Anti-Human Globulin

Polyspecific IgG+C3d

REFERENCE 80420
80420-S

آنتی هیومن گلوبولین چندظرفیتی (polyspecific anti-human globulin) یک معرف تشخیص آزمایشگاهی (IVD) است که جهت ردیابی و شناسایی آنتی بادی های واکنش دهنده با گلبول های قرمز از کلاس IgG و IgM در آزمون آنتی گلوبولین (کومبس) مستقیم و غیرمستقیم کاربرد دارد.

۱)اساس آزمایش و ارزش تشخیصی

آزمایش آنتی گلوبولین (کومبس) مستقیم و غیرمستقیم برپایه اصول هماگلوتیناسیون استوار است. به این صورت که افزودن معرف آنتی هیومن به سوسپانسیون گلبول های قرمز حساس شده، باعث تشکیل آگلوتینین در محیط in-vivo (کومبس مستقیم) و یا در شرایط in-vitro (کومبس غیرمستقیم) می شود.

حضور anti-IgG و anti-C3d در معرف آنتی هیومن گلوبولین چندظرفیتی، کاربر را قادر می سازد که وجود یا عدم وجود آنتی بادی های اختصاصی متصل شونده به آنتی ژن های متناظر (Corresponding antigens) و یا اجزاء کمپلمان را بر سطح گلبول های قرمز شناسایی کند.

آزمون آنتی گلوبولین مستقیم : در این آزمایش گلبول های قرمز شسته شده به طور مستقیم با معرف آنتی هیومن گلوبولین مخلوط می شوند. طی این آزمایش "حساس شدن" گلبول های قرمز توسط **اتوآنتی بادی ها** (آنمی همولایتیک خود ایمن) و یا **آلوآنتی بادی ها** (غربالگری آنمی همولایتیک نوزادان، ناسازگاری انتقال خون و نیز اختلالات ایمونوآلرژیک القاء شده با دارو) در محیط in-vivo ، مورد بررسی قرار می گیرد.

آزمون آنتی گلوبولین غیرمستقیم: این آزمایش آنتی بادی های علیه RBC ها را شناسایی می کنند. هدف اصلی آن تشخیص وجود آنتی بادی های واکنش دهنده علیه آنتی ژن های فرعی (غیر از سیستم اصلی ABO/Rh) گلبول های قرمز خون، در سرم دریافت کننده خون می باشد. بنابراین این آزمایش همان آزمون غربالگری آنتی بادی (IAT) می باشد.

کراس مچ در واقع نوعی آزمون آنتی گلوبولین غیر مستقیم است که در آن سرم بیمار با گلبولهای قرمز اهدا کننده مجاور شده و هدف آن تشخیص آنتی بادی های بیمار است که قادرانه گلبول های اهدا کننده را در لوله آزمایش آگلوتینه و لیزکنند.

واکنش دو مرحله ای است. در مرحله نخست گلبول های قرمز در معرض آنتی بادی های IgG قرار می گیرند. آنتی بادی های به گلبول های قرمزِ حامل آنتی ژن های متناظر متصل می شوند. پس از شستشو، معرف آنتی هیومن گلبولین اضافه می شود که باعث القاء آگلوتینه شدن گلبول های قرمزِ حساس شدهِ حامل آنتی ژن می شود.

۲) مشخصات و ویژگی های محصول

معرف آنتی هیومن گلوبولین چندظرفیتی IgG+C3d متشکل از آنتی بادی های مونوکلونال با منشاء سلول های هیبرودومای موشی است و سدیم آزاید (<0.1%) در قالب ویال های ۱۰ سی سی عرضه می شود. مشخصات محصول در جدول آورده شده است. این محصول صرفاً کاربرد IVD دارد.

نام معرف	کلون سلولی	منشاء	رفرانس	حجم
Anti-Human Globulin Polyspecific IgG+C3d	**18833+18896+12011d10**	**Murine**	**80420**	**10 ml**

محصول شامل دو نوع بسته بندی (تک ویال با رفرنس نامبر 80420-S) و (سه ویال با رفرنس نامبر 80420) می باشد.

۳) ملاحظات ایمنی

۳-۱) معرف از منشاء سلول های هیبریدومای موشی است و از نظر وجود عوامل عفونی بررسی نشده است، زیرا تا کنون روش شناخته شده ای برای ارزیابی حضور عوامل عفونی در مواد با منشاء مونوکلونال معرفی نشده است. از سوی دیگر با توجه به اینکه نمونه مورد آزمایش، نمونه خون انسانی است، رعایت نکات ایمنی و محافظت فردی شامل پوشیدن دستکش و لوازم حفاظتی همچون ماسک توصیه می شود.

۳-۲) استفاده از مواد ضدعفونی کننده مناسب به هنگام ریختن معرف و یا نمونه ها بر روی میز و سطوح، از جمله نکاتی است که رعایت آن الزامی است.

۳-۳) به هیچ وجه معرف و یا نمونه های مورد آزمایش را با دهان مکش نکنید.

۳-۴) هرگز از ویال هایی که نشتی و یا شکستگی دارند، و یا داری کدورت یا ذرات معلق هستند، استفاده نکنید.

۳-۵) در هنگام انجام آزمایش، از خوردن و آشامیدن بپرهیزید و پس از اتمام کار، دست ها را شسته و ضدعفونی نمایید.

۳-۶) هر چند غلظت سدیم آزاید موجود در ریجنت ها کمتر از 0.1% است، در صورت بلعیده شدن معرف می تواند علائم مسمومیت به همراه داشته باشد. در این حالت نیاز به مداخلات درمانی است.

۴) ملاحظات تکنیکی

۴-۱) قابلیت اطمینان نتایج (reliability) بستگی به مهارت کاربر، تجهیزات مورد استفاده و شرایط محیطی انجام آزمایش دارد.

۴-۲) با توجه به اینکه نتایج آزمایش به صورت نیمه کمی و با چشم گزارش می شود، توصیه می شود نتایج حداقل توسط دو تکنیسین بررسی و گزارش گردد.

۴-۳) ۳۰ دقیقه پیش از انجام آزمایش، معرف را از یخچال خارج کنید تا به دمای محیط برسد.

۴-۴) به هیچ وجه از معرف هایی که تاریخ مصرف آنها منقضی شده است، استفاده نکنید.

۴-۵) برای انجام آزمایش، هرگز معرف های لات های مختلف را با یکدیگر مخلوط ننمایید.

۴-۶) نتایج آزمایش آگلوتیناسیون می بایست بین ۳ تا ۵ دقیقه خوانده و گزارش شود.

۴-۷) برای برداشتن معرف ها از قطره چکان همان ویال استفاده نمایید.

۴-۸) برای برداشتن نمونه های آزمایش از میکروپیپت های کالیبره و سرسمپلر جدید و تمیز استفاده کنید.

۵) شرایط نگهداری و پایداری کیت

معرف آنتی هیومن گلوبولین می بایست در درجه حرارت ۲ تا ۸ درجه نگهداری شود. در این شرایط، تا فرا رسیدن تاریخ انقضاء مندرج بر روی ویال، قابل مصرف می باشد. به هیچ عنوان پس از منقضی شدن تاریخ مصرف از محصول استفاده نشود. توجه داشته باشید که قرار گرفتن طولانی مدت ویال حاوی معرف در خارج از دمای یخچال، بر کیفیت محصول تاثیر نامطلوب خواهد داشت. همچنین از قرار دادن ویال حاوی معرف در داخل فریزر اجتناب کنید.

۶) جمع آوری و نگهداری نمونه ها

۶-۱) نمونه مورد نیاز برای انجام آزمایش کومبس مستقیم، خون کامل می باشد که در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع آوری می شود.
نمونه مناسب برای انجام آزمایش کومبس غیرمستقیم، سرم یا پلاسما می باشد.

