

Định tính kháng nguyên D trong tế bào máu của người (IVD)

Lưu trữ 2 - 8°C.

NGUYÊN LÝ

Hóa chất sẽ làm ngưng kết (vón cục) các mẫu máu được kiểm tra nếu có mang kháng nguyên D trong ứng. Mẫu máu không ngưng kết thường không có kháng nguyên ABO tương ứng (xem giới hạn).

ĐẤU HIỆU LÂM SÀNG

Levine và Stetson phát hiện các hệ thống nhóm máu Rh trong năm 1940. kháng nguyên D là dấu hiệu lâm sàng của tế bào máu không phải ABO và các kháng thể tương ứng đã được xác định có liên quan trong việc gây ra cả hai phản ứng truyền và tán huyết của trẻ sơ sinh.

Anti-D	Phenotype	Caucasians %	Afro-Americans %
+	Rh D +ve	85	72
0	Rh D -ve	15	28

biểu hiện suy yếu của các kháng nguyên RhD

Các thuật ngữ chung D được sử dụng rộng rãi để mô tả các tế bào máu đỏ mà có biểu hiện yếu của kháng nguyên D so với bình thường. Thuật ngữ yếu D biểu thị các cá nhân gần hoàn toàn kháng nguyên D trên tế bào hồng cầu. Thuật ngữ phần D biểu thị các cá nhân với thiếu epitope kháng nguyên D. DVI là một loại D từng phần mà bị lỗi epitope D. Hóa chất sẽ phát hiện hầu hết các ví dụ của các tế bào máu đỏ D một phần và yếu do ngưng kết trực tiếp, nhưng sẽ không phát hiện tế bào DVI. Hóa chất này sẽ phát hiện các tế bào D phần DVI và trong giai đoạn IAT.

HÓA CHẤT

Hóa chất Anti-D là một protein thấp, có chứa đơn dòng IgM và IgG của người được pha loãng trong dung dịch đệm phosphate có chứa natri clorua (0,9 g%), albumin bò (3 g%) và potentiators đại phân tử. Khi cho mẫu bệnh phẩm, thuốc thử này sẽ trực tiếp ngưng kết Rh D tế bào dương tính, bao gồm phần lớn các biến thể (nhưng không phải DVI) và một tỷ lệ cao của yếu D (D^y) khi sử dụng các kỹ thuật được đề nghị. Hóa chất được pha loãng tối ưu để sử dụng trên các mẫu bệnh nhân với tất cả các kỹ thuật đề nghị được nêu dưới đây mà không cần pha loãng hoặc bổ sung.

IgM / IgG	Cell Line / Clone
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

THẬN TRỌNG

- Chỉ sử dụng trong chẩn đoán IVD.
- Nếu lưu hóa chất bị nứt hoặc bị rò rỉ, loại bỏ ngay lập tức.
- Không sử dụng hóa chất đã quá hạn dùng (xem nhãn ghi trên lọ).
- Không sử dụng hóa chất nếu kết tủa.
- Mang găng tay dùng một lần và một chiếc áo khoác phòng thí nghiệm.
- Hóa chất đã được lọc qua một bộ lọc 0.2 mm để giảm gánh nặng sinh học. Khi một lọ đã được mở được sử dụng cho đến ngày hết hạn miễn là không thấy xuất hiện độ đục, hoặc nhiễm khuẩn.
- Hóa chất chứa natri azit <0,1%. Natri azit có thể gây độc nếu ăn phải và có thể phản ứng với chì và hệ thống ống nước bằng đồng để tạo thành kim loại azides nổ. Xử lý xả thải với lượng lớn nước.
- Việc kiểm tra không đảm bảo rằng các sản phẩm có nguồn gốc từ con người hoặc động vật không chứa các chất nhiễm trùng. Cần phải cẩn thận trong việc sử dụng và xử lý.
- Để biết thông tin về việc xử lý của các chất phản ứng và khử nhiễm của vial lỏng xem hướng dẫn sử dụng.

LƯU Ý

- Chung tôi đề nghị phải có 1 chuẩn âm (rr cell) và 1 chuẩn dương (R1r cell) kiểm tra song song với mỗi đợt kiểm tra. Các xét nghiệm phải được coi là hợp lệ nếu các mẫu chuẩn này hiển thị kết quả đúng.
- Khi xét nghiệm nhóm máu từ một bệnh nhân điều quan trọng là phải có 1 hóa chất chuẩn âm bao gồm từ các potentiators phân tử trong chất phản ứng có thể gây ra phản ứng dương tính giả với các tế bào phủ kháng thể IgG.
- Mẫu máu của các phân nhóm D^{VI} chỉ nên sử dụng kỹ thuật **Indirect Antiglobulin** và **Coombs DiaMed-ID**.
- Kháng nguyên D yếu và biến thể ít được phát hiện bằng kỹ thuật gel card, microtitre và kỹ thuật Slide. Chung tôi đề nghị rằng các biến thể yếu và một phần được kiểm tra bằng cách sử dụng kỹ thuật Tube.
- Kỹ thuật ống antiglobulin chỉ có thể được coi là hợp lệ nếu tất cả các âm tính đều phản ứng dương tính với các tế bào mẫu IgG nhạy cảm.
- Trong các kỹ thuật ở đây để nghị một khối lượng là khoảng 40µl khi sử dụng ống nhỏ giọt lọ cung cấp.
- Việc sử dụng các chất phản ứng và giải thích các kết quả phải được thực hiện bởi nhân viên được đào tạo và có trình độ phù hợp với yêu cầu của quốc gia nơi các thuốc thử được sử dụng.
- Người sử dụng phải những quyết định phù hợp của các chất phản ứng để sử dụng trong các kỹ thuật khác.

LƯU TRỮ

Không đóng đá. Hóa chất cần được bảo quản ở 2 - 8°C khi thi được. bảo quản lâu dài ở nhiệt độ bên ngoài phạm vi này có thể dẫn đến việc mất nhanh công thuốc thử phản ứng.

HÓA CHẤT VÀ VẬT LIỆU CẦN THIẾT

Tùy theo quy trình xét nghiệm sử dụng mà ta cần có những hóa chất và thiết bị cần thiết. (Chi tiết xem quy trình thực hiện xét nghiệm).

MẪU MÁU

Các mẫu máu được rút ra có hoặc không có thuốc chống đông có thể được sử dụng cho các kháng nguyên. Nếu xét nghiệm này bị trì hoãn, lưu trữ mẫu với ở 2-8°C. Mẫu EDTA và citrate phải được thực hiện trong vòng 48 giờ. Các mẫu thu được vào ACD, CPD hoặc CPDA-1 có thể được thi nghiệm lên đến 35 ngày, kể từ ngày bị thu hồi. Tất cả các mẫu máu nên được rửa ít nhất hai lần với PBS trước khi được xét nghiệm. Các mẫu máu có dấu hiệu ly giải thể thì kết quả không đáng tin cậy.

QUY TRÌNH

A. Kỹ thuật Tube

- Chuẩn bị 2-3% mẫu máu đã được rửa trong PBS.
- Cho trong ống nghiệm có nhãn: 1 lượng hóa chất Anti-D và 1 thể tích máu.
- Trộn đều.
- Quay ly tâm tất cả các ống trong 20 giây ở tốc độ 1000 vòng/phút hoặc trong một thời gian phù hợp.
- Lắc đều và đọc kết quả.
- Bất kỳ ống nào hiển thị kết quả âm tính hoặc có vẩn đục (có thể xảy ra với mẫu D^y và những mẫu D yếu), nên được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Sau đó lặp lại các bước 4 và 5.

B. Kỹ thuật Slide

- Chuẩn bị 35-45% của mẫu máu trong huyết thanh, huyết tương hoặc PBS.
- Đặt trên một slide kính dán nhãn: 1 lượng hóa chất Anti-D và 1 thể tích máu.
- Sử dụng que khuấy sạch, trộn đều hóa chất và máu trong diện tích khoảng 20 x 40 mm.
- Từ từ nghiêng slide kính qua lại trong 30 giây, thỉnh thoảng trộn thêm trong khoảng thời gian 2 phút, duy trì trượt ở nhiệt độ phòng.
- Đọc kết quả sau 2 phút, không nhầm lẫn các sợi fibrin với ngưng kết.

- Bất kỳ phản ứng yếu nào cần được làm lại xét nghiệm bằng kỹ thuật Tube.

C. Kỹ thuật DiaMed-ID Micro

- Chuẩn bị 0,8% của mẫu máu đã được rửa trong dung dịch pha loãng ID.
- Thảo luận nhóm từ nhiều microtubes khi cần thiết.
- Đặt microtube vào vị trí thích hợp: 50µl mẫu máu cần kiểm tra và 25µl của hóa chất Anti-D.
- Ly tâm ID-Card (s) trong 10 phút ở tốc độ 90 vòng / phút hoặc trong một thời gian phù hợp
- Đọc kết quả.

D. Kỹ thuật Microplate, sử dụng giếng "U"

- Chuẩn bị 2-3% mẫu máu đã được rửa với PBS.
- Đặt giếng ở vị trí thích hợp: Cho vào 1 lượng hóa chất Anti-D và 1 khối lượng mẫu máu.
- Trộn kỹ, tốt nhất sử dụng máy lắc microplate, cẩn thận tránh ô nhiễm chéo giữa các giếng.
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút (thời gian phụ thuộc vào người sử dụng).
- Ly tâm 1 phút ở 140 vòng / phút hoặc trong một thời gian thích hợp.
- Lắc đều và đọc kết quả.
- Bất kỳ phản ứng yếu thì phải được thực hiện lại bằng kỹ thuật Tube.

