika w odniesieniu do znanych fenotypów A1, A2, A1B, A2B, B i 0. Testy przeprowadzone na krwinkach czerwonych ze słabym fenotypem AB0 wykazały dobrą swoistość w odniesieniu do fenotypów A3 i B3.
- Odczynnik ANTY-A,B (AB03) rozpoznaje na krwinkach czerwonych słaby fenotyp Ax.
- Odczynnik ANTY-B (AB02) nie aglutynuje z „nabytym B” obecnym na krwinkach czerwonych.
- W wielu przypadkach (transfuzje, słabe fenotypy A lub B (A3, B3, ..... ), przypadki modyfikacji hemopatologicznych, zjawisko mozaikowe himeryzm, itp.) można obserwować obecność dwóch populacji.
- Przeciwciała anti-A, dodatkowo, przeciwciała anti-A,B mogą dawać reakcje krzyżowe z antygenem Tn, które objawiają się mieszaną aglutynacją (zjawisko występujące sporadycznie).
- Ocena odczynników ANTY-D (RH1) IgM I, IgM II, IgG, TOTEM i ANTY-DCE (RH1,2,3) przeprowadzono na panelu 1000 próbek z 200 000 próbek (pochodzących od dawców krwi, pacjentów i noworodków) pobranych na zalecane antykoagulanty (EDTA, heparyna, cytynian). Badania wykazały 100% swoistość dla każdego odczynnika w odniesieniu do znanych fenotypów RH.
- Intensywność reakcji w przypadku użycia odczynnika ANTY-D (RH1) IgM zależy od liczby miejsc antygenów obecnych na krwinkach czerwonych.
- Odczynniki ANTY-D (RH1) TOTEM i ANTY-D (RH1) IgG umożliwiają skryning słabego antygeny D (RH1) w pośrednim teście antyglobulinowym.
- Testy przeprowadzane na złożonych fenotypach nie gwarantują rozpoznania wszystkich słabych lub zróżnicowanych antygenów z powodu ich dużej różnorodności.
- Odczynniki ANTY-D (RH1) IgM I i TOTEM posiadają specjalne właściwości rozpoznawania rzadkich antygenów typu RH33 (DHar) i mogą zakłócać reakcje z odczynnikami poliklonalnymi i rozpoznać je wszystkie w małym stopniu lub nie rozpoznać w ogóle.
- Jedynie odczynnik ANTY-D (RH1) TOTEM może wykryć częściowe DVI metodą hemaglutynacji bezpośredniej w teście probówkowym.
- Zastosowane w odczynniku ANTY-D klony swoicie rozpoznają epitopy antygeny D (tabela na ostatniej stronie tej ulotki).
- W celu identyfikacji częściowego D zaleca się używać D-SCREEN.

## LITERATURA

- BETREMIEUX C., BEOLET M., KEYSER L.  
A new strategy for D phenotyping with TOTEM® multimonoclonal ANTI-D reagent, XXIII rd I.S.B.T. Congress, July 1994.
- ARAMBURU E., RABASA P., ESQUIROZ R., GALARRETA T., OLCOZ B.  
Valoracion de un antisuero anti-D IgM-IgG monoclonal (DIAGAST) en donantes de sangre con expresividad debil del antígeno D. Hematology Congress, Madrid, October 1990.
- MANNESIER L. Blood Transfusion Centre, Lille, France. The use of monoclonal antibodies as blood grouping reagents: applications, advantages and problems. Congress of the Italian society for blood transfusion, Rome, June 1992.

Odczynnik		Nr kat.	Klon	Klasa	Pochodzenie
ANTI-A (ABO1)	5 x 10 ml	70501	9113D10	IgM	Mysie
	100 x 10 ml	70540			
ANTI-B (ABO2)	5 x 10 ml	70502	9621A8	IgM	Mysie
	100 x 10 ml	70541			
ANTI-A,B (ABO3)	5 x 10 ml	70503	9113D10 + 152D12	IgM	Mysie
	100 x 10 ml	70542			
ANTI-D (RH1) IgM I	5 x 10 ml	71000	P3X61	IgM	Ludzkie
	100 x 10 ml	70543			
ANTI-D (RH1) IgM II	5 x 10 ml	71005	HM10	IgM	Ludzkie
ANTI-D (RH1) TOTEM	5 x 10 ml	71010	P3X61 + P3X21223B10 + P3X290 + P3X35	IgM IgM IgG IgG	Ludzkie
	100 x 10 ml	70544			
ANTI-D (RH1) IgG	5 x 10 ml	71020	HM16	IgG	Ludzkie
ANTI-DCE (RH1,2,3)	5 x 5 ml	74111	P3X61 + P3X25513G8 + P3X234	IgM	Ludzkie
NEG CONTROL	5 x 10 ml	79000			
	100 x 10 ml	70545			

Klon	Klasa	DII	DIIIa DIIIb DIIIc	DIVa	DIVb	DVa	DVI	DVII	DFR	DBT	DHAR	DHMI
P3x61	IgM	+	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	+
HM10	IgM	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
HM16	IgG	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
P3x21223B10	IgM	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
P3x290	IgG	+	+	+/-	-	+	+/-	+	+	-	-	+
P3x35	IgG	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+

+ wynik dodatni; stopień aglutynacji zależy od ilości antygenów obecnych na badanych krwinkach czerwonych  
+/- wynik dodatni lub ujemny

## HISTORIA ZMIAN

Opis zmian	Wpływ na weryfikację metoda zgodna z normą NF EN ISO 15189
- § „HISTORIA ZMIAN” : Dodano - § „CHARAKTERYSTYKA WYKONANIA” : W wersji hiszpańskiej poprawiono termin „hemaglutynacja pośrednia” na „hemaglutynacja bezpośrednia” odnośnie wykrywania DVI.	Nie








 **DIAGAST** 251, AV. AVINEE - 59120 LOOS – FRANCE



www.diagast.com  
key-code : DIA00105

Zaktualizowany: maj 2021 r.

	Pour obtenir les notices dans la langue de votre choix : For Instructions For Use in your language : Para las instrucciones de uso en su idioma : Para Instruções de Uso na sua língua : Per le istruzioni di uso nella sua lingua : Für Gebrauchsanleitungen in Ihrer Sprache : För bruksanviningar pa ditt eget språk : For brugsanvisninger pa dit sprog :		
<b>http://</b>	www.diagast.com		
 <b>For Euro- pean Union</b>	 Free	België - Belgique - България - Česká Republika - Danmark - Deutschland - Eesti - España - France - Ireland - Italia - Кyпpос - Latvija - Luxembourg – Magyarország - Nederland - Norge - Österreich - Polska - Portugal - Schweiz - Suisse - Suomi - Slovenija - Sverige - United Kingdom	+800 135 79 135
	 Free	Ελλάδα	00800 161 2205 7799
	 Free	Ísland	800 8996
	 Free	Lietuva	8800 30728
	 Free	România	0800 895 084
	 Free	Slovensko	0800 606 287
	 Not free	Liechtenstein	+31 20 796 5692
 Not free	Malta	+31 20 796 5693	