

GEBRAUCHSINFORMATION

Anti-D Blend

CE 0123

(IgM + IgG) monoklonal

IN VITRO DIAGNOSTIKUM

1. Produktbeschreibung

Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal wird aus monoklonalem, humanem Anti-D (IgM) (Klon D175-2) und monoklonalem, humanem Anti-D (IgG) (Klon D415 1E4) hergestellt. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal dient zum spezifischen, qualitativen Nachweis des korrespondierenden D-Antigens auf Erythrozyten und ist geeignet für den Objektträger- und Röhrchentest.

Zur Steigerung der Leistungsfähigkeit enthält das Verdünnungsmedium für dieses Niedrigproteinreagenz NaCl, BSA, einen Puffer und weitere ausgewählte Komponenten. Als Konservierungsmittel ist NaN_3 zugesetzt.

Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal erkennt viele Zellen mit einem D weak Phänotyp sowie einige seltene D-Varianten. Der IgM Anti-D Klon D175-2 zeigt keine Reaktivität mit allen bisher getesteten Zellen der D-Kategorie VI. Der IgG Klon D415 1E4 erfasst D-Kategorie VI. Die Reaktivität jedes Lots Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal wird mit verschiedenen Proben, die positiv für das D-Antigen sind, überprüft. Die Spezifität jedes Lots wird mit einem Panel von Zellen überprüft, die negativ für das zu überprüfende Antigen bzw. positiv für Antigene sind, die mit einer Frequenz von 1% oder höher in der nordamerikanischen Bevölkerung vorkommen. Außerdem wird jedes Lot mit mindestens drei Proben getestet, die positiv für das Bg^a -Antigen sind. Antigene mit niedriger Frequenz wie z.B. C^w , Yt^b , M^g , und Vw werden nur getestet, wenn entsprechende Testzellen verfügbar sind.

2. Testprinzip

Die angegebenen Testmethoden beruhen auf dem Prinzip der direkten Haemagglutination. Nach Zugabe von Erythrozyten zu Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal findet eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion statt, wenn das korrespondierende D-Antigen auf den Erythrozyten vorhanden ist. Diese Reaktion ist optisch durch die Agglutination der Erythrozyten erkennbar. Wenn keine Agglutination stattfindet, zeigt dies ein negatives Ergebnis an und weist unter Berücksichtigung der Einschränkungen der Testmethode auf die Abwesenheit des korrespondierenden D-Antigens hin.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal bei 2...8°C lagern. Nicht einfrieren! Das Reagenz vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18...25°C) erwärmen lassen und unmittelbar nach dem Gebrauch wieder bei 2...8°C lagern.

Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal ist bei Einhaltung der angegebenen Lagerbedingungen nach dem ersten Öffnen bis zum auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar, wenn es keine Trübungen oder andere Anzeichen für eine Kontamination aufweist. Das Reagenz nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums benutzen.

Kontaminierte Reagenzien nicht mehr benutzen!

4. Probenvorbereitung

Die Blutproben sollten entsprechend den üblichen medizinischen Verfahren entnommen werden. Blutproben mit und ohne Antikoagulanzen sind für die Testung geeignet, wenn die Durchführung ohne zeitliche Verzögerung stattfindet. Ist dies nicht möglich, können Erythrozyten aus geronnenem Blut oder EDTA-Blut bis zu 14 Tage nach Blutentnahme getestet werden. ACD-, CPD- und CPDA-1-Blut kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum getestet werden. Erythrozytenproben sollten bei 2...8°C aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung der Erythrozyten kann eine Erythrozytenstabilisierungslösung benutzt werden. Durch eine zu lange Lagerung der Erythrozyten vor der Testung können sich die Erythrozytenantigene verändern, was abgeschwächte Reaktionen zur Folge haben kann.

5. Zusätzlich benötigte Materialien

Isotonische NaCl-Lösung, pH 6,5 – 7,5
Glasobjektträger und Stäbchen zum Mischen
Reagenzgläser (75 x 12 mm)
Einweg-Pasteur-Pipetten
Zentrifuge
Testerythrozyten mit bekanntem Rh-Phänotyp
Anti-Humanglobulin
IgG-beladene Testerythrozyten

6. Testdurchführung

Objektträgertest

1. Von den zu untersuchenden Erythrozyten eine 35 – 45%ige Suspension in isotonischer NaCl-Lösung herstellen.
2. Auf einen gekennzeichneten Objektträger 1 Tropfen (ca. 40 – 50 µl) Testreagenz geben.
3. 2 Tropfen der Erythrozytensuspension hinzufügen und mit einem sauberen Stäbchen mischen. Das Gemisch dabei über eine Fläche von ca. 20 x 40 mm verteilen.
4. Den Objektträger leicht hin und her bewegen und makroskopisch auf Agglutination prüfen. Innerhalb von 2 Minuten ablesen, da sonst Eintrocknungserscheinungen am Rand eine positive Reaktion vortäuschen können.

Wichtiger Hinweis zur Rhesus-D-Bestimmung auf dem Objektträger

Die Rhesus-D-Bestimmung auf dem Objektträger ist vergleichsweise weniger sensitiv und als Verfahren der Rhesus-D-Blutgruppenbestimmung nicht zu empfehlen. Der Objektträgertest kann aber als Inhaltskontrolle benutzt werden.

Röhrchentest

1. Die zu untersuchenden Erythrozyten mit isotonischer NaCl-Lösung waschen und eine 2 - 4%ige Suspension in isotonischer NaCl-Lösung herstellen.
2. 1 Tropfen Testreagenz (ca. 40 – 50 µl) und 1 Tropfen der Erythrozytensuspension in einem beschrifteten Röhrchen mischen.
3. 15 – 30 Sekunden bei 900 – 1000 x g oder bei alternativer Drehzahl mit angepasster Zeit zentrifugieren.
4. Unter vorsichtigem Aufschütteln des Röhrchens makroskopisch auf Agglutination prüfen.

Bitte beachten

Den Test nicht mikroskopisch auswerten.

Bei einigen D weak Typen können die Reaktionen durch Inkubation des Reaktionsansatzes für 15 Minuten bei 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) verstärkt werden (anschließend mit Punkt 3 und 4 fortfahren).

Schwache Reaktionen mit Anti-D Blend können durch Inkubation des Reaktionsansatzes für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18...25°C) verstärkt werden (anschließend mit Punkt 3 und 4 fortfahren).

Eine bekannt D-positive und D-negative Erythrozytensuspension, die Rh-Kontrolle für monoklonale Testreagenzien und eine Eigenkontrolle zur Prüfung auf Autoagglutination sind zur Kontrolle mitzuführen.

Die Bestimmung des D-Antigens ist mit mindestens 2 verschiedenen Anti-D-Testreagenzien durchzuführen. Bei Verwendung von zwei monoklonalen Testreagenzien müssen zwei verschiedene Klone eingesetzt werden.

Bei negativem oder zweifelhaftem Befund den modifizierten indirekten Coombs-Test (D weak-Test) durchführen.

Modifizierter Indirekter Coombs-Test (D weak-Test)

1. Die zu untersuchenden Erythrozyten mindestens einmal mit isotonischer NaCl-Lösung waschen und eine 2 - 4%ige Suspension in isotonischer NaCl-Lösung herstellen.
2. 1 Tropfen Testreagenz (ca. 40 – 50 µl) und 1 Tropfen der Erythrozytensuspension in einem beschrifteten Röhrchen mischen.
3. Das Röhrchen 15 Minuten bei 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) inkubieren.
4. Die Erythrozyten einmal mit isotonischer NaCl waschen und den Überstand vollständig dekantieren, sodass man ein „trockenes“ Erythrozytsediment erhält.
5. Zu dem Erythrozytsediment 2 Tropfen polyspezifisches Anti-Humanglobulin oder Anti-IgG geben (entsprechend den Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation des Anti-Humanglobulins) und vorsichtig aber gründlich mischen.

6. 15 Sekunden bei 900 – 1000 x g oder bei alternativer Drehzahl mit angepasster Zeit zentrifugieren.
7. Unter vorsichtigem Aufschütteln des Röhrchens makroskopisch auf Agglutination prüfen.
8. Negative oder nur schwach positive Ergebnisse durch Zugabe von IgG-beladenen Testzellen überprüfen (entsprechend den Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation der IgG-beladenen Testzellen).

