

# Instructions for use



Sanquin Reagents B.V.  
Plesmanlaan 125  
1066 CX Amsterdam  
The Netherlands

Phone: +31 20 5123599  
Fax: +31 20 5123570  
Reagents@sanquin.nl  
www.sanquin.org/reagents

**Pelikloon anti-D mix (IgG/IgM) monoclonal**

**REF K 1157**

**IVD C E 0344**

006\_v02 01/2017 (el)

*Μόνο για επαγγελματική χρήση*

Αντιδραστήριο ομάδων αίματος για την ανίχνευση του αντιγόνου D σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα

## Γενικές πληροφορίες

Το αντιδραστήριο Pelikloon anti-D mix (IgG/IgM) monoclonal ομάδων αίματος (οι αριθμοί κλώνου αναφέρονται στο αντίστοιχο πιστοποιητικό ανάλυσης/έντυπο κυκλοφορίας και την ετικέτα του προϊόντος) προετοιμάζεται από το υπερκείμενο καλλιεργειών από σταθερές κυτταρικές σειρές υβριδιδώματος, όπως περιγράφεται για πρώτη φορά από τους Kohler και Milstein (Nature 1975). Αυτό το μονοκλωνικό αντιδραστήριο περιέχει ανθρώπινα IgG/IgM αντισώματα που έχουν επιλεγεί και έχουν αναπτυχθεί ειδικά ώστε να παρέχουν μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση έναντι των πολυκλωνικών αντιδραστηρίων. Το αντιδραστήριο αυτό ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των σχετικών προτύπων και οδηγιών. Τα χαρακτηριστικά επιδόσεων αναφέρονται στα έντυπα κυκλοφορίας, τα οποία παρέχονται με το προϊόν εφόσον ζητηθούν. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι η τεχνική συγκόλλησης, η οποία βασίζεται στην αντίδραση αντιγόνου/αντισώματος. Το αντιδραστήριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε με τη μέθοδο του σωλήνα φυγοκέντρωσης, της μικροπλάκας ή της αντικειμενοφόρου πλάκας. Αυτό το αντιδραστήριο ανιχνεύει όλα τα φυσιολογικά αντιγόνα D και τα περισσότερα ασθενή αντιγόνα D. Η παραλλαγή D κατηγορίας VI ανιχνεύεται μόνο με την εξέταση σε δοκιμαστικό σωλήνα μετά από προσθήκη πολυειδικού αντι-ανθρώπινου ορού. Η ευαισθησία της μεθόδου αντικειμενοφόρου πλάκας είναι κατώτερη από αυτή της μεθόδου του σωλήνα φυγοκέντρωσης και της μικροπλάκας. Γι' αυτό, μερικά δείγματα με ασθενή D δεν τυποποιούνται ως Rhesus D θετικά όταν χρησιμοποιείται αυτή η μέθοδος, ενώ τυποποιούνται ως θετικά όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος του σωλήνα φυγοκέντρωσης ή η μέθοδος μικροπλάκας. Συνιστάται να συμπεριλαμβάνονται θετικοί ή αρνητικοί μάρτυρες σε κάθε σειρά προσδιορισμών ομάδων αίματος.

## Προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση μόνον. Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8 °C. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται φιαλίδια με διαρροή ή κατεστραμμένα. Τα αντιδραστήρια (είτε έχουν ανοιχτεί ή είτε όχι) δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά την ημερομηνία λήξης, η οποία είναι τυπωμένη στην ετικέτα του φιαλιδίου. NaN<sub>3</sub> 0,1% (w/v) χρησιμοποιείται ως συντηρητικό. Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να θεωρούνται ότι είναι ελεύθερα λομογόνων παραγόντων. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση και απόρριψη καθενός δοχείου και του περιεχομένου του. Η θολότητα ενδέχεται να υποδεικνύει μικροβιακή μόλυνση. Για να αναγνωρίσετε υποβάθμιση του αντιδραστηρίου, συνιστάται ο έλεγχος του αντιδραστηρίου ως μέρος του προγράμματος ποιοτικού ελέγχου χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους μάρτυρες. Η απόρριψη των λυμάτων, μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου, πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με τους εργαστηριακούς κανονισμούς.

## Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Οι αιμοληψίες πρέπει να διεξάγονται απηπτικά με ή χωρίς την προσθήκη αντιπηκτικών παραγόντων. Αν ο έλεγχος των δειγμάτων αίματος καθυστερεί, πρέπει να αποθηκεύονται στους 2-8 °C. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιγράφεται στις διαδικασίες των αντίστοιχων ελέγχων.

## Διαδικασία δοκιμής

### Μέθοδος σωλήνα φυγοκέντρωσης

Απαιτήσεις σωλήνα: γυάλινοι σωλήνες με στρογγυλεμένο πυθμένα, μεγέθους 75 x 10/12 mm.

1. Προετοιμάστε αιώρημα 3-5% των υπό έλεγχο ερυθροκυττάρων σε ισοτονικό διάλυμα φυσιολογικού ορού ή στο ίδιο τους το πλάσμα ή τον ορό του αίματος.
2. Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, προσθέστε:
  - 1 σταγόνα αντιδραστηρίου Pelikloon
  - 1 σταγόνα του αιωρήματος ερυθροκυττάρων 3-5% και αναμίξτε καλά.
3. Φυγοκεντρώστε επί 20 δευτερόλεπτα στις 1000 rcf ή επί χρονικό διάστημα κατάλληλο με τη βαθμονόμηση της φυγοκέντρου.
4. Αιωρήστε και πάλι τα κύτταρα με ελαφρά ανακίνηση και επιθεωρήστε μακροσκοπικά για συγκόλληση.

Εάν δεν υπάρχει ορατή συγκόλληση η εξέταση πρέπει να συνεχιστεί όπως παρακάτω:

5. Αναμίξτε καλά και επώαστε τους σωλήνες σε υδατόλουτρο για 15-20 λεπτά στους 37 °C.
6. Ξεπλύνετε τα κύτταρα μια φορά σε άφθονο ισοτονικό φυσιολογικό ορό. Στραγγίξτε εντελώς (ένα ξέπλυμα είναι αρκετό. Δεν υπάρχει μειονέκτημα αν ξεπλύνετε 3-4 φορές όπως με τις συμβατικές εξετάσεις).
7. Προσθέστε 2 σταγόνες πολυειδικού αντι-ανθρώπινου ορού και αναμίξτε καλά.
8. Φυγοκεντρώστε επί 20 δευτερόλεπτα στις 1000 rcf ή επί χρονικό διάστημα κατάλληλο με τη βαθμονόμηση της φυγοκέντρου.
9. Αιωρήστε και πάλι τα κύτταρα με ελαφρά ανακίνηση και επιθεωρήστε μακροσκοπικά για συγκόλληση.
10. Αν δεν υπάρχει ορατή συγκόλληση προσθέστε 1 σταγόνα Coombs Control Cells και επαναλάβετε τα βήματα 8 και 9. Η αντίδραση τώρα πρέπει να είναι θετική. Αν η εξέταση παραμένει αρνητική το αποτέλεσμα είναι άκυρο και η εξέταση πρέπει να επαναληφθεί.

### Μέθοδος μικροπλάκας

Απαιτήσεις μικροπλάκας: μικροπλάκες από πολυστυρένιο με πηγαδάκια με στρογγυλεμένους πυθμένες.

1. Προετοιμάστε αιώρημα 2-3% των υπό έλεγχο ερυθροκυττάρων σε ισοτονικό διάλυμα φυσιολογικού ορού ή στο ίδιο τους το πλάσμα ή τον ορό του αίματος.

2. Στο πηγαδάκι προσθέστε:
  - 1 σταγόνα αντιδραστήριου Pelikloon
  - 1 σταγόνα του αιωρήματος ερυθροκυττάρων 2-3%
3. Αναμίξτε το περιεχόμενο καλά επί 5 δευτερόλεπτα χρησιμοποιώντας περιστροφικό αναδευτή στις 600-700 σ.α.λ.
4. Επωάστε επί 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) χωρίς ανάδευση.
5. Φυγοκεντρήστε επί 10-20 δευτερόλεπτα στις 700 gcf ή επί χρονικό διάστημα κατάλληλο με τη βαθμονόμηση της φυγοκέντρου.
6. Ανακινήστε και πάλι τη μικροπλάκα επί 1-4 λεπτά στον περιστροφικό αναδευτή στις 600-700 σ.α.λ., ή επί όσο χρόνο απαιτείται για την πλήρη επαναιώρηση των κυττάρων στα πηγαδάκια με τις αρνητικές αντιδράσεις.
7. Αφήστε τη μικροπλάκα ακίνητη επί 1 λεπτό ώστε να κατακαθίσουν τα μικρότερα συσσωματώματα.
8. Μπορείτε τώρα να επιθεωρήσετε τις αντιδράσεις είτε μακροσκοπικώς ή χρησιμοποιώντας κάποια αυτόματη συσκευή μέτρησης.

#### Μέθοδος αντικειμενοφόρου πλάκας

1. Τοποθετήστε 1 σταγόνα αντιδραστήριου Pelikloon σε καθαρή θερμή (37-45 °C) γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα σε φωτεινή τράπεζα.
2. Προσθέστε 2 σταγόνες αιωρήματος 35-45% των υπό έλεγχο ερυθροκυττάρων σε ισοτονικό διάλυμα φυσιολογικού ορού ή στο ίδιο τους το πλάσμα ή τον ορό.
3. Αναμίξτε καλά χρησιμοποιώντας μια καθαρή ράβδο εφαρμογής σε μια κυκλική περιοχή διαμέτρου περίπου 20 mm.
4. Μετατοπίστε την αντικειμενοφόρο πλάκα ελαφρά και παρατηρήστε τη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων για περίοδο που δεν υπερβαίνει τα 2 λεπτά.
5. Επιθεωρήστε μακροσκοπικά για συγκόλληση.

#### **Ερμηνεία**

Θετική αντίδραση (δηλ. συγκόλληση) υποδηλώνει την ύπαρξη του αντιγόνου Rh D. Θετική αντίδραση, παράλληλα με μια ασθενή ή αρνητική αντίδραση μέσω άλλων τεχνικών, υποδηλώνει την ύπαρξη ασθενούς ή μερικού αντιγόνου D και συνιστάται η περαιτέρω διερεύνηση για την ερμηνεία της κατάστασης του Rh D. Αρνητική αντίδραση (δηλ. ουδεμία ορατή συγκόλληση) υποδηλώνει την απουσία του αντιγόνου Rh D.

<b>Παρουσία</b>	<b>Λευκοί</b>	<b>Μαύροι</b>
Αντιγόνο D	85%	92%

#### **Περιορισμοί**

Απροσδόκητα θετικά αποτελέσματα λόγω: ψευδοσυγκόλλησης, αυτοσυγκόλλησης, αντίδραση μικτού πεδίου, παρουσία πηκτώματος Whartons μαζί με κύτταρα ομφάλιου λώρου.

Απροσδόκητα αρνητικά ή ασθενή αποτελέσματα λόγω: ασθενών αντιδραστηρίων, αντίδρασης μικτού πεδίου, μειωμένη δραστηριότητα αντιδραστήριου. Ενδέχεται να υπάρξουν ψευδή θετικά ή ψευδή αρνητικά αποτελέσματα από μόλυνση των υλικών εξέτασης ή οποιαδήποτε απόκλιση από την συνιστώμενη τεχνική.

Τα ερυθροκύτταρα που είναι θετικά στην εξέταση άμεσης αντισφαιρίνης (DAT), ενδέχεται να παράγουν ψευδή θετικά αποτελέσματα στις εξετάσεις.

Συνίσταται η χρήση του μονοκλωνικού μάρτυρα Pelikloon για την ανίχνευση τέτοιων άκυρων αποτελεσμάτων στις εξετάσεις.

Ανεπαρκές ξέπλυμα των ερυθροκυττάρων που εξετάζονται μπορεί να προκαλέσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα εξαιτίας της εξουδετέρωσης του πολυειδικού αντι-ανθρώπινου ορού από πρωτεΐνες (IgG) που υπάρχουν ακόμη στον δοκιμαστικό σωλήνα.

Τα μονοκλωνικά αντιδραστήρια ομάδων αίματος Pelikloon έχουν βελτιστοποιηθεί για χρήση με την(ις) τεχνική(ές) που συνιστώνται στο ένθετο της συσκευασίας αυτής. Εκτός κι αν αναφέρεται διαφορετικά, η καταλληλότητα χρήσης τους από άλλες τεχνικές πρέπει να καθοριστεί από τον χρήστη.

#### **Παραπομπές**

1. Race R.R. and Sanger R.; Blood Groups in Man, 6<sup>th</sup> ed. Oxford Blackwell Scientific Publishers 1975.
2. Issit P.D.; Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> ed. Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1985.
3. Daniels G.; Human Blood Groups. Blackwell Science Ltd. 1995.
4. Reid M.E. and Lomas-Francis C.; The Blood Group Antigen Facts Book. Facts Book Series, 1997.
5. Mollison P.L. et al.; Blood Transfusion In Clinical Medicine, 9<sup>th</sup> ed. Blackwell, Oxford, 1993.

*Τα προϊόντα Sanquin είναι εγγυημένα να αποδίδουν όπως περιγράφεται στις αρχικές οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή. Η αυστηρή συμμόρφωση με τις διαδικασίες, τις διατάξεις δοκιμών και τα συνιστώμενα αντιδραστήρια και εξοπλισμό είναι ουσιώδης. Η Sanquin αποποιείται κάθε ευθύνη που οφείλεται σε τυχόν παρέκκλιση από τα παραπάνω.*