GIẢI THÍCH KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM

- Dương tính:** ngưng kết của các tế bào tạo nên một kết quả xét nghiệm dương tính và trong giới hạn chấp nhận của kỹ thuật xét nghiệm, chỉ ra sự hiện diện của kháng nguyên D thích hợp trên các tế bào máu đã kiểm tra.
- Âm tính:** Không ngưng kết của các tế bào màu nên một kết quả âm tính và trong giới hạn chấp nhận của kỹ thuật xét nghiệm, chỉ ra sự vắng mặt của các kháng nguyên D thích hợp trên các tế bào máu đã kiểm tra.
- Sự khác nhau:** Nếu kết quả thu được của định nhóm ngược lại không giống với nhóm thuận, bắt buộc phải tiếp tục kiểm tra lại.
- Kết quả thí nghiệm của các tế bào được agglutinated sử dụng điều khiển âm thuốc thử phải được loại trừ, như ngưng kết là có thể gây ra bởi các tác động của các phân tử potentiators trong thuốc thử trên tế bào nhạy cảm.

Tính ổn định của các phản ứng

- Kỹ thuật Tube và Microplate, nên đọc tất cả các ống và các test microplate ngay sau khi ly tâm.
- Kỹ thuật Slide nên được đọc kết quả trong vòng hai phút để đảm bảo độ đặc và để tránh khả năng một kết quả âm tính có thể được hiểu là sai là dương tính do hóa chất bị khô.
- Cần thận trọng việc giải thích các kết quả xét nghiệm khi thực hiện ở nhiệt độ khác nhau.

GIỚI HẠN

- Kháng nguyên D không thích hợp cho việc sử dụng với điều trị các tế bào enzyme hoặc các tế bào lơ lửng LISS.
- Mẫu máu lưu trữ có thể cung cấp cho các phản ứng yếu hơn so với máu tươi.
- Ngưng kết dương tính giả có thể được nhìn thấy khi kiểm tra các tế bào kháng thể IgG nhạy cảm.
- Kết quả âm tính hay dương tính giả cũng có thể xảy ra do:
 - Vật liệu kiểm tra bị nhiễm bẩn
 - Lưu trữ không đúng cách, nồng độ tế bào, thời gian ủ bệnh hoặc nhiệt độ
 - Ly tâm không đúng cách hoặc quá nhiều
 - Sai phương pháp kiểm tra.
- Người sử dụng có trách nhiệm về việc thực hiện các thuốc thử bằng bất kỳ phương pháp nào khác hơn những người ở đây đề cập đến.
- Bất kỳ sai lệch so với các kỹ thuật ở đây đề nghị cần được xác nhận trước khi sử dụng.

ĐẶC ĐIỂM THỰC HIỆN

- Các hóa chất đã được thực hiện với tất cả các kỹ thuật đã đề cập đến.
- Trước khi xuất xưởng, mỗi lọ Spinreact đơn dòng Anti-A, Anti-B và Anti-A.B được thử nghiệm bởi các kỹ thuật ở đây khuyến cáo chống lại một bảng điều khiển của các tế bào máu kháng nguyên dương tính để đảm bảo phản ứng thích hợp.
- Các nguồn kháng thể đơn dòng đặc biệt được thể hiện bằng cách sử dụng bảng điều khiển của các tế bào kháng nguyên âm tính.
- Anti-B không phản ứng với "Acquired-B" các tế bào hồng cầu.
- Các hóa chất đơn dòng ABO của Spinreact không phát hiện kháng nguyên như T, Tn hoặc Cad.
- Hiệu lực của các thuốc thử đã được thử nghiệm chống lại các tiêu chuẩn tham chiếu hiệu lực tối thiểu sau đây được lấy từ Viện Tiêu chuẩn và kiểm soát sinh học (NIBSC):
 - Anti-A tiêu chuẩn tham chiếu 88/722 V / hoặc
 - Anti-B tiêu chuẩn tham chiếu 88/724
- Quản lý chất lượng của các hóa chất được thực hiện sử dụng tế bào máu đã được rửa sạch hai lần với PBS trước khi sử dụng.
- Các hóa chất thực hiện theo những gợi ý trong Guidelines for the UK Blood Transfusion Services.

SÁCH CHUYÊN ĐỀ

- Kholer G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256, 495-497*
- Messeter L et al. Mouse monoclonal antibodies with Anti-A, Anti-B and Anti-A.B specificities, some superior to human polyclonal ABO reagents. Vox Sang 1984; 46, 185-194*
- Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6th Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2.*
- Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition, Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter*
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6*
- BSCH Blood Transfusion Task Force. Guidelines for microplate techniques in liquid-phase blood grouping and antibody screening. Clinical Laboratory Haematology 1990; 12, 437-460.*
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.*
- British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 1995, 5, 145-150.*

ĐÓNG GIỚI

Anti-D IgG + IgM	Ref. 1700021	10 ml
------------------	--------------	-------

