



MONOCLONAL REAGENZIEN ZUR BLUTGRUPPENBESTIMMUNG GEBRAUCHSANWEISUNG

Anti-D Clone 1 und Clone 2 Monoclonal: Für die Röhren-, Bio-Rad-ID-, Ortho BioVue-, Mikrotiterplatten- und die Objektträger-Methoden.

ZUSAMMENFASSUNG

1940 wurde das Rh-Blutgruppensystem entdeckt. Das D-Antigen das klinisch signifikanteste Nicht-ABO-Antigen von roten Blutkörperchen und wird mit der Verursachung von hämolytischen Transfusionsreaktionen und der hämolytischen Krankheit beim Neugeborenen in Verbindung gebracht.

Anti-D	Phänotyp	Weißer % ³	Afroamerikaner % ³
+	Rh D-positiv	83	92
0	Rh D-negativ	17	8

VERWENDUNGSZWECK

Die Anti-D-Reagenzien sind Reagenzien zur Blutgruppenbestimmung, die zur qualitativen Bestimmung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins des Rh-D-Antigens in 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 gegen das D-Antigen auf den menschlichen roten Blutkörperchen und bewirken eine direkte Agglutination (Verklumpung) der menschlichen roten Blutkörperchen, die das D-Antigen tragen. Erfolgt keine Agglutination (keine Verklumpung), zeigt dies im Allgemeinen das Nichtvorhandensein des D-Antigens auf den menschlichen roten Blutkörperchen an (siehe **Einschränkungen**).

REAGENZIEN

Die Reagenzien zur Blutgruppenbestimmung Lorne Monoclonal IgM Anti-D Clone 1 und Clone 2 sind proteinarme Reagenzien, die einen humanen monoklonalen IgM-Antikörper verdünnt mit Natriumchlorid (0,9 g%), Rinderalbumin (2,0 g%) und makromolekularen Verstärkern (1,5 g%) enthalten. Bei der Typisierung von Patientenproben agglutiniert jedes Reagens bei der Anwendung der empfohlenen Methoden direkt Rh-D-positive Zellen, einschließlich der Mehrheit der Varianten (**aber nicht D^{VI}**) und eines hohen Anteils an weak-D (D^U)-Phänotypen. 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 bei Patientenproben 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**.

Produkt	Zelllinie/Klon
Anti-D Clone 1	RUM-1
Anti-D Clone 2	MS-201

ABGESCHWÄCHTE EXPRESSION DES RhD-ANTIGENS

Der Sammelbegriff D^U wird im weiten Sinne zur Beschreibung von roten Blutkörperchen verwendet, die eine schwächere Expression des D-Antigens als normal aufweisen. Der Begriff „weak D“ bezeichnet Personen mit einer verringerten Anzahl von vollständigen D-Antigenbindungsstellen je rotem Blutkörperchen. Der Begriff „partial D“ bezeichnet Personen mit fehlenden D-Antigen-Epitopen. D^{VI}-Zellen sind eine partial-D-Kategorie, bei der die meisten D-Epitope fehlen. Sowohl Clone 1- als auch Clone 2-Reagenzien erkennen die meisten Beispiele von roten Blutkörperchen, die partial und weak D sind, anhand von direkter Agglutination, erkennen jedoch keine D^{VI}-Zellen.

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 Antikoagulanzen 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 Verschleimung 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 an der Quelle 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 R₁r-Zellen) und eine negative Kontrolle (idealerweise rr-Zellen) getestet werden. Zeigen die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse, sind die Tests als ungültig zu betrachten.
- Bei der Typisierung roter Zellen von einem Patienten, bei dem eine Erkrankung diagnostiziert wird, durch die die roten Blutkörperchen mit Antikörpern oder anderen Proteinen überzogen werden (zum Beispiel HDN, AIHA), ist es wichtig, die roten Blutkörperchen des Patienten mit der negativen Reagenzkontrolle von Lorne zu testen (Monoclonal D Negative Control (Katalog 650010)).
- Mit der Gelkarten-, Mikrotiterplatten- und Objektträgermethode werden weak und partial D-Varianten nur schlecht erkannt. Es wird empfohlen, dass weak und partial D-Varianten 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 der 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 REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- Vollpipetten.
- Bio-Rad-ID-Karten (NaCl, Enzymtests und Kälteagglutinine).
- Bio-Rad-ID-Zentrifuge.
- Bio-Rad ID-CellStab oder ID-Diluent 2.
- Ortho BioVue-Systemkassetten (Neutral).
- Ortho BioVue-System-Zentrifuge.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- Gläserne Objektträger oder weiße Kärtchen.
- Applikatorstäbchen.
- Glas-Teströhrchen (10 x 75 mm oder 12 x 75 mm).
- Teströhrchen-Zentrifuge.
- Validierte Mikroplatten mit „U“-förmiger Vertiefung.
- Mikroplatten-Zentrifuge.