Bitte beachten:

Den Test nicht mikroskopisch auswerten.

Eine bekannt D weak und eine D-negative Erythrozytensuspension sollten zur Kontrolle mitgeführt werden.

Bei dieser Testmethode dürfen keine ungewaschenen oder in Serum oder Plasma resuspendierten Erythrozyten eingesetzt werden.

7. Interpretation der Ergebnisse

Eine Agglutination der Erythrozyten mit Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal im Röhrchentest zeigt das Vorhandensein des korrespondierenden D-Antigens an. Sehr schwache Reaktionen können auf D weak oder partielle D-Antigene hinweisen. Reagieren die Erythrozyten nur im Modifizierten Indirekten Coombs-Test (D weak-Test) positiv, weist dies auf einen D weak Phänotyp hin. Bei einem positiven Ergebnis im Röhrchentest (direktem Agglutinationstest) und im Modifizierten Indirekten Coombs-Test ist keine zuverlässige Aussage in Bezug auf einen D weak Phänotyp möglich.

Findet keine Agglutination der Erythrozyten mit Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal statt, weist dies auf die Abwesenheit des korrespondierenden D-Antigen hin.

Das Testergebnis kann nicht gewertet werden, wenn die Kontrollen wie folgt reagieren:

- keine Agglutination mit der bekannt D-positiven Erythrozytensuspension
- Agglutination mit der bekannt D-negativen Erythrozytensuspension
- Agglutination mit der Rh-Kontrolle für monoklonale Testreagenzien
- Agglutination mit der Eigenkontrolle
- keine Agglutination nach Zugabe von IgG-beladenen Testzellen zu einem negativen Testansatz im Indirekten Modifizierten Coombs-Test (D weak-Test)

Treten bei der Bestimmung des Antigens mit zwei verschiedenen Testreagenzien diskrepante Ergebnisse auf, muss die Bestimmung mit einer anderen Testmethode und/oder einem weiteren Testreagenz wiederholt werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen die Grenzen der Methode (s. 9. Wichtige Hinweise/Grenzen der Methode) beachtet werden.

8. Stabilität der Reaktionen

Alle Testergebnisse müssen unmittelbar nach Beendigung der Testdurchführung beurteilt werden.

9. Wichtige Hinweise / Grenzen der Methode

1. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal ist nur für den in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und darf nur von geschultem Fachpersonal eingesetzt werden.
2. In seltenen Fällen kann es bei in vivo mit Immunglobulinen beladenen Erythrozyten zu spontanen und nicht spezifischen Agglutinationen kommen. Dieses Phänomen ist normalerweise mit Reagenzien, die einen hohen Proteingehalt und makromolekulare Zusätze enthalten, assoziiert. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal wird mit einem Medium mit niedrigem Proteingehalt hergestellt, das die Spontanagglutination nicht unterstützt. Trotzdem kann es in sehr seltenen Fällen bei einer starken Beladung der Erythrozyten mit Immunglobulinen auch in diesem Medium zu Spontanagglutinationen kommen. Das gleiche Phänomen tritt dann aber meistens auch bei der Bestimmung des AB0-Systems auf. Als Kontrolle sollte deshalb immer Rh-Kontrolle für monoklonale Testreagenzien oder 6 - 8%iges BSA oder autologes Patientenserum/-plasma mitgeführt werden. Zeigen die Kontrollteste auch eine positive Reaktion, kann das Ergebnis der Rh-Bestimmung nicht interpretiert werden.
3. Suspensionen von ungewaschenen Erythrozyten fördern falsch positive Reaktionen, die mit Geldrollenbildung oder Autoantikörpern assoziiert sind. Der routinemäßige Einsatz von gut gewaschenen, in isotonischer NaCl-Lösung suspendierten Erythrozyten für den Röhrchentest kann das Auftreten solch falsch positiver Reaktionen vermindern.
4. Ungewaschene Erythrozyten oder Suspensionen in autologem Serum oder Plasma dürfen nicht im Modifizierten Indirekten Coombs-Test zum Nachweis von D weak eingesetzt werden, weil es zu einer teilweisen Neutralisierung des Antihumanglobulins aufgrund der abgekürzten Waschprozedur kommen kann und somit zu schwachen oder

- falsch negativen Ergebnissen. Wenn ungewaschene Zellen benutzt werden, sind für einen effektiven Coombstest drei bis vier aufeinanderfolgende Waschschriffe erforderlich, um restliches Serum-IgG zu entfernen.
5. Ein positives Ergebnis im Modifizierten Indirekten Coombs-Test muss mit geeigneten Kontrollen (z. B. Rh-Kontrolle für monoklonale Testreagenzien, 6 -8% BSA oder auto-loges Patientenserum/-plasma) durch einen negativen Direkten Antiglobulin-Test oder einen negativen Indirekten Antiglobulin-Test abgesichert werden.
 6. Einige Erythrozyten können nur schwache und/oder partielle D-Antigene (Rh1) exprimiert haben und eine entsprechend schwächere Reaktion mit Anti-D zeigen. Eine weitere Abklärung und Spezifizierung der Befunde kann mit **BAGene** (SSP-Kits zur Bestimmung der RH-Eigenschaften auf molekulargenetischer Basis) erfolgen.
 7. Mit Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal können nicht alle Partial-D-Antigene nachgewiesen werden. Außerdem kann das Testreagenz mit D weak Zellen und einigen seltenen Partial-D-Zellen (z.B. R₀^{Har}, Crawford-Phänotyp) reagieren, die in vorherigen Untersuchungen mit anderen Anti-D-Testreagenzien möglicherweise als D-negativ beurteilt wurden.
 8. Eine zu späte Ablesung der Tests, ein zu starkes Aufschütteln des Erythrozytensediments und andere Abweichungen von der angegebenen Testdurchführung können zu schwächeren oder falsch negativen Ergebnissen führen.
 9. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal darf nicht für die Testung von Enzym-behandelten Erythrozyten eingesetzt werden.
Um falsch positive Reaktionen zu vermeiden, sollte das Reagenz auch nicht zu kalt sein, wenn es für Testungen benutzt wird. Das Reagenz und die zu untersuchenden Erythrozyten sowie die Kontrollmaterialien sollten vor der Testdurchführung Raumtemperatur (18...25°C) erreicht haben.
 10. Falsch negative oder unerwartet schwache Reaktionen können auch durch zu lange Lagerung und/oder ungeeignete Lagerbedingungen der Erythrozyten verursacht werden.
 11. Ungeeignete Techniken, falsche Zentrifugation oder Inkubation, unsaubere Röhren oder Objektträger, falscher pH-Wert der isotonischen NaCl-Lösung und/oder kontaminierte Materialien können zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.
 12. Die für die Zentrifugationen angegebene g-Zahl ist immer das Minimum, das benötigt wird, um einen klaren Überstand und ein abgegrenztes Erythrozytensediment, das sich leicht resuspendieren lässt, zu erhalten. Es ist nicht möglich, für alle verfügbaren Zentrifugentypen eine allgemein verbindliche Zentrifugationsgeschwindigkeit oder -zeit anzugeben. Zentrifugen müssen individuell kalibriert werden, um die optimale Zeit und Geschwindigkeit für die gewünschten Ergebnisse zu ermitteln.
 13. Eine mikrobielle Kontamination von Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal unbedingt vermeiden, weil dies die Haltbarkeit des Produkts verkürzen und zu falschen Ergebnissen führen kann. Das Testreagenz deshalb nicht mehr benutzen, wenn eine Trübung oder andere sichtbare Veränderungen festgestellt werden. Dies kann auf eine mikrobielle Kontamination hinweisen.
 14. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte immer berücksichtigt werden, ob Transfusionen oder Transplantationen stattgefunden haben. Die Transfusions- und/oder Transplantationsanamnese, aber auch die Medikamentenanamnese, sollte zur Interpretation herangezogen werden.
 15. Nach den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer und vom Paul-Ehrlich-Institut gilt der Blutspender bei diskrepanten Ergebnissen mit verschiedenen Testreagenzien und bei schwach positivem Ergebnis als Rh (D) positiv und der Blutempfänger gilt bei diskrepanten oder fraglich positiven Ergebnissen als Rh (D) negativ.
 16. Anti-D Blend (IgM + IgG) nicht verdünnen und nur wie in dieser Gebrauchsinformation angegeben einsetzen. Modifikationen jeglicher Art müssen vom Anwender validiert werden.

