



REAGENZIEN ZUR BLUTGRUPPENBESTIMMUNG  
GEBRAUCHSANWEISUNG

**Anti-C, Anti-E, Anti-c and Anti-e Monoclonal: Für Röhren-, Bio-Rad-ID-, Ortho BioVue-, Mikrotiterplatten- + Objektträgermethode.**

**ZUSAMMENFASSUNG**

1940 entdeckten Levine und Stetson das Rhesus-Blutgruppensystem. Abgesehen von D sind die anderen wesentlichen Rh-Antigene die Antigene C, E, c und e. Das D-Antigen ist hochgradig immunogen; die Antigene C und e sind weniger immunogen als E und c. Die entsprechenden Antikörper sind allesamt klinisch signifikant, da sie sowohl Transfusionsreaktionen als auch die hämolytische Krankheit beim Neugeborenen verursachen können.

**VERWENDUNGSZWECK**

Die Rh-Reagenzien sind Reagenzien zur Blutgruppenbestimmung, die zur qualitativen Bestimmung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von Rh-Antigenen auf den roten Blutkörperchen von Blutspendern oder auf eine Bluttransfusion angewiesenen Patienten herangezogen werden sollen, wenn sie in Übereinstimmung mit den in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen empfohlenen Methoden untersucht werden.

**GRUNDSATZ**

Die Reagenzien enthalten Antikörper zu dem dazugehörigen Rhesus-Antigen auf den menschlichen roten Blutkörperchen und bewirken eine direkte Agglutination (Verklumpung) der roten Blutkörperchen, die das entsprechende Rh-Antigen tragen. Erfolgt keine Agglutination (keine Verklumpung), zeigt dies im Allgemeinen das Nichtvorhandensein des entsprechenden Rh-Antigens an (siehe **Einschränkungen**).

**REAGENZIEN**

Die Reagenzien zur Blutgruppenbestimmung Lorne Monoclonal IgM Anti-Rh sind Reagenzien mit geringem Proteingehalt, die humane monoklonale Antikörper enthalten, welche mit Natriumchlorid, Rinderalbumin und makromolekularen Verstärkern (4,0 g%) verdünnt sind. Die Reagenzien enthalten weder CMR-Stoffe oder Stoffe mit endokriner Wirkung oder Stoffe, die beim Benutzer zu einer Sensibilisierung oder einer allergischen Reaktion führen könnten, noch bestehen sie aus solchen Stoffen. Jedes Reagens wird mit der optimalen Verdünnung zur Verwendung mit allen unten angegebenen empfohlenen Methoden geliefert, ohne dass es weiter verdünnt werden muss oder ihm etwas hinzugefügt werden muss. Die Los-Referenznummer und das Ablaufdatum befinden sich auf dem **Etikett der Epruvette**.

Reagens	Zelllinien / Klone
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

**LAGERUNG**

Epruvetten mit Reagenzien sollten bei Erhalt bei 2 - 8 °C gelagert werden. Eine längere Lagerung bei Temperaturen außerhalb dieses Bereichs kann zu einem beschleunigten Verlust der Reaktionsfähigkeit des Reagens führen. Dieses Reagens wurde Transportstabilitätsstudien bei 37 °C und -25 °C unterzogen, wie sie im Dokument BS EN ISO 23640:2015 beschrieben werden.

**PROBENNAHME UND VORBEREITUNG**

Blutproben können mit den Antikoagulantien EDTA, Citrat, CPDA oder als geronnene Blutprobe genommen werden. Die Proben sollten nach der Entnahme so schnell wie möglich untersucht werden. Kommt es bei der Untersuchung zu einer Verzögerung, sind die Proben bei 2-8 °C aufzubewahren. Proben mit einer ausgeprägten Hämolyse oder einer mikrobiellen Kontamination sollten nicht für Untersuchungen eingesetzt werden. Blutproben, die auf eine Lyse hinweisen, können unzuverlässige Ergebnisse liefern. Alle Blutproben sollten vorzugsweise (dies ist jedoch nicht verpflichtend) vor der Untersuchung mit PBS oder isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden.

**VORSICHTSMASSNAHMEN**

- Die Reagenzien sind nur zur Verwendung bei der *In-vitro*-Diagnostik vorgesehen.
- Weist eine Epruvette mit einem Reagens Risse auf oder leckt sie, sind die Inhalte unverzüglich zu entsorgen.
- Die Reagenzien nicht nach dem Ablaufdatum verwenden (siehe **Etikett der Epruvette**).
- Die Reagenzien nicht verwenden, wenn ein Niederschlag vorhanden ist.
- Bei der Handhabung der Reagenzien ist Schutzkleidung wie Einmalhandschuhe und ein Laborkittel zu tragen.
- Die Reagenzien wurden zur Reduzierung der Keimbelastung durch eine 0,2 µm-Kapsel gefiltert, werden jedoch nicht steril geliefert. Nach erfolgter Öffnung einer Epruvette sollten die Inhalte bis zum Ablaufdatum brauchbar sein, solange keine ausgeprägte Trübung vorliegt, die auf eine Verschlechterung oder Kontamination des Reagens hinweisen kann.
- Die Reagenzien enthalten < 0,1 % Natriumazid. Natriumazid kann bei Verschlucken giftig sein und kann mit Abflussrohren aus Blei und Kupfer

- reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit großen Mengen Wasser wegspülen.
- Zur Herstellung der Produkte verwendete Materialien wurden vom Hersteller getestet und es wurde festgestellt, dass sie unter Verwendung von zugelassenen mikrobiologischen Tests in Bezug auf HIV 1+2- und HCV-Antikörper und HBsAg negativ waren.
  - Von den bekannten Tests kann keiner garantieren, dass die aus menschlichen oder tierischen Quellen abgeleiteten Produkte frei von Infektionserregern sind. Bei der Verwendung und Entsorgung einer jeden Epruvette und ihrer Inhalte ist mit Vorsicht vorzugehen.

**ENTSORGUNG DES REAGENS UND UMGANG MIT VERSCHÜTTUNGEN**

Für Informationen zur Entsorgung des Reagens und der Dekontaminierung bei Verschüttungen siehe die **Sicherheitsdatenblätter**, die auf Anfrage verfügbar sind.

**KONTROLLEN UND RAT**

- Es wird empfohlen, dass mit jeder Testserie parallel eine positive Kontrolle (idealerweise heterozygot) und eine negative Kontrolle getestet werden. Zeigen die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse, sind die Tests als ungültig zu betrachten.
- Wenn rote Blutkörperchen von Patienten typisiert werden, von denen bekannt ist oder angenommen wird, dass sie Autoantikörper, Proteinanomalien oder einen positiven direkten Coombs-Test (DAT) aufweisen, ist es wichtig, dass parallel eine negative Reagenzkontrolle getestet wird. Für die negative Reagenzkontrolle darf nur Lorne Monoclonal Rh Control, Katalognummer 640010, verwendet werden.
- Mit der Gelkarten-, Mikrotiterplatten- und Objektträgermethode werden schwache Rh-Antigene möglicherweise nur schlecht erkannt. Es wird empfohlen, dass schwache Rh-Antigene mit der Röhrentestmethode getestet werden.
- Das Reagens vor der Verwendung auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Nach Verwendung des Reagens das Reagens wieder bei 2-8 °C lagern.
- Bei den **empfohlenen Methoden** umfasst ein Volumen ungefähr 50 µl, wenn der mitgelieferte Tropfer der Epruvette verwendet wird.
- Die Verwendung von Reagenzien und die Interpretation der Ergebnisse muss von ordnungsgemäß geschultem und qualifiziertem Personal in Übereinstimmung mit den Anforderungen des Landes, in dem die Reagenzien verwendet werden, durchgeführt werden. Der Benutzer muss bestimmen, ob sich die Reagenzien zur Verwendung bei anderen Methoden eignen.

**ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN**

**Röhrenmethode**

- Glas-Teströhrchen (10 x 75 mm oder 12 x 75 mm).
- Zentrifuge, die sich bei 1000 g 20 Sekunden lang drehen kann.
- PBS-Lösung (pH 6,8-7,2) oder isotonische Kochsalzlösung (pH 6,5-7,5).
- Rote Blutkörperchen zur positiven und negativen Kontrolle:  
Anti-C monoklonal: R<sub>1</sub>r (positive Kontrolle) und rr (negative Kontrolle).  
Anti-E monoklonal: R<sub>2</sub>r (positive Kontrolle) und rr (negative Kontrolle).  
Anti-c monoklonal: R<sub>1</sub>r (positive Kontrolle) und R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> (negative Kontrolle).  
Anti-e monoklonal: R<sub>2</sub>r (positive Kontrolle) und R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (negative Kontrolle).

**Bio-Rad-ID-Micro-Typisierungsmethode**

- Bio-Rad-ID-Karten (NaCl, Enzymtests und Kälteagglutinine).
- Bio-Rad-ID-Zentrifuge.
- Bio-Rad ID-CellStab oder ID-Diluent 2.

**Ortho BioVue-Typisierungsmethode**

- Ortho BioVue-Systemkassetten (Neutral).
- Ortho BioVue-System-Zentrifuge.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent.

**Mikrotiterplattenmethode**

- Validierte Mikrotiterplatten mit „U“-förmiger Vertiefung.
- Mikrotiterplatten-Zentrifuge.
- Mikrotiterplatten-Schüttler.

**Objektträgermethode**

- Gläserne Objektträger oder weiße Kärtchen.
- Applikatorstäbchen.
- Timer oder Stoppuhr

**Alle Methoden**

- Vollpipetten.

## EMPFOHLENE METHODEN

### A. Röhrchenmethode

1. Eine 2-3 %-ige Suspension roter Blutkörperchen in PBS oder isotonischer Kochsalzlösung erstellen.
2. In ein gekennzeichnetes Teströhrchen geben: 1 Volumen Lorne Anti-Rh-Reagens und 1 Volumen rote Blutkörperchen-Suspension.
3. Gründlich mischen und alle Röhrchen 20 Sekunden lang bei 1000 rcf oder für einen geeigneten alternativen Zeitraum und mit geeigneter Kraft zentrifugieren.
4. Den Zellknopf aus roten Blutkörperchen sanft resuspendieren und makroskopisch auf die Agglutination hin ablesen
5. Alle Röhrchen, die ein negatives oder fragwürdiges Ergebnis aufweisen, sollten 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert werden.
6. Nach der Inkubation die Schritte 3 und 4 wiederholen.

### B. Bio-Rad-ID-Methode (Karten für NaCl, Enzyme und Kälteagglutinine)

1. Eine 0,8%-ige Suspension roter Blutkörperchen in ID-CellStab oder ID-Diluent 2 erstellen.
2. Die Aluminiumfolie von so vielen Mikroröhrchen auf der NaCl-/Enzym-/Kälteagglutinine-ID-Card wie notwendig entfernen.
3. In ein geeignetes Mikroröhrchen geben: 50 µl rote Blutkörperchen-Suspension und 25 µl Lorne Anti-Rh-Reagens.
4. Die ID-Karte(n) in einer Bio-Rad-ID-Zentrifuge zentrifugieren.
5. Makroskopisch auf die Agglutination hin ablesen.

### C. Ortho BioVue-Methode (Neutral-Kassetten)

1. Eine 0,8%-Suspension roter Blutkörperchen in 0,8 % Ortho Red Cell Diluent erstellen.
2. Aluminiumfolie von so vielen Reaktionskammern auf der Neutral-Kassette wie notwendig entfernen.
3. In eine geeignete Reaktionskammer geben: 50 µl rote Blutkörperchen-Suspension und 40 µl Lorne Anti-Rh-Reagens.
4. Die Kassette(n) 5 Minuten lang in einer Ortho BioVue-System-Zentrifuge zentrifugieren.
5. Makroskopisch auf die Agglutination hin ablesen.

### D. Mikroplattenmethode unter Verwendung von „U“-förmigen Vertiefungen

1. Eine 2-3 %-ige Suspension roter Blutkörperchen in PBS oder isotonischer Kochsalzlösung erstellen.
2. In die geeignete Vertiefung geben: 1 Volumen Lorne Anti-Rh-Reagens und 1 Volumen rote Blutkörperchen-Suspension.
3. Gründlich mischen, vorzugsweise mit einem Mikroplatten-Schüttler, und darauf achten, vertiefungsübergreifende Kontaminationen zu vermeiden.
4. Bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubieren (Zeit ist vom Benutzer abhängig).
5. Die Mikroplatte 1 Minute lang bei 140 rcf oder für einen geeigneten alternativen Zeitraum und mit geeigneter Kraft zentrifugieren.
6. Die Zellknöpfe anhand von sorgfältig kontrollierter Bewegung auf einem Mikroplatten-Schüttler resuspendieren
7. Makroskopisch oder mit einem validierten automatischen Lesegerät ablesen.
8. Alle schwachen Reaktionen sollten mit der Röhrchenmethode wiederholt werden.

### E. Objektträgermethode

1. Eine 35-45 %-ige Suspension roter Blutkörperchen in Serum, Plasma oder PBS oder isotonischer Kochsalzlösung erstellen. Wenn dies nicht möglich ist, kann auch antikoaguliertes Vollblut als Probe verwendet werden.
2. Auf einen gekennzeichneten gläsernen Objektträger oder ein Kärtchen geben: 1 Volumen Lorne Anti-Rh-Reagens und 1 Volumen rote Blutkörperchen-Suspension.
3. Mit einem sauberen Applikatorstäbchen das Reagens und die Zellen über einen Bereich von etwa 20 x 40 mm hinweg mischen.
4. Den Objektträger 1 Minute lang langsam nach vorne und hinten kippen und den Objektträger bei Raumtemperatur belassen.
5. Nach 1 Minute makroskopisch bei diffusem Licht ablesen und Fibrinstränge nicht fälschlicherweise für Agglutination halten.
6. Alle schwachen Reaktionen sollten mit der Röhrchenmethode wiederholt werden.

## INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

1. **Positiv:** Eine Agglutination der roten Blutkörperchen stellt ein positives Testergebnis dar und zeigt innerhalb zulässiger Einschränkungen des Testverfahrens das Vorhandensein des geeigneten Rh-Antigens auf den roten Blutkörperchen an.
2. **Negativ:** Eine nicht vorhandene Agglutination der roten Blutkörperchen stellt ein negatives Testergebnis dar und zeigt innerhalb der zulässigen Einschränkungen des Testverfahrens das Nichtvorhandensein des geeigneten Rh-Antigens auf den roten Blutkörperchen an.
3. **Kontrolle:** Testergebnisse von Zellen, die anhand der negativen Reagenzkontrolle agglutiniert werden, werden ausgeschlossen, da die Agglutination höchstwahrscheinlich aufgrund der Wirkung der makromolekularen Verstärker im Reagens auf den sensibilisierten Zellen hervorgerufen wurde.

## STABILITÄT DER REAKTIONEN

1. Alle Röhrchen- und Mikroplatten-Tests unmittelbar nach der Zentrifugierung ablesen.
2. Objektträgertests sollten innerhalb von einer Minute ausgelegt werden, um die Spezifität zu gewährleisten und zu verhindern, dass ein negatives

Ergebnis möglicherweise aufgrund des Trocknens des Reagens fälschlicherweise als positiv ausgelegt wird.

3. Bei der Interpretation von Ergebnissen von Untersuchungen, die bei anderen Temperaturen als den empfohlenen durchgeführt wurden, ist Vorsicht angebracht.

## EINSCHRÄNKUNGEN

1. Lorne Anti-Rh-Reagenzien sind nicht geeignet für die Verwendung mit mit Enzymen behandelten Zellen oder für die Verwendung beim indirekten Coombs-Test.
2. Es hat sich gezeigt, dass viele monoklonale humanen IgM-Anti-Rh-Antikörper Anti-i/I-Kälteagglutininaktivität besitzen, insbesondere bei Nabelschnurblutzellen oder mit Enzymen behandelten Zellen. Dies kann offenkundig werden, wenn Tests unterhalb der empfohlenen Temperatur inkubiert werden.
3. Einige rote Blutkörperchen exprimieren unterschiedliche Rh-Antigene und können schwächere Reaktionen zeigen, als sie mit zufällig ausgewählten positiven Kontrollzellen auftreten. Anti-C kann mit dem C-Antigen von Personen mit R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> schwächere Reaktionen zeigen. Ebenso kann Anti-e bei Nichtvorhandensein des C-Antigens etwas schwächere Reaktionen ergeben, z. B. R<sub>2</sub>r, r'r und rr.
4. Die unterdrückte oder verminderte Expression bestimmter Blutgruppen-Antigene kann umgekehrt zu falsch negativen Reaktionen führen. Darum sollte stets Vorsicht geübt werden, wenn aufgrund von Testergebnissen Genotypen zugewiesen werden.
5. Falsch positive oder falsch negative Ergebnisse können auch auftreten aufgrund von:
  - Kontamination von Testmaterialien
  - Ungeeigneter Lagerung, Zellkonzentration, Inkubationszeit oder Temperatur
  - Unsachgemäßer oder übermäßiger Zentrifugierung
  - Abweichung von den empfohlenen Methoden

## BESTIMMTE LEISTUNGSMERKMALE

1. Vor der Freigabe wurden alle Lose mit Rh-Reagenzien anhand der in dieser Gebrauchsanweisung aufgeführten empfohlenen Testverfahren getestet. Die Tests erfüllten die Testanforderungen, wie sie in der aktuellen Version/Ausgabe der „Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom“ und der gemeinsamen technischen Spezifikationen angegeben werden.
2. Die Spezifität der monoklonalen Antikörper der Quelle wird anhand eines Panels mit Antigen-negativen Zellen unter Beweis gestellt.
3. Die Qualitätskontrolle der Reagenzien erfolgte anhand von roten Blutkörperchen mit Phänotypen, die von einem Bluttransfusionszentrum im Vereinigten Königreich verifiziert wurden und vor der Verwendung mit PBS oder isotonischer Kochsalzlösung gewaschen worden waren.

## HAFTUNGSAUSSCHLUSS

1. Für das Leistungsverhalten der Reagenzien nach einem anderen Verfahren als den in den **empfohlenen Methoden** erwähnten ist der Benutzer verantwortlich.
2. Alle Abweichungen von den **empfohlenen Methoden** sollten vor der Verwendung validiert werden<sup>5</sup>.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3. Ausgabe, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Kapitel 10.
2. AABB Technical Manual, 16. Ausgabe, AABB 2008.
3. Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. Transfusion Medicine 1995, 5, 171-184
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6. Ausgabe 2002. The Stationary Office.
5. 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.

## VERFÜGBARE GRÖSSEN DER REAGENZIEN

	Größe der Epruvette	Katalognummer	Tests je Epruvette
Anti-C Monoclonal	5 ml	690005	100
	1000 ml	690000*	20.000
Anti-E Monoclonal	5 ml	691005	100
	1000 ml	691000*	20.000
Anti-c Monoclonal	5 ml	692005	100
	1000 ml	692000*	20.000
Anti-e Monoclonal	5 ml	693005	100
	1000 ml	693000*	20.000

\*Diese Größe ist nur zur weiteren Verwendung in der Herstellung (FFMU) vorgesehen und trägt daher keine CE-Kennzeichnung.



Lorne Laboratories Limited  
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate

Danehill  
Lower Earley  
Berkshire, RG6 4UT  
Vereinigtes Königreich  
Tel: +44 (0) 118 921 2264  
Fax: +44 (0) 118 986 4518  
E-Mail: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2<sup>nd</sup> Fl.,  
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta