
	<b>CE-Immundiagnostika GmbH</b> Karl-Landsteiner-Str. 6, D-69151 Neckargemünd Tel.: +49 6223-80094 00 Tel./fax: +49 6223-80094 99 www.ce-immundiagnostika.com	
	<b>Instrukcja używania</b> <b>Rev. 003/01-2022</b>	
Opis:	Nr katalogowy:	
<b>Anti-D TH-28/MS-26</b> (blend monoklonalny) 10 ml	07110	
<b>Anti-D 175 2-415 1 E4</b> (blend monoklonalny) 10 ml	07210	

Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro

## WSTĘP

Układ grupowy Rhesus został po raz pierwszy opisany w 1940 roku. Oprócz antygenów ABO, szczególne znaczenie kliniczne ma antygen D, ponieważ błąd w transfuzji krwi może spowodować ciężkie reakcje hemolityczne po przetoczeniu oraz chorobę hemolityczną płodu i noworodka (HDFN).

Rh dodatni (D poz.)/rhesus ujemny (D neg.) oznaczają, że antygen D jest odpowiednio obecny/nieobecny na powierzchni danej osoby.

### Rozmieszczenie antygeny D

Anty-D	Fenotyp	Rasa kaukaska %	Afrykanie Amerykanie %
+	Rh D dodatnie	85	72
-	Rh D ujemne	15	28

Tabela 1: Częstotliwość występowania antygenów według Mollisona i in.

## PRZEZNACZENIE

Anty D blend (monoklonalne IgM + IgG) jest przeznaczone do specyficznego i jakościowego wykrywania erytrocytów niosących odpowiedni antygen D (RH1) i nadaje się do stosowania w technikach szkiełkowych, płytkowych, mikropłytkowych i probówkowych.

Powyższe techniki opierają się na zasadzie bezpośredniej hemaglutynacji. Po dodaniu erytrocytów do anty-D blend (monoklonalne IgM + IgG) zachodzi specyficzna reakcja antygen-przeciwciała, jeśli odpowiedni antygen D (RH1) jest obecny na erytrocytach. Na tę reakcję wskazuje widoczna aglutynacja erytrocytów. Brak aglutynacji krwinek czerwonych wskazuje – biorąc pod uwagę ograniczenia metod badawczych – na brak odpowiedniego antygeny D (RH1).

Pośredni test antyglobulinowy służy do wykrywania D<sub>weak</sub>,

## INFORMACJA O PRODUKCIE

Anty D blend (monoklonalne IgM + IgG) jest mieszkanką ludzkich monoklonalnych anty D (IgM), klon D175-2 lub TH-28 oraz ludzkich monoklonalnych anty D (IgG), klon D415 1E4 lub MS-26.

Medium rozcieńczające dla tego odczynnika o niskiej zawartości białka zawiera następujące składniki wzmacniające: NaCl, BSA, bufor i kilka innych.

Konserwant: <0,1% azydek sodowy.

W przypadku stosowania zgodnie z instrukcją użycia, odczynnik aglutynuje ludzkie erytrocyty, jeśli odpowiedni antygen D (RH1) jest obecny.

Anty D blend (monoklonalne IgM + IgG) bezpośrednio aglutynuje czerwone krwinki z większości słabych D, które wcześniej prawdopodobnie były interpretowane jako Rh ujemne (lub słabe D). Obejmuje to również niektóre typy niezwykle rzadkich częściowych komórek D. Klony IgM anty-D D175-2 i TH-28 nie wykazują reaktywności z komórkami kategorii D VI, które były do tej pory testowane. Klony IgG D415 1E4 i MS-26 są zdolne do wywoływania reakcji z komórkami D kategorii VI. Odczynniki te zostały zoptymalizowane do użytku bez dalszego rozcieńczania lub dodatków.

Numer serii i data ważności są podane na etykiecie probówki.

## PRZECHOWYWANIE

Odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2-8°C do daty ważności podanej na etykiecie produktu. Po pierwszym otwarciu produktu ponownie szczelnie go zamknąć i przechowywać w temperaturze 2-8°C.

## POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

Próbki krwi należy pobierać aseptycznie do probówek z EDTA lub cytrynianem. Próbkę należy przetestować jak najszybciej po pobraniu. W przypadku opóźnienia w testowaniu, próbkę należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Próbki wykazujące hemolizę lub skażenie mikrobiologiczne nie powinny być

testowane, ponieważ może to skutkować fałszywie dodatnimi lub fałszywie ujemnymi wynikami.

Wszystkie próbki krwi należy dwukrotnie przemyć 0,9% roztworem NaCl przed badaniem metodą probówkową, płytkową lub mikropłytkową. Stosując technikę szkiełkową przygotować 35-45% zawiesinę badanych erytrocytów (krew pełna); stosując technikę płytkową użyć krew pełną lub przygotować 10% zawiesinę testowanych erytrocytów w 0,9% roztwór NaCl.

## OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Odczynniki te są przeznaczone wyłącznie do użytku laboratoryjnego do diagnostyki in vitro.
- Odczynniki te są przeznaczone do użytku przez upoważnionych operatorów przeszkolonych w zakresie technik serologicznych.
- Odczynniki te nie są przeznaczone do samodzielnego stosowania.
- Nie używać tych odczynników po upływie daty ważności.
- Wyrzucić zawartość uszkodzonych fiolek.
- Podczas korzystania z tych produktów należy nosić odzież ochronną, jak na przykład fartuch i jednorazowe rękawiczki.
- Odczynniki zostały przefiltrowane przez filtr 0,2 µm w celu zmniejszenia obciążenia biologicznego.
- Po otwarciu fiolki zawartość powinna zachować stabilność do daty ważności. Wyrzucić zawartość, jeśli po otwarciu pojawi się zmętnienie lub zanieczyszczenie.
- CE-Immundiagnostika GmbH nie gwarantuje, że produkty pochodzące od ludzi lub zwierząt są wolne od czynników zakaźnych. Należy zachować ostrożność podczas używania i usuwania każdej fiolki i jej zawartości.

## UTYLIZACJA ODCZYNNIKA I OGRANICZENIE WYCIEKU

Informacje na temat usuwania odczynnika i dekontaminacji miejsca rozlania znajdują się w Karcie Charakterystyki Mieszaniny, dostępnej na żądanie od CE-Immundiagnostika GmbH.

## KONTROLE I WSKAZÓWKI

- Erytrocyty będące kontrolą dodatnią i ujemną należy badać równolegle z każdą serią testów. Testy należy uznać za nieważne, jeśli kontrole nie wykazują oczekiwanych reakcji.
- Ponieważ odczynniki te nie zawierają potencjatorów wielkocząsteczkowych, jest bardzo mało prawdopodobne, że w komórkach pokrytych IgG wystąpią fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne reakcje.
- Słabe antygeny (częściowe D) mogą nie zostać zidentyfikowane.
- Objętość kropli uzyskana z zakraplacza do fiolek wynosi około 35-45 µl.
- Odczyt i interpretacja wyników musi być przeprowadzona przez odpowiednio przeszkolony i wykwalifikowany personel, zgodnie z wymogami kraju, w którym odczynniki są używane.
- Odczynniki te należy używać wyłącznie zgodnie z niniejszą instrukcją używania.

## MATERIAŁY I ODCZYNNIKI WYMAGANE

- 0,9% roztwór NaCl
- Szklane probówki
- Statyw na probówki
- Wirówka do probówek
- Pipety wolumetryczne
- Mikropłytki, wytrząsarka do płytek
- Płyta punktowa
- Szklane szkiełko mikroskopowe
- Bagietki do mieszania
- Erytrocyty kontrolne dodatnie i ujemne
- Czasomierz



## ZALECANE TECHNIKI

### A. TECHNIKA PROBÓWKOWA

1. Przygotować 2-4% zawiesinę erytrocytów w 0,9% roztworze NaCl.
2. Umieścić 1 objętość odczynnika i 1 objętość zawiesiny badanych erytrocytów w oznakowanej probówce.
3. Dokładnie wymieszać i od razu wirować przy 400 g przez 1 minutę (przy 1500 obr./min lub w innym odpowiednim czasie i z odpowiednią siłą).
4. Natychmiast odczytać wynik: delikatnie wstrząsnąć probówką, aby poruszyć osad erytrocytów z dna probówki i odczytać makroskopowo wynik aglutynacji; zapisać wynik.
5. Inkubować wszystkie ujemne lub słabo dodatnie wyniki przez 5 minut w temperaturze pokojowej (18-25°C), powtórzyć 3 i 4. Zapisać wyniki i siłę reakcji.

### POŚREDNI TEST ANTYGLOBULINOWY DO WYKRYWANIA SŁABYCH WARIANTÓW (D<sub>weak</sub>)

1. Przygotować 2-4% zawiesinę erytrocytów w 0,9% roztworze NaCl
2. Umieścić 1 objętość odczynnika i 1 objętość zawiesiny badanych erytrocytów w oznakowanej probówce.
3. Czas reakcji: 15 minut w 37°C.
4. Przepłukać 3 razy izotonicznym roztworem soli fizjologicznej.
5. Dodać 2 objętości odczynnika antyglobulinowego i wirować od razu przy 400 g przez 1 minutę (1500 obr./min lub z odpowiednim alternatywnym czasem i odpowiednią siłą).
6. Delikatnie wstrząsnąć probówką, aby poruszyć osad erytrocytów z dna probówki i odczytać makroskopowo wynik aglutynacji; zapisać wynik.
7. Obecność aglutynatów wskazuje na słabe D. Wszystkie ujemne reakcje powinny być testowane przy użyciu komórek uczulonych IgG (komórek kontrolnych Coombs'a) w celu przetestowania reaktywności surowicy AHG.

### B. TECHNIKA MIKROPŁYTOWA

#### Przygotowanie mikroplatek:

Mikroplateki wykonane przez różnych producentów/dostawców mają różne właściwości statyczne, które mogą powodować nieswoiste reakcje krwinek czerwonych i białek. Zaleca się wstępne przygotowanie nieużywanych mikroplatek przed użyciem, aby ograniczyć do minimum gromadzenie się czerwonych krwinek. Zalecamy stosowanie studzienek „U” wykonanych z tworzywa sztucznego.

1. Umieścić 1 objętość 22% albuminy wołowej (BSA) w odpowiednich dołkach.
2. Dokładnie wymieszać poprzez delikatne wstrząsanie lub używając wytrząsarki do mikroplatek, aby zapewnić równomierne pokrycie dołków.
3. Inkubować w temperaturze pokojowej (18-25°C) nie krócej niż 10 i nie dłużej niż 15 minut.
4. Wylać BSA i wyrzucić do odpowiedniego pojemnika na odpady.
5. Przepłukać mikroplatekę co najmniej 10 razy wodą z kranu.
6. Następnie dwukrotnie przepłukać mikroplatekę wodą destylowaną lub dejonizowaną.
7. Przechylić i potrząsnąć mikroplateką, aby usunąć nadmiar wody.
8. Przed użyciem pozostawić mikroplatekę do wyschnięcia.

Alternatywne techniki mogą być stosowane pod warunkiem, że zostały zatwierdzone przez użytkownika.

#### Procedura:

1. Przygotować 24% zawiesinę badanych erytrocytów w 0,9% roztworze NaCl. (Zalecenie: zawiesina 2%)
2. Przy użyciu zakraplacza z fiołki umieścić 30 µl odpowiedniego odczynnika w oznakowanych dołkach mikroplateki.
3. Dodać na mikroplatekę 30 µl przygotowanej wcześniej zawiesiny badanych erytrocytów.
4. Mieszać przez 30 sekund ręcznie lub za pomocą wytrząsarki.

5. Odwirować mikroplatekę przez 1 minutę przy 400 g (przy 1500 obr./min lub w innym odpowiednim czasie i z odpowiednią siłą).
6. W razie potrzeby krótko wstrząsnąć mikroplateką przy użyciu wytrząsarki.
7. Zapisać wynik i siłę reakcji, równolegle testując erytrocyty kontroli dodatniej i ujemnej. Urządzenia do odczytu, jeśli są używane, muszą być zatwierdzone. Korzystanie z dodatkowych środków wizualnych, takich jak lusterka lub szkła powiększające, może ułatwić odczyt wyników.

### C. TECHNIKA SZKIELKOWA

1. Z krwi pełnej przygotować 35-45% zawiesinę badanych erytrocytów.
2. Umieścić 1 objętość odczynnika i 1 objętość krwi pełnej na szkiełku.
3. Używając czystej bagietki, dokładnie wymieszać obie objętości na obszarze około 20x40mm.
4. Powoli poruszać szkiełkiem w przód i w tył.
5. Odczytać wynik makroskopowo po nie więcej niż 2 minutach i zapisać.
6. Nieprawidłowe postępowanie lub przekroczenie czasu inkubacji może prowadzić do artefaktów spowodowanych wysychaniem, a test należy uznać za nieważny.

### D. TECHNIKA PŁYTKOWA PUNKTOWA

1. Z krwi pełnej przygotować 35-45% zawiesinę badanych erytrocytów lub 10% zawiesinę badanych erytrocytów w 0,9% roztworze NaCl.
2. Umieścić 1 objętość odczynnika + 1 objętość zawiesiny badanych erytrocytów na płytce.
3. Używając czystej bagietki, dokładnie wymieszać obie objętości.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5-10 minut.
5. Odczytać wynik makroskopowo i zapisać.

Nieprawidłowe postępowanie lub przekroczenie czasu inkubacji może prowadzić do artefaktów spowodowanych wysychaniem.

### INTERPRETACJA WYNIKÓW BADAŃ

1. **Dodatni:** Aglutynacja badanych erytrocytów wskazuje, w ramach przyjętych ograniczeń procedury testowej (patrz poniżej), na obecność odpowiedniego antygeny D na badanych erytrocytach.
2. **Ujemny:** Brak aglutynacji badanych erytrocytów wskazuje, w ramach przyjętych ograniczeń procedury testowej (patrz poniżej), na brak odpowiedniego antygeny D na badanych erytrocytach.

**Rozbieżności:** Jeżeli wyniki uzyskane dla antygenów na badanych erytrocytach nie korelują z wykrytymi alloprzeciwciałami, wymagane są dalsze badania.

### OGRANICZENIA

1. Przechowywana krew może dawać słabsze reakcje niż świeża krew.
2. Wyniki fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne mogą również wystąpić z powodu:
  - a. Zanieczyszczenia materiałów testowych
  - b. Niewłaściwego przechowywania, stężenia erytrocytów, czasu inkubacji lub temperatury
  - c. Niewłaściwego wirowania
  - d. Odstępstwa od zalecanych technik
3. Podczas stosowania techniki płytkowej punktowej i próbek krwi pełnej może czasami wystąpić tworzenie się rulonów, które przypominają słabą aglutynację i mogą być interpretowane jako fałszywie dodatnia reakcja. Można spodziewać się powstawania rulonów we krwi z heparyną oraz u pacjentów leczonych ekspanderami osocza (np. dekstranem), jak również u pacjentów z plazmocytomą (wysoka zawartość białka, zmieniony skład białka), w zaburzeniach onkologicznych (nieprawidłowy hemogram) i zaburzeniach krzepnięcia. Próbkę krwi od tych pacjentów należy zawsze badać techniką probówkową, ponieważ tego zjawiska generalnie nie można wykazać podczas używania zawiesiny erytrocytów. Obecność słabych antygenów należy wykazać techniką probówkową, ze



**Instrukcja używania**

Rev. 003/01-2022

**Anti-D blend**

- względu na większą czułość, w stosownych przypadkach po 30 minutach inkubacji.
- Próbki krwi od pacjentów cierpiących na niektóre schorzenia mogą wykazywać reakcje fałszywie dodatnie/fałszywie ujemne. Probki krwi pępowinowej zanieczyszczone galaretką Whartona mogą wykazywać fałszywie dodatnie reakcje.
  - Do oznaczania antygenów D zawsze używać dwóch różnych klonów.

**STABILNOŚĆ REAKCJI**

- Odczytać wszystkie wyniki bezpośrednio po odwirowaniu probówek i mikropłytek.
- Wyniki testów szkiełkowych należy zinterpretować w ciągu 2 minut, aby zapewnić swoistość i uniknąć możliwości błędnego zinterpretowania wyniku ujemnego jako dodatniego z powodu wysuszenia odczynnika.
- Badania należy uznać za nieważne, jeżeli zostały przeprowadzone w temperaturach innych niż zalecane.

**CHARAKTERYSTYKI WYDAJNOŚCI**

- Odczynniki zostały przetestowane przy użyciu wszystkich zalecanych procedur.
- Każda SERIA odczynnika anti-D blend (monoklonalne IgM + IgG) jest badana zgodnie z wymaganiami Wspólnych Specyfikacji Technicznych dla wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro podanych w wykazie A Załącznika II do dyrektywy 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro i spełnia wymagania.
- Reaktywność każdej serii została sprawdzona przy użyciu panelu erytrocytów zgodnie z technikami zalecanymi w niniejszej instrukcji używania
- Swoistość przeciwciał monoklonalnych jest wykazana przy użyciu panelu erytrocytów antygenowo ujemnych.
- Kontrolę jakości odczynników przeprowadzono przy użyciu erytrocytów lub krwi pełnej, które zostały dwukrotnie przemyte 0,9% roztworem soli fizjologicznej.
- Przetestowano ponad 3000 próbek z czułością i swoistością >99%.

**ZASTRZEŻENIA**

- Użytkownik jest odpowiedzialny za działanie odczynników inną metodą niż zalecane.
- Wszelkie odstępstwa od zalecanych technik należy sprawdzić przed użyciem.

**LITERATURA**

- 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, 17th ed., 2011
- 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, Siphred BD, Toalson ID. Red cell antigen stability in K3EDTA. 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 2017

- Immunhämatologie und Transfusionsmedizin, Reinhold Eckstein / Robert Zimmermann, 6. Auflage, Urban & Fischer bei Elsevier, 2010
- 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/~wfliegel/RH/MTA/

**WYKAZ SYMBOLI**

	Numer serii		Tylko do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy		Przechowywać w temp. 2-8°C
	Data ważności		Wytwórca
	Zapoznaj się z instrukcją używania		

**NUMERY KATALOGOWE**

Nr kat.	Ilość
07110 Anti-D blend Th-28; MS-26	1 x 10ml 5 x 10ml 10 x 10ml 50 x 10ml
07210 Anti-D blend 175-2; 415 1E4	1 x 10ml 5 x 10ml 10 x 10ml 50 x 10ml

Dystrybutor:  
Hydrex Diagnostics Sp. z o.o.  
Aleja Stanów Zjednoczonych 61A  
04-028 Warszawa, Infolinia 801 000 977, [info@hydrex.pl](mailto:info@hydrex.pl)

Data tłumaczenia ulotki 07.12.2021  
Data aktualizacji ulotki: 04.05.2023