- Plattenschüttler.
- PBS-Lösung (pH 6,8–7,2) oder isotonische Kochsalzlösung (pH 6,5–7,5).
- Rote Blutkörperchen zur positiven (idealerweise R₁I) und negativen (rr) Kontrolle.

EMPFOHLENE METHODEN

A. Röhrenmethode

1. Eine 2-3 %-ige Suspension roter Blutkörperchen in PBS oder isotonischer Kochsalzlösung erstellen.
2. In ein gekennzeichnetes Teströhrchen geben: 1 Volumen Lorne Anti-D-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 (wie es bei weak-D-Proben der Fall sein kann), 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, Enzymtests und Kälteagglutinine)

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

C. Ortho BioVue-Methode (Neutral-Karten)

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

D. Mikroplatten-Methode mit „U“-förmigen Vertiefungen

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

E. Objektträgermethode

1. Eine 35-45 %-ige Suspension roter Blutkörperchen in Serum, Plasma oder PBS oder isotonischer Kochsalzlösung erstellen oder antikoaguliertes Vollblut (in seinem eigenen Plasma) verwenden.
2. Auf einen gekennzeichneten gläsernen Objektträger oder ein Kärtchen geben: 1 Volumen Lorne Anti-D-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 30 Sekunden lang langsam nach vorne und hinten kippen und in dem Zeitraum von 1 Minute gelegentlich weiter mischen, wobei der Objektträger die Raumtemperatur behalten soll.
5. Nach 1 Minute makroskopisch bei diffusem Licht ablesen und Fibrinstränge nicht fälschlicherweise für Agglutination halten.
6. Alle schwachen Reaktionen sollten mit der Röhrenmethode 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 D-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 D-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 sofort 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-D ist nicht geeignet für die Verwendung mit mit Enzymen behandelten Zellen, in LISS suspendierten Zellen oder für die Verwendung beim indirekten Coombs-Test (IAT).
2. Gelagertes Blut kann schwächere Reaktionen erzeugen als frisches Blut.
3. Aufgrund des Vorhandenseins von makromolekularen Verstärkern im Reagens bei der Untersuchung von IgG-sensibilisierten Zellen, z. B. AIHA, HDN, kann es zu falsch positiver Agglutination kommen.
4. 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 dem monoklonalen Reagens Lorne Anti-D 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. Anti-D-Reagenzien zur Gruppenbestimmung für die Gruppenbestimmung „D“ bei Patienten sollten bei Anwendung des (der) empfohlenen Verfahren(s) nicht mit den D^{VI}-Zellen reagieren.
3. Die Spezifität der monoklonalen Antikörper der Quelle wird anhand eines Panels mit Antigen-negativen Zellen unter Beweis gestellt.
4. Die Wirksamkeit der Reagenzien wurde anhand des folgenden Referenzstandards für die minimale Wirksamkeit getestet, der vom National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC) eingeholt wurde:
 - Anti-D-Referenz 99/836.
5. 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 werden⁶.

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. Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Seite 192.
4. 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
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6. Ausgabe 2002. The Stationary Office.
6. 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-D Clone 1 Monoclonal	10 ml	730010	200
	1000 ml	730000*	20.000
	5000 ml	730000x5*	100.000
Anti-D Clone 2 Monoclonal	10 ml	710010	200
	1000 ml	710000*	20.000
	5000 ml	710000x5*	100.000

*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, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta