

DE GEBRAUCHSINFORMATION

Anti-D Blend

(IgM + IgG) monoklonal

CE 0123

REF 6785 1 x 10 ml

REF 6786 10 x 10 ml

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-healthcare.com

IN VITRO DIAGNOSTIKUM

1. Produktbeschreibung

Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal besteht aus humanem monoklonalen Anti-D (IgM) (Klon D175-2) und humanem monoklonalen Anti-D (IgG) (Klon D415 1E4). Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal dient zum spezifischen, qualitativen Nachweis des korrespondierenden D (RH1) 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 0,1% NaN₃ zugesetzt.

Jedes Lot Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal wurde entsprechend den Anforderungen der Gemeinsamen Technischen Spezifikationen für Produkte nach Annex II, Liste A der Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über In vitro Diagnostika getestet und erfüllt die Anforderungen. Wenn das Reagenz in Übereinstimmung mit der Gebrauchsinformation eingesetzt wird, agglutiniert es humane Erythrozyten, wenn das korrespondierende D (RH1) Antigen vorhanden ist.

Die Reaktivität jedes Lots wird mit einem Erythrozyten-Panel in Übereinstimmung mit den in dieser Gebrauchsinformation empfohlenen Testmethoden überprüft.

Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal erkennt viele Zellen mit einem D weak Phänotyp, die vorher möglicherweise als Rh negativ (oder weak D) interpretiert wurden, durch direkte Agglutination. Dies schließt auch einige Typen von sehr seltenen Partial D-Zellen ein. 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 Spezifität jedes Lots wird im Röhrchentest mit einem Panel von Zellen überprüft, die negativ für das D (RH1) Antigen sind. Auf Antikörper gegen Antigene mit niedriger Frequenz wird 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 (RH1) 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 (RH1) 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

Für die Probennahme ist keine besondere Vorbereitung des Patienten bzw. des Spenders notwendig. Die Blutproben sollten entsprechend den üblichen aseptischen 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, Glas oder Polystyren)
Einweg-Pasteur-Pipetten
Zentrifuge (900-1000 x g)
Testerythrozyten mit bekanntem Rh-Phänotyp
Anti-Humanglobulin
IgG-beladene Testerythrozyten (Coombs Control)

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 Testreagenz geben.
3. 1 oder 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. Darauf achten, dass Eintrocknungserscheinungen am Rand oder Fibrinstränge eine positive Reaktion vortäuschen können.
5. Wenn der Test negativ ausfällt und eine Testung auf D weak erforderlich ist, einen D weak Test mit der modifizierten indirekten Coombs-Test-Methode (wie unten beschrieben) durchführen.

Wichtiger Hinweis zur Rhesus-D-Bestimmung auf dem Objektträger

Die Rhesus-D-Bestimmung auf dem Objektträger ist nicht ausreichend sensitiv für einen zuverlässigen Nachweis von schwachen Antigenen und daher als Verfahren der Rhesus-D-Blutgruppenbestimmung nicht zu empfehlen. Der Objektträgertest kann aber als Inhaltskontrolle benutzt werden.

Die Objektträger nicht auf erwärmte Oberflächen stellen!

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 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.

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 sind zur Kontrolle mitzuführen. Um eine Spontanagglutination ausschließen zu können, wird empfohlen, als Kontrolle mit 6-8% BSA oder autologem Serum oder Plasma parallel zu testen.

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 durchführen (D weak-Test).

Die Aktivität und Spezifität der Testreagenzien muss regelmäßig mit bekannten D-positiven und D-negativen-Erythrozyten kontrolliert werden. Es wird empfohlen dafür auch Erythrozyten einzusetzen, die das D (RH1) Antigen nur schwach exprimieren, und, wenn möglich, heterozygote Zellen zu benutzen.

Für die Kontrollintervalle sind die gesetzlichen Vorgaben zu beachten.

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 und 1 Tropfen der Erythrozytensuspension in einem beschrifteten Röhrchen mischen.
3. Das Röhrchen 15 Minuten bei 37°C (\pm 1°C) inkubieren.
4. Die Erythrozyten einmal mit isotonischer NaCl waschen und den Überstand vollständig dekantieren, sodass man ein „trockenes“ Erythrozytensediment erhält.
5. Zu dem Erythrozytensediment 2 Tropfen polyspezifisches Anti-Humanglobulin oder Anti-IgG geben (entsprechend den Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation des Anti-Humanglobulins) und vorsichtig aber gründlich mischen.
6. Sofort 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 (RH1) 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 (RH1) Antigens 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 BSA-Kontrolle
- 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 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. Die Rhesus-D-Bestimmung auf dem Objektträger ist vergleichsweise weniger sensitiv und als Verfahren der Rhesus-D-Blutgruppenbestimmung nicht zu empfehlen. Der Objektträgeretest kann aber als Inhaltskontrolle benutzt werden.
6. Ein positives Ergebnis im Modifizierten Indirekten Coombs-Test muss mit geeigneten Kontrollen (z. B. 6-8% BSA) durch einen negativen Direkten Antiglobulin-Test oder einen negativen Indirekten Antiglobulin-Test abgesichert werden.
7. 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** (BAG-SSP-Kits zur Bestimmung der RH-Eigenschaften auf molekulargenetischer Basis) oder **ERY SPOT® Weak D-TYPE** (BAG-SSO-Kit für den Nachweis von Allelen des Rhesus-D Antigens auf molekulargenetischer Basis) erfolgen.
8. Einige Erythrozyten weisen Partial-D-Antigene auf, denen spezifische Epitope fehlen. Mit Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal können nicht alle Partial-D-Antigene nachgewiesen werden. Das Testreagenz kann aber 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.
9. 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.
10. 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.
11. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoklonal darf nicht für die Testung von enzymbehandelten 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.
12. Falsch negative oder unerwartet schwache Reaktionen können auch durch zu lange Lagerung und/oder ungeeignete Lagerbedingungen der Erythrozyten verursacht werden.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. Für die Bestimmung von RHD muss die Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer und vom Paul-Ehrlich-Institut beachtet werden.
18. Anti-D Blend (IgM + IgG) nicht verdünnen und nur wie in dieser Gebrauchsinformation angegeben einsetzen. Abweichungen von der vorliegenden Gebrauchsinformation können zu einer nicht optimalen Produktleistung führen. 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, 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).

Die Tropfsaughütchen der Fläschchen enthalten Latex. Latex kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Das Testreagenz enthält 0,1% NaN_3 als Konservierungsmittel. Natriumazid ist toxisch. Nicht schlucken und Kontakt mit der Haut und Schleimhäuten vermeiden. 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, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der regionalen Behörden erfolgen.

Ein Sicherheitsdatenblatt (SDS) kann unter www.bag-healthcare.com heruntergeladen werden.

11. 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, 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, Sipherd 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/~wflegel/RH/MTA/

Gebrauchsinformation	Version: 5/2018 / Stand: 2018-08
----------------------	----------------------------------



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49(0) 6404/925-0
Fax: +49(0) 6404/925-250

www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49(0) 6404/925-450
Fax: +49(0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:

Tel.: +49(0) 6404/925-125
Fax: +49(0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com

EN INSTRUCTIONS FOR USE

Anti-D Blend

(IgM + IgG) monoclonal

CE 0123

REF 6785 1 x 10 ml

REF 6786 10 x 10 ml

Electronic Instructions for use see www.bag-healthcare.com

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

1. Produkt Description

Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal contains human monoclonal Anti-D (IgM), Clone D175-2, and human monoclonal Anti-D (IgG), Clone D415 1E4. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal is designed for use in slide and tube tests; and provides a specific, qualitative test for the detection of the corresponding D (RH1) antigen on human red blood cells.

The diluent used for this low protein reagent contains NaCl, BSA, a buffer and other selected components to enhance the performance of the reagent. NaN₃ at a final concentration of 0.1% is added as a preservative.

Each lot Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal has been tested according to methods recommended by the US FDA. The reagent meets the requirements of the Common Technical Specifications for products defined in Annex II, List A of Directive 98/79/EC on in vitro Diagnostic Medical Devices. When used in accordance with the recommended Instructions for Use the reagent has been tested and found to specifically agglutinate human red cells if the corresponding D (RH1) antigen is present.

The reactivity of each lot Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal has been verified with a panel of red cells tested in accordance with the recommended Instructions for Use.

Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal has demonstrated the ability to detect many cells of weak D phenotype by direct hemagglutination, which may previously have been interpreted as Rh negative (or weak D). This may include some types of unusual partial D cells that occur very rarely. The monoclonal IgM Anti-D clone D175-2 has not demonstrated reactivity with any D Category VI cell tested to date. The monoclonal IgG Anti-D clone D415 1E4 reacts with D Category VI.

The specificity of each lot has been verified by the recommended tube test method demonstrated with a panel of cells negative for the D (RH1) antigen. When suitable test cells are available, the presence of antibodies to low frequency antigens are excluded in routine specificity testing.

2. Principle Of The Test

The test used with this blood grouping reagent is based on the principle of direct hemagglutination. Incubation of test red cells with Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal will result in a specific antigen-antibody reaction if the corresponding D antigen (RH1) is present on the red cells. Visible detection of this reaction is demonstrated by agglutination of the cells. No agglutination indicates a negative test result, and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the absence of the corresponding D (RH1) antigen on the test red cells.

3. Storage and Shelf Life

Store Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal at 2...8°C. Do not freeze! Allow Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal to reach room temperature (18...25°C) before use. Return reagent to 2...8°C for storage as appropriate, immediately after use.

Once Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal has been opened the first time, the test reagent may be used up to the expiration date indicated on the label if the specified storage conditions are observed and no turbidity or other signs of contamination are observed. Do not use the reagent after the expiry date printed on the label. Do not use contaminated reagents!

4. Specimen Preparation

No special preparation of the patient/donor is required prior to specimen collection. Blood samples should be collected by approved aseptic medical procedures. Blood samples may be collected with or without anticoagulant if testing is performed without delay. If a delay in testing is unavoidable, red cells from clotted samples, or EDTA anticoagulated samples may be tested up to 14 days from date of collection. ACD, CPD and CPDA-1 anticoagulated blood samples may be tested up to their expiration date. All red cell samples should be stored appropriately at 2...8°C. A red cell preservative solution may be used for prolonged storage of red cells.

Prolonged storage of red cells prior to testing may result in deterioration of red cell antigens and resultant weaker than expected test reactions.

5. Additional Materials Required

Isotonic saline, pH 6.5 – 7.5

Glass slides and applicator sticks for mixing

Test tubes (75 x 12 mm, glass or polystyrene)

Single-use Pasteur pipettes

Centrifuge (900 – 1000 rcf)

Control red cells of known Rh phenotype

Anti-Human Globulin

IgG sensitized control cells (Coombs Control)

6. Test Procedure

Slide Test Method

1. Prepare a 35 - 45% suspension of test red cells in isotonic saline.
2. Place 1 drop of test reagent on a labelled slide.
3. Add 1 or 2 drops of the prepared suspension of test red cells and mix thoroughly with a clean stick over an oval area of approximately 20 x 40 mm.
4. Slowly tilt the slide back and forth and examine for macroscopic hemagglutination within 2 minutes. Care should be taken not to mistake peripheral drying or fibrin strands as agglutination.
5. If the test is negative and a test for weak D is required, test according to the weak D Test Method.

Important notice for Rhesus-D-Determination on slides

The slide test method may not be sufficiently sensitive for reliable detection of weakened antigen expression and therefore not to be recommended. However, the slide test may be used for product control.

Do not place slides on heated surfaces.

Tube Test Method

1. Wash the test red cells with isotonic saline and prepare a 2 - 4% suspension of test red cells in isotonic saline.
2. Place 1 drop of test reagent and 1 drop of the prepared suspension of test red cells into a labelled test tube and mix thoroughly.
3. Centrifuge for 15 – 30 seconds at 900 - 1000 rcf or centrifugation of equivalent force.
4. Resuspend the cells by gently shaking the tube and examine macroscopically for agglutination.

Please note:

Do not examine tests microscopically.

Weak reactions with Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal may be enhanced following a 5 minute incubation at ambient room temperature (~18...25°C) and centrifugation as in steps 3 and 4 above.

Red blood cell suspensions known to be positive and negative for the D antigen should always be included in the test. For excluding spontaneous red cell aggregation, a control consisting of 6-8% BSA or autologous serum or plasma should be tested in parallel.

Use at least two different Anti-D test reagents to determine the D antigen. By use of two monoclonal test reagents two different clones should be used.

If the reaction is negative or doubtful the Modified Indirect Antiglobulin Test (Weak D Test) is required.

It is strongly recommended that the reactivity and specificity of the reagents be confirmed in regular intervals by control tests with known antigen positive and negative red cells (see statutory and local provisions). Positive cells should be selected to represent weak expression of the specific antigen and, when applicable, appropriate cells should be selected from heterozygous donors whose red cells express a single dose of the respective antigen.

Modified Indirect Antiglobulin Test Method (Weak D Test Method)

1. Prepare a 2 - 4% suspension of washed test red cells. Red cells should be well washed at least once and resuspended in isotonic saline.
2. Place 1 drop of test reagent and 1 drop of the prepared suspension of test red cells into a labelled test tube and mix thoroughly.
3. Incubate the tube for 15 minutes at 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).
4. Wash the cells once with isotonic saline and decant the supernatant completely to ensure the removal of residual saline and a resultant "dry" red cell button.
5. Add 2 drops of polyspecific Anti-Human Globulin or Anti-IgG to the "dry" bottom of cells (refer to the manufacturer's Instructions for Use for Anti-Human Globulin) and mix gently but thoroughly.
6. Centrifuge without delay for 15 seconds at 900 - 1000 rcf or centrifugation of equivalent force.
7. Resuspend the cells by gently shaking the tube and examine macroscopically for agglutination.
8. Confirm the validity of negative or only weak results with IgG sensitized control cells in accordance with the manufacturer's Instructions for Use.

Please note:

Do not examine tests microscopically.

Red blood cell suspensions known to be D weak and known to be negative for the D antigen should always be included in the test.

Cells should not be used unwashed or suspended in plasma or serum for this test procedure.

7. Interpretation Of Test Results

Agglutination of test red cells with Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal indicates the presence of the corresponding D (RH1) antigen within the accepted limitations of the test procedure. Very weak positive reactions may indicate the presence of quantitatively weak D or partial D antigen. Agglutination of test red cells with Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal by weak D test procedure only (indirect antiglobulin test), indicates that the red cells are of the weak D phenotype. An Indirect Antiglobulin Test result with cells that demonstrate a positive Direct Antiglobulin Test cannot be reliably interpreted with respect to weak D.

No agglutination of test red cells with Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal indicates the absence of the corresponding D (RH1) antigen within the accepted limitations of the test procedure.

When the controls react as followed, the test results cannot be interpreted:

- no agglutination with the test red cells known to be positive for the D antigen
- agglutination with the test red cells known to be negative for the D antigen
- agglutination with the BSA control
- agglutination with the patient control
- no agglutination with IgG sensitized control cells added to a negative Indirect Antiglobulin Test

If different test results occur with two different test reagents, repeat the determination of the D antigen with a different test method and/or a different test reagent.

Pay attention to the limitations of procedure and important directions (s. 9. Important Directions / Limitations of procedure).

8. Stability Of The Reaction

All test results should be interpreted immediately upon completion of the test.

9. Important Directions/Limitations of Procedure

1. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal is designed for in vitro diagnostic use only and should be used by properly trained, qualified staff.
2. On rare occasion, red cells coated in vivo with immunoglobulin may agglutinate spontaneously and non-specifically in some reagent media. This phenomenon is usually associated with reagents formulated with high protein and macromolecular additives. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal is formulated in a low protein medium which does not promote spontaneous agglutination. However, very rarely, examples of red cells heavily coated with immunoglobulin may agglutinate non-specifically in this medium. In such instances similar phenomena would most likely occur in the ABO grouping test as well. If the test cells are reactive with anti-A, anti-B and anti-D, an additional control may be desirable. A control test consisting of either 6 - 8% BSA or patient serum/plasma may be suitable. If the control test yields a positive reaction, a valid interpretation of the Rh typing result cannot be made.
3. The use of unwashed test red cells suspended in plasma or serum may promote false positive reactions such as those associated with rouleaux formation or autoantibodies. The routine use of well washed, saline suspended red cells for tube tests may reduce the incidence of such false positive reactions.
4. Unwashed red cells or cells suspended in autologous serum or plasma must not be used in the Modified Indirect Antiglobulin Test for weak D detection as outlined herein; this could result in partial neutralization of the Anti-Human Globulin due to the abbreviated wash procedure and resultant weak or false negative results. If unwashed red cells are used, three to four sequential washing steps would be required to remove residual serum IgG sufficiently to perform an effective antiglobulin test.