10. Warn- und Entsorgungshinweise

Humanes Ausgangsmaterial für die Produktion der Testreagenzien wurde auf HBsAg und Antikörper gegen HIV und HCV getestet. Nur negatives Material wurde für die Produktion verwendet. Trotzdem sollten sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden, da keine Testmethode alle infektiösen Krankheitserreger nachweisen kann. Für die Herstellung dieses Produkts verwendetes Rinderalbumin stammt von Tieren aus den USA, die von Veterinärinspektoren kontrolliert

und als krankheitsfrei deklariert wurden. Das TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy)-Risiko dieses von Rindern stammenden Produkts wird als gering betrachtet.

Beim Umgang mit biologischen Materialien werden angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen. Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Das Testreagenz enthält 0,1% NaN_3 als Konservierungsmittel. NaN_3 ist gesundheitsschädlich, wenn es inhaliert oder verschluckt wird oder in Kontakt mit der Haut und Schleimhäuten kommt (R- und S-Sätze s. Erläuterung der Symbole auf den Etiketten). Kupfer und Blei, die in einigen Rohrsystemen eingesetzt werden, können mit Azid explosive Salze bilden, deshalb sollte bei der Beseitigung von Azid-haltigem Material mit reichlich Wasser nachgespült werden.

Die Entsorgung aller Proben und Testmaterialien sollte entsprechend der gesetzlichen Richtlinien erfolgen.

11. Packungsgröße siehe Preisliste

12. Literatur

Cartron JP. Defining the Rh Blood Group Antigens. Blood Reviews 1994; 8:199-212

Garratty G et al. Spontaneous Agglutination of Red Cells with a Positive Direct Antiglobulin Test in Various Media. Transfusion 1984; 24:214-217

Issitt PD, Anstee DJ. Applied Blood Group Serology. 4th Edition. Montgomery Scientific. Durham SC. 1998

Levine P, Stetson RE. An Unusual Case of Intragroup Agglutination. J. Amer Med Assoc. 1939; 113:126-127

Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine. 6th Edition. Blackwell Science. Oxford. 1979

Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man. 6th Edition. Blackwell Scientific. Oxford. 1975

Technical manual of the American Association of Blood Banks, 15th ed., 2005

Thorpe SJ, Boulton CE, Stevenson FK et al. Cold Agglutination Activity is Common Among Human Monoclonal IgM Rh System Antibodies Using the V4-34 Heavy Chain Variable Gene Segment. Transfusion 1997; 37: 1111-1115












Westhoff CM, Shepherd BD, Toalson ID. Red cell antigen stability in K_3EDTA . Immunohematol 1993; 9:109-111

Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie); Aufgestellt vom wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer und vom Paul-Ehrlich-Institut, Fassung 2005

Immunhämatologie und Transfusionsmedizin, Reinhold Eckstein, 5. Auflage, Urban & Fischer bei Elsevier, 2005

Blutgruppen und Transfusion, M. Metaxas-Bühler, Verlag Hans Huber, 1994

Flegel AW, Northoff H, Wagner FF. Rhesus-D-Bestimmung beim Transfusionsempfänger
www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/MTA/

Erklärung der Symbole auf den Etiketten	
	In-vitro Diagnostikum
	Lagertemperatur
	Lot-Nr.
	Verwendbar bis
REF	Bestell-Nr.
	Gebrauchsinformation beachten
	Monoklonal IgM + IgG
	Klon
	Ursprung: human
	Enthält Natriumazid
	Titer
	Gesundheitsschädlich R 22-52/53, S 02-13-22-46-56-61

- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
S 22 Staub nicht einatmen.
S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen, Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Gebrauchsinformation	Stand: August 2007
----------------------	--------------------