

 CE-Immundiagnostika GmbH Karl-Landsteiner-Str. 6, D-69151 Neckargemünd Phone: +49 6223-80094 00 Telefax: +49 6223-80094 99 www.ce-immundiagnostika.com		
Návod k použití		
Rev. 002/07-2021		
Description		REF
Anti-A A-11H5 (monoclonal) 10 ml		01110
Anti-A BIRMA1 (monoclonal) 10 ml		01210
Anti-B B-6F9 (monoclonal) 10 ml		02110
Anti-B LB2 (monoclonal) 10ml		02210
Anti-AB A-5E10-B-2D7 (monoclonal) 10 ml		03110

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

SHRNUTÍ

V roce 1900 Karl Landsteiner objevil, že sérum některých jedinců aglutinuje erythrocyty jiných. Byly rozpoznány čtyři různé fenotypy krevních skupin: 0, A, B a AB. Od té doby byly ještě identifikovány podskupiny A a B.

Procento krevních skupin AB0 u bělochů

Antigen		Protilátky				AB0 Fenotyp	Kavkazská populace %
A	B	A ₁	A ₂	B	0		
+	0	0	0	+	0	A	42
0	+	+	+	0	0	B	10
0	0	+	+	+	0	0	44
+	+	0	0	0	0	AB	4

Table 1: Frekvence antigenů

URČENÉ POUŽITÍ

Anti-A, anti-B a anti-AB monoklonální myši IgM protilátky jsou určeny pro specifickou a kvalitativní detekci erythrocytů, které nesou odpovídající antigen AB0, a jsou vhodné pro použití technikou sklíčka, bodové destičky, mikrodestičky a zkumavky.

Výše uvedené techniky jsou založeny na principu přímé hemaglutinace. Po přidání erythrocytů k testovacím činidlům dojde ke specifické reakci antigen-protilátka, pokud je na erythrocytech přítomen odpovídající antigen. Tato reakce se projeví snadno viditelnou aglutinací erythrocytů. Absence aglutinace erythrocytů prokazuje - s ohledem na omezení testovacích metod - nepřítomnost příslušných antigenů (negativní výsledek testu).

Produkty anti-A A-11H5 a antiAB A-5E10-B-2D7 jsou vhodné k aglutinaci, a tedy k identifikaci A_x.

INFORMACE O PRODUKTU

Monoklonální protilátky používané ke stanovení krevních skupin A, B a 0 jsou IgM izotypu a jsou získávány z myších hybridomových buněk.

Protilátky se ředí v pufru obsahujícím 0,9% chlorid sodný, hovězí albumin (bez stabilizátoru), EDTA a činidla usnadňující resuspendaci krvinek po odstředění. Konzervační látka: <0,1% azid sodný.

Testovací séra anti-A a anti-B jsou pro snadnou identifikaci obarvena modře, resp. žlutě.

Tato antiséra byla optimalizována pro použití bez dalšího ředění nebo přidávání aditiv.

Číslo šarže a datum použitelnosti jsou uvedeny na štítku lahvičky.

SKLADOVÁNÍ

Testovací činidla skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C do data použitelnosti uvedeného na štítku výrobku. Po prvním otevření přípravku jej opět těsně uzavřete a skladujte při teplotě 2°C-8°C.

ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Vzorky krve pro stanovení krevní skupiny AB0 by měly být odebírány asepticky do zkumavek s EDTA nebo citrátem. Vzorek by měl být testován co nejdříve po odběru. Pokud dojde ke zpoždění testování, uchovávejte vzorek při teplotě 2°C-8 °C. Vzorky vykazující hemolýzu nebo mikrobiální kontaminaci by neměly být tímto činidlem testovány, protože to může vést k falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům.