۶-۲) هیچ آمادگی خاصی پیش از خونگیری برای فرد لازم نیست. در صورتی که فرد سابقه تزریق خون و یا بارداری در سه ماه گذشته دارد، نمونه تهیه شده فقط تا ۷۲ ساعت پس از خونگیری قابل استفاده می باشد.

۶-۳) به هیچ عنوان از نمونه های همولیز و یا دارای لخته برای انجام آزمایش استفاده نکنید.

۶-۴) پیش از انجام آزمایش، لوله های حاوی نمونه را چندین مرتبه به آرامی سر و ته کنید تا یکنواخت شوند.

۶-۵) در صورتی که انجام آزمایش به تعویق افتد، لازم است که نمونه مورد آزمایش در دمای یخچال نگهداری شود و مجدد پیش از انجام آزمایش به دمای محیط رسانده شود. توصیه می شود که نمونه حداکثر طی ۷۲ ساعت مورد آزمایش قرار گیرد. همچنین نمونه ها نباید در داخل فریزر نگهداری شوند.

۷) آماده سازی معرف ها

معرف آنتی هیومن گلوبولین چندظرفیتی آماده مصرف بوده و نیازی به آماده سازی ندارد. توصیه می شود ۳۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش، ویال حاوی معرف را از یخچال خارج نموده تا به دمای محیط برسد. از تکان دادن شدید ویال خودداری کنید و صرفاً ویال را قبل از مصرف چندین مرتبه به آرامی سر ته نمایید.

۸) روش انجام آزمایش آنتی گلوبولین مستقیم

۸-۱) مواد، لوازم و تجهیزات مورد نیاز

- محلول نرمال سالین (NaCl 0.9%)
- انکوباتور یا بن ماری ۳۷ درجه
- لوله های آزمایش شفاف ۷۵ X ۱۰ یا ۷۵ X ۱۲ میلی متر
- جا لوله ای مناسب
- سانتریفیوژ لوله
- میکروپیپت های متغیر
- چراغ مطالعه و آینه مقعر
- گلبول های قرمز حساس شده با IgG (و یا کمپلمان)
- نمونه کنترل منفی مناسب برای آزمایش کومبس مستقیم

۸-۲) مراحل انجام آزمایش

- گلبول های قرمزِ نمونه مورد آزمایش را سه مرتبه با نرمال سالین شستشو دهید. سپس یک سوسپانسیون سلولی ۵٪ از نمونه شسته شده را در محلول نرمال سالین تهیه کنید.
- ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسون سلولی را داخل یک لوله شیشه ای تمیز بریزید.
- دو قطره از معرف آنتی هیومن گلوبولین را به لوله اضافه نمایید.
- لوله را به آرامی تکان دهید تا مخلوط کاملا یکنواخت گردد.
- لوله را بلافاصله به مدت ۱۵تا۲۰ ثانیه در دور **1000g** یا **3000 RPM** سانتریفیوژ کنید.
- واکنش آگلوتیناسیون را در زیر نور چراغ و آینه مقعر بررسی و نتیجه را ثبت نمایید.
- سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق (**RT**) انکوبه نمایید.
- لوله را مجدد به مدت ۱۵تا۲۰ ثانیه در دور **1000g** یا **3000 RPM** سانتریفیوژ کنید.
- واکنش آگلوتیناسیون را در زیر نور چراغ و آینه مقعر بررسی و نتیجه را ثبت نمایید.
- جهت کنترل و معتبر سازی نتایج منفی آزمایش، ۱ قطره از گلبول قرمز حساس شده (IgG Control Cells) به لوله های منفی اضافه کنید. لوله ها را سانتریفوژ کرده و جهت مشاهده آگلوتیناسیون ارزیابی نمایید.

۸-۳) تفسیر نتایج

- در صورت مشاهده شدن آگلوتیناسیون، واکنش مثبت گزارش می شود. آگلوتیناسیون گلبول های قرمز در حضور معرف آنتی هیومن گلوبولین نشان می دهد که گلبول های قرمز توسط IgG و یا اجزاء کمپلمان حساس شده اند.
- عدم مشاهده آگلوتیناسیون، دلالت بر عدم شناسایی IgG و یا اجزاء کمپلمان بر سطح گلبول های قرمز خون می باشد.

۹) روش انجام آزمایش آنتی گلوبولین غیرمستقیم (غربالگری آنتی بادی)

۹-۱) مواد، لوازم و تجهیزات مورد نیاز

- محلول نرمال سالین (NaCl 0.9%)
- آلبومین سرم گاوی ۲۲٪ یا معرف LISS
- معرف های گلبول های قرمز خون استاندارد (I,II,III) جهت جستجوی آنتی بادی های غیرمنتظره

نکته حائز اهمیت این است که جهت انجام آزمایش بیمار فقط باید از گلبول قرمز خون unpooled استفاده شود.

- لوله های آزمایش شفاف ۷۵ X ۱۰ یا ۷۵ X ۱۲ میلی متر
- جا لوله ای مناسب
- سانتریفیوژ لوله
- نمونه کنترل (گلبول های حساس شده با IgG)
- انکوباتور یا بن ماری ۳۷ درجه
- میکروپیپت های متغیر
- چراغ مطالعه و آینه مقعر
- گلبول های قرمز حساس شده با IgG (و یا کمپلمان)

۹-۲) مراحل انجام آزمایش

- ۳ لوله آزمایش را به صورت جداگانه نشانه‌گذاری نمایید.
- به هر یک از لوله‌ها ۲ قطره سرم یا پلاسمای بیمار را اضافه کنید.
- به ترتیب به هر یک از لوله‌ها ۱ قطره گلبول قرمز استاندارد I, II, III اضافه کنید.
- لوله ها را در سانتریفوژ کالیبره مطابق زمان مشخص با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ تا ۲۰ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- سپس لوله‌ها را جهت مشاهده آگلوتیناسیون و همولیز با استفاده از آینه مقعر ارزیابی نمایید.
- نتایج واکنش را درجه بندی و ثبت کنید.
- به هر یک از لوله‌های فوق ۲ قطره آلبومین ۲۲ درصد یا محلول LISS مطابق دستورالعمل‌سازنده اضافه نمایید.
- در صورت اضافه نمودن آلبومین لوله ها را به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید. درصورت اضافه نمودن LISS لوله‌ها را به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه‌یا مطابق دستورالعمل سازنده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.
- پس از طی زمان مشخص لوله ها را سانتریفوژ کرده و جهت مشاهده آگلوتیناسیون و همولیز با استفاده از آینه مقعر ارزیابی نمایید.
- نتایج واکنش را درجه بندی و ثبت نمایید.
- در ادامه لوله‌ها را حداقل ۳ تا ۴ بار با سالین ۰/۹ درصد شسته و پس از آخرین مرحله شستشو محلول سالین را با ضربه آرام بر روی سطح یک گاز به طور کامل تخلیه کنید.
- دو قطره معرف آنتی هیومن گلوبولین به لوله ها اضافه کنید. سپس لوله ها را به آرامی مخلوط نمایید.
- لوله ها را در سانتریفوژ با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- نتایج را درجه بندی و ثبت نمایید.
- جهت کنترل و معتبر سازی نتایج منفی آزمایش، ۱ قطره از گلبول قرمز حساس شده (IgG Control Cells) به لوله های منفی اضافه کنید. لوله ها را با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ تا ۲۰ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- و جهت مشاهده آگلوتیناسیون ارزیابی نمایید.

۹-۳) تفسیر نتایج

- نتیجه آزمایش با وجود آگلوتیناسیون/ همولیز درمرحله سریع (spin Immediate) و پس ازانکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مثبت گزارش شود.
- نتیجه آزمایش با وجود آگلوتیناسیون/ همولیز پس از اضافه نمودن AHG مثبت گزارش شود.
- نتیجه آزمایش در صورت عدم مشاهده آگلوتیناسیون/ همولیز در هریک از مراحل و در مرحله AHG و پس از اضافه نمودن گلبول قرمز حساس شده و مشاهده آگلوتیناسیون (1^{+} - 2^{w}) منفی گزارش شود.
- درصورت عدم وجود آگلوتیناسیون پس از اضافه نمودن گلبول قرمزحساس شده نتیجه آزمایش معتبر نبوده و باید مراحل آزمایش تکرار شود.

۱۰) محدودیت های روش

۱۰-۱) تنها پرسنل تعلیم دیده و تایید شده می بایست از این محصول استفاده نماید.

۱۰-۲) نتایج منفی کاذب در مواردی که شستشوی گلبول های قرمز به درستی انجام نشود، ممکن است مشاهده گردد.

۱۰-۳) تایید واکنش های منفی با استفاده از گلبول های قرمز حساس شده با IgG (یا اجزاء کمپلمان) ضروری می باشد.

۱۰-۴) در مورد بیماری همولایتیک نوزادان، آزمون کومبس مستقیم ممکن است منفی شود، به ویژه در موارد ناسازگاری ABO .

۱۰-۵) استفاده از ابزار تمیز و غیرآلوده برای انجام آزمایش بسیار ضروری می باشد.

۱۱) ارزیابی عملکرد

مطالعه اختصاصیت آنتی هیومن آنتی IgG توسط روش مهار هم آگلوتیناسیون و از طریق BIACORE انجام شده است که نشان دهنده اختصاصیت بالای آنتی بادی ها برای آلل های G1m ، G2m ، G3m و G4m از ساب کلاس های IgG1 ، IgG2 ، IgG3 و IgG4 می باشد.

مطالعات اختصاصیت آنتی هیومن آنتی C3d بر علیه قطعات مختلف کمپلمان بر سطح گلبول قرمز انسانی بررسی شده است که حاکی از اختصاصیت بالای آن بر علیه C3d ، C3 ، C3d ، iC3b می باشد. این ریجنت قادر به شناسایی گلبول قرمز پوشیده شده با C4 ، C4b ، C4d و آنتی بادیهای فاقد قدرت فعال کردن کمپلمان نیستند.

ارزیابی عملکرد این آنتی هیومن بر روی ۱۳۰ نمونه بیمار بررسی شده است که شامل ۱۸.۴۰٪ نمونه مثبت، با اختصاصیت ۹۹.۹۷٪ در مقایسه با آنتی هیومن پلی کلونال رفرنس بوده است.

آزمایش انجام شده بر روی ۱۳۰ نمونه بیمار که ۴۹ (۱۶.۱۲٪) عدد در تست آنتی گلوبولین مستقیم مثبت بوده اند (C3d یا IgG) اختصاصیت ۱۰۰ درصد را در مقایسه با انتی هیومن رفرنس نشان دادند.

بیش از ۱۰۰ تست نیز در یک پنل از نمونه های تصادفی (شامل اهداکننده گان، بیماران، نوزادان) توسط آنتی هیومن از لحاظ فنوتایپ اریتروسیت رزوس D (RH1) و comb's reactive با تست آنتی گلوبولین غیر مستقیم بررسی شد که اختصاصیت ۱۰۰ درصد را بر علیه فنوتیپ رزوس D شایع (RH1) و سایر آنتی سرم های فنوتیپ (comb's reactive) نشان داد.

منابع

1. AABB, Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 30th Edition, 2016.
2. Serological and immunological evaluation of a new polyspecific monoclonal anti-human globulin, blend of anti-IgG and anti-C3d monoclonal antibodies: Maestria.
3. DIAGAST IFU No.DIA01506: Instruction for Use, EN AGH MAESTRIA, September 2013.

شرکت فردآور
آزما ایرانیان

www.fardavarazma.ir

کرج، مهرشهر، منطقه ویژه اقتصادی پیام، بلوار شهید بابایی، خیابان ششم، شرکت فرداورآزما ایرانیان

تلفن: ۰۲۶-۳۴۲۳۹۵۳۸ فاکس: ۰۲۶-۳۴۲۳۹۵۳۹