Všechny vzorky krve by měly být před testováním ve zkumavce, na bodové destičce nebo na mikrotitračních destičkách dvakrát promyty 0,9% roztokem NaCl. Při použití sklíčkové techniky připravte 35-45% suspenzi testovaných erythrocytů (plnou krev); při použití techniky bodové destičky použijte buď plnou krev, nebo připravte 10% suspenzi testovaných erythrocytů v 9% roztoku NaClO.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Tato činidla jsou určena pouze pro použití v diagnostických laboratořích in vitro.
2. Tato činidla jsou určena pro použití autorizovanými pracovníky vyškolenými v sérologických technikách.
3. Tato činidla nejsou určena k vlastní aplikaci.
4. Nepoužívejte tato činidla po uplynutí doby použitelnosti.
5. Obsah poškozených lahviček zlikvidujte.
6. Činidla byla filtrována přes membránovou kapsli o průměru 2 µm, aby se snížila biologická zátěž.
7. Po otevření lahvičky by měl obsah zůstat funkční až do data expirace. Pokud se po otevření objeví zákal nebo kontaminace, obsah zlikvidujte.
8. Společnost CE-Immundiagnostika GmbH nemůže zaručit, že produkty pocházející z lidských nebo zvířecích zdrojů neobsahují infekční agens. Při používání a likvidaci každé lahvičky a jejího obsahu je třeba postupovat opatrně.
9. Při používání těchto výrobků noste ochranný oděv, například plášť a jednorázové rukavice.

LIKVIDACE ČINIDLA A ODSTRAŇOVÁNÍ ROZLITÝCH LÁTEK.

Informace o likvidaci činidla a dekontaminaci místa rozlití naleznete v bezpečnostním listu, který je k dispozici na vyžádání u společnosti CE-Immundiagnostika GmbH.

KONTROLY A PORADENSTVÍ

1. Pozitivní a negativní kontrolní erythrocyty se testují souběžně s každou šarží testů. Pokud kontroly nevykazují očekávané reakce, musí být testy považovány za neplatné.
2. Protože tato činidla neobsahují makromolekulární potenciátory, je velmi nepravděpodobné, že by u buněk potažených IgG docházelo k falešně pozitivním nebo falešně negativním reakcím.
3. Slabé antigeny (A_x nebo B_{weak}) nemusí být identifikovány. Nejednoznačné výsledky je vhodné znovu otestovat zkumavkovou technikou.
4. Jeden objem je přibližně 35-45 µl při použití dodaného kapátka.
5. Odečítání a interpretaci výsledků musí provádět řádně vyškolený a kvalifikovaný personál v souladu s požadavky země, kde se činidla používají.



Návod k použití

Rev. 002/07-2021

Anti-A, Anti-AB, Anti-B

6. Tato činidla by se měla používat pouze podle tohoto návodu k použití.

POTŘEBNÝ MATERIÁL A ČINIDLA

- 0,9% roztok NaCl
- Skleněné zkumavky
- Držák zkumavky
- Odstředivka na zkumavky
- Odměrné pipety
- Mikrotitrační destičky, třepačka na destičky
- Bodová deska
- Skleněné mikroskopické sklíčko
- Aplikační tyčinka
- Pozitivní a negativní kontrolní erytrocyty
- Chronometr

RECOMMENDED TECHNIQUES

DOPORUČENÉ TECHNIKY

A. ZKUMAVKOVÁ TECHNIKA

1. Připravte 2-4 % suspenzi erytrocytů v 0,9% roztoku NaCl.
2. Do označené zkumavky nakapejte 1 objem antiséra a 1 objem testovací suspenze testovaných erytrocytů.
3. Důkladně promíchejte a ihned odstředte při 400 g po dobu 1 minuty (při 1500 otáčkách za minutu nebo při vhodném jiném čase a síle).
4. Ihned si přečtěte výsledek: Výsledek: Jemně promíchejte zkumavku, aby se peleta erytrocytů uvolnila ze dna zkumavky, a makroskopicky odečtěte aglutinaci; výsledek zaznamenejte.

B. TECHNIKA MIKROTITRAČNÍCH DESTIČEK

Příprava mikrodestiček:

Mikrodestičky různých výrobců/dodavatelů mají různé statické vlastnosti, které mohou vést k nespecifickým reakcím červených krvinek a proteinů. Před použitím je vhodné nepoužité mikrodestičky předem ošetřit, aby se snížilo hromadění červených krvinek na minimum. Doporučujeme používat jamky tvaru "U" z plastového materiálu.

1. Do příslušných jamek umístěte 1 objem 22% hovězího albuminu (BSA).
2. Důkladně promíchejte nebo použijte třepačku mikrotitračních destiček, abyste zajistili rovnoměrné pokrytí jamek.
3. Inkubujte při pokojové teplotě (18-25 °C) po dobu ne kratší než 10, ne delší než 15 minut.
4. Obsah jamek s BSA vyhoďte do vhodné nádoby na odpad.
5. Mikrotitrační destičku propláchněte minimálně 10x vodou z vodovodu.
6. Poté mikrodestičku dvakrát opláchněte destilovanou nebo deionizovanou vodou.
7. Nakloňte mikrotitrační destičku, abyste z ní odstranili přebytečnou vodu.
8. Před použitím nechte mikrodestičku zaschnout.

Alternativní techniky lze použít za předpokladu, že byly ověřeny uživatelem.

Postup:

1. Připravte 2 - 4% suspenzi testovaných erytrocytů v 0,9% roztoku NaCl0. (Doporučení: 2% suspenze)
2. Pomocí kapátka nakapejte 30 µl příslušného antiséra do označených jamek mikrotitrační destičky.

3. Přidejte 30 µl předem připravené suspenze testovaných erytrocytů.
4. Míchejte 30 sekund ručně nebo pomocí třepačky.
5. Odstředěte mikrodestičku 1 minutu při 400 g (při 1500 otáčkách za minutu nebo při vhodném jiném čase a síle).
6. V případě potřeby krátce promíchejte mikrodestičku pomocí třepačky.

Zaznamenejte výsledek a intenzitu reakce a testujte paralelně pozitivní a negativní kontrolní erytrocyty. Čtecí zařízení, pokud jsou použita, musí být validována. Použití dalších vizuálních pomůcek, jako jsou například zrcadla nebo lupy, může usnadnit odečítání výsledků.

C. SKLÍČKOVÁ TECHNIKA

1. Z plné krve připravte 35-45% suspenzi testovaných erytrocytů.
2. Na sklíčko nakapejte 1 objem antiséra a jeden objem plné krve.
3. Pomocí čisté aplikační tyčinky důkladně promíchejte oba objemy na ploše asi 20x40 mm.
4. Pomalu pohybujte sklíčkem dopředu a dozadu.
5. Nejpozději po 2 minutách proveďte makroskopický odečet a záznam.

Nesprávná manipulace nebo příliš dlouhá doba inkubace může vést k artefaktům způsobeným vysycháním a test musí být považován za neplatný

D. TECHNIKA BODOVÝCH DESTIČEK

1. Z plné krve připravte 35-45% suspenzi testovaných erytrocytů nebo 10% suspenzi testovaných erytrocytů v 0,9% roztoku NaCl.
2. Na bodovou destičku nakapejte 1 objem antiséra + 1 objem suspenze testovaných erytrocytů.
3. Pomocí čisté aplikační tyčinky důkladně promíchejte oba objemy.
4. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5-10 minut.
5. Makroskopicky odečtěte a zaznamenejte.

Nesprávná manipulace nebo příliš dlouhá doba inkubace může vést k artefaktům způsobeným vysycháním.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTŮ

1. **Pozitivní:** Aglutinace testovaných erytrocytů ukazuje v rámci přijatých omezení testovacího postupu (viz níže) na přítomnost příslušného antigenu AB0 na testovaných erytrocytech.
2. **Negativní:** Neexistence aglutinace testovaných erytrocytů znamená v rámci přijatých omezení testovacího postupu (viz níže) nepřítomnost příslušného antigenu AB0 na testovaných erytrocytech.

Nesrovnalosti: Pokud výsledky získané pro antigeny na testovaných erytrocytech nekorelují se zjištěnými aloprotilátkami krevních skupin, je nutné provést další vyšetření.

OMEZENÍ

1. Antigeny AB nejsou při narození plně vyvinuty, a proto se mohou objevit slabší reakce u vzorků z pupečníku nebo novorozenců.
2. Při použití monoklonálních protilátek mohou vzorky krve slabých podskupin A nebo B při testování na sklíčkách nebo mikrotitračních destičkách vyvolat falešně negativní nebo slabé reakce. Doporučuje se znovu otestovat slabé podskupiny pomocí zkumavkové techniky.
3. Skladovaná krev může vyvolat slabší reakce než čerstvá krev.
4. Falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky se mohou vyskytnout také v důsledku:
 - Kontaminace zkušebních materiálů
 - Nesprávné skladování, koncentrace erytrocytů, doba inkubace nebo teplota

Návod k použití

Rev. 002/07-2021

Anti-A, Anti-AB, Anti-B

- Nesprávné nebo nadměrné odstředování
 - Odchylky od doporučených technik
5. Při použití techniky bodových destiček se vzorky plné krve může občas dojet k tvorbě rouleaux, která se podobá slabé aglutinaci a může být interpretována jako falešně pozitivní reakce. Tento jev je způsoben neimunologickými příčinami. Tvorbu rouleaux lze očekávat u krve s heparinem a u pacientů léčených expandéry plazmy (např. dextranem), jakož i u pacientů s plazmocytomem (vysoký obsah bílkovin, změněné složení bílkovin), onkologickými poruchami (abnormální hemogram) a poruchou koagulace. Vzorky krve těchto pacientů musí být vždy vyšetřeny zkumavkovou technikou, protože při použití suspenze erytrocytů nelze tento jev obecně ověřit. Přítomnost slabých antigenů (A_3 , A_x , B_{weak}) by měla být prokázána z důvodu větší citlivosti zkumavkovou technikou, případně po 30 minutách inkubace. Neobvykle slabé reakce nebo žádná reakce mohou být případně způsobeny přítomností podskupin A a B. Krevní vzorky od pacientů trpících určitými chorobami mohou vykazovat falešně pozitivní/ falešně negativní reakce. Vzorky pupečnickové krve kontaminované Whartonovým želem mohou vykazovat falešně pozitivní reakce. S monoklonálními myšími činidly nepoužívejte nepřímý Coombsův test (ICT) s antiglobulinovými séry (AHG). Reaktivní autoaglutininy jsou často potenciálním zdrojem chyb při typizaci krve AB0. Přítomnost těchto protilátek je nepředvídatelná. Dostatečně velké množství těchto protilátek může způsobit nespecifické reakce při průkazu izoaglutininů s krvinkami A-(1) a B a také nespecifické reakce s testovacími séry anti-A, anti-B a antiAB, pokud jsou testovány nepromyté krvinky nebo vzorky suspendované v séru nebo vzorky plazmy. Testy AB0 a izoaglutininů jsou proto pro stanovení krevní skupiny nepostradatelné. Jakékoli nesrovnalosti mezi testy AB0 a izoaglutininu vyžadují další vyšetřování bez ohledu na sílu reakce v séru nebo krvinkách pacienta. Nepoužívejte monoklonální činidla připravená z myších hybridomových buněk které jsou určeny pro přímé antiglobulinové testy, v kombinaci s činidly AHG.
6. Pro stanovení antigenů AB0 a Rh použijte vždy dva různé klony.

STABILITA REAKCÍ

1. Všechny testy ve zkumavkách a na mikrotitračních destičkách odečítejte ihned po odstředění.
2. Testy na sklíčku by měly být interpretovány do 2 minut, aby byla zajištěna specifčnost a aby se zabránilo možnosti, že negativní výsledek bude nesprávně interpretován jako pozitivní v důsledku zaschnutí činidla.
3. Zkoušky je třeba považovat za neplatné, pokud byly provedeny při jiných než doporučených teplotách.

SPECIFICKÉ VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

Výkonnost se posuzuje v souladu se společnými technickými specifikacemi (CTS: rozhodnutí Komise EU 03/02/2009).

1. Činidla byla testována všemi doporučenými postupy.
2. Každá šarže je testována v souladu s požadavky společných technických specifikací pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro* a splňuje požadavky.
3. Specifčnost monoklonálních protilátek je prokázána pomocí panelu antigen-negativních erytrocytů.
4. Kontrola kvality činidel byla provedena s použitím erytrocytů nebo plné krve, která byla dvakrát promyta 0.9% fyziologickým roztokem.
5. Testy s více než 1,000 vzorky s citlivostí a specifčností > 99 %.

VYLOUČENÍ ODPOVĚDNOSTI

1. Uživatel je odpovědný za použití jiných než doporučených metod.
2. Jakékoli odchylky od doporučených technik by měly být před použitím validovány.

BIBLIOGRAFIE

1. Kohler C. & Milstein C. (1975), Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256, 495-497.
2. 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.
3. Human Blood Groups, by Geoff Daniels, 1st Ed., Blackwell Science, Oxford 1995.
4. HMSO, Guidelines for Blood Transfusion Services., 2nd Ed., 1994.

INDEX SYMBOLŮ

	Číslo šarže		Pouze pro diagnostiku <i>in vitro</i>
	Katalogové číslo		Skladování mezi +2°C až +8°C
	Datum expirace		Výrobce
	Přečtěte si návod k použití		

KATALOGOVÁ ČÍSLA

REF	Produkt	Balení
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

Distributor:

EXBIO Olomouc s.r.o.
Ovesná 14, 779 00 Olomouc
Česká republika
Tel.: +420 587 301 011
E-mail: info@exbio.com
www.exbio.com