5. Rhesus-D-determinations on slides are comparably less sensitive and therefore not to be recommended. However, the slide test may be used for product control.
6. A positive Indirect Antiglobulin Test for weak D must be validated by a macroscopically negative Direct Antiglobulin Test or a negative Indirect Antiglobulin Test using an appropriate control (i.e. 6 - 8% BSA).
7. Some red cells may express quantitatively weak and/or partial D (RH1) antigen and may therefore demonstrate weaker than expected reactions with Anti-D. Further clarification and specification of the result can be carried out with **BAGene** (BAG-SSP kits for the determination of Rh attributes on a molecular genetic basis) or **ERY SPOT® Weak D-TYPE** (BAG-SSO kit for typing of the alleles of the the Rhesus D system on a molecular genetic basis).
8. Rare examples of red cells may express unusual forms of the D (RH1) antigen that lack specific epitopes (partial D). Anti D Blend (IgM + IgG) monoclonal will not detect all examples of partial D. In addition, this reagent may react with weak D cells and rare examples of partial D cells (i.e. R₀^{Har}, Crawford phenotype etc.) that may have previously been tested and interpreted as Rh negative using other sources of Anti-D.
9. The monoclonal IgM Anti-D clone D175-2 has not demonstrated reactivity with any D Category VI cell tested to date. The monoclonal IgG Anti-D clone D415 1E4 reacts with D Category VI.
10. Delays in reading tests, overvigorous resuspension of red cell buttons, and other technique variables associated with test performance may result in weaker than expected, or false negative test results.
11. Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal must not be used to test enzyme treated red cells. Furthermore, to minimize other risks for false positive reactions, this reagent must not be tested when cold. Ensure that this reagent and any test cell samples are allowed to equilibrate to ambient room temperature (18...25°C) prior to testing.
12. False negative or unexpectedly weak reactions may occur with red cells that have been subjected to prolonged and/or inappropriate storage conditions.
13. Other variables such as improper technique, inappropriate centrifugation or incubation, improperly cleaned glassware, incorrect saline pH and/or contaminated materials may cause false negative or false positive results.
14. The centrifugal force applied should be the minimum required to produce a clear supernatant and a clearly delineated red cell button that can be easily resuspended. No single centrifugation speed or time can be recommended for all types of available centrifuges or test applications. Centrifuges should be calibrated individually to determine the optimal time and speed required to achieve the desired results.
15. Microbiological contamination of Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal must be avoided as this may reduce the shelf life of the product and cause erroneous results. Do not use Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal if marked turbidity or other observable indications of product alteration occur. These signs may indicate microbiological contamination and/or product deterioration.
16. Whether transfusions or transplantation have taken place should always be taken into consideration when interpreting the results. Any history of transfusions and/or transplantation, as well as the patient's medication history, should be taken into consideration when interpreting results.
17. The country-specific transfusion laws and/or directives (current laws or directives on transfusion medicine and blood group determination) must be taken into account.
18. Do not dilute Anti-D Blend (IgM + IgG) monoclonal. Use as supplied and as described in this Instructions for Use. Deviation from the recommended Instructions for Use may result in less than optimal product performance. Any deviation must be validated by the user.

10. Warnings and Precautions

Human source material used to produce this reagent has been tested and found negative for HBsAg and HIV and HCV antibodies. Nevertheless all used biological material should be handled as potentially infectious, because no test method can guarantee that products derived from biological sources are free from infectious agents. Any bovine albumin used in the manufacture of this product is sourced from donor animals that have been inspected and certified by veterinary service inspectors to be disease-free. This ruminant-based product is deemed to have low TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) risk.

When handling biological material appropriate safety precautions are recommended (do not pipette by mouth; wear disposable gloves while handling biological material and performing the test; disinfect hands when finished the test).

Biological material should be inactivated before disposal (e.g. in an autoclave). Disposables should be autoclaved or incinerated after use. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated areas swabbed with a suitable standard disinfectant or 70% alcohol. Material used to clean spills, including gloves, should be inactivated before disposal (e.g. in an autoclave).

The dropper bulbs of these products contain natural rubber latex, which is known to cause allergic reactions in some individuals.

The reagent contains 0.1% NaN₃. Sodium Azide is toxic. Do not ingest, avoid contact with the skin and mucous membranes. The copper and lead used in some plumbing systems can react with azides to form explosive salts. Therefore, when disposing of azide-containing materials, they should be flushed away with a large volume of water.

Disposal of all samples, unused reagents and waste should be in accordance with country, federal, state and local regulations.

A Material Safety Data Sheets (MSDS) is available to download at www.bag-healthcare.com.

11. References

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








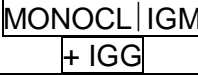





Westhoff CM, Sipherd BD, Toalson ID. Red cell antigen stability in K₃EDTA. *Immunohematol* 1993; 9:109-111

Instructions for use	Version: 5/2018 / Issue: 2018-08
----------------------	----------------------------------

Instructions for use in other languages see:

<http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/>

or phone +49 (0) 6404-925-125

Erklärung der Symbole auf den Etiketten / <i>Explanation of symbols used on Labelling</i>	
	In-vitro-Diagnostikum / <i>For in vitro diagnostic use</i>
	Hersteller / <i>Manufacturer</i>
	Lagertemperatur / Temperaturbegrenzung <i>Storage temperature / Temperature limitation</i>
	Lot-Nr. / <i>Batch code</i>
	Verwendbar bis / <i>Use by</i>
	Bestell-Nr. / <i>Catalogue number</i>
	Gebrauchsinformation beachten / <i>Consult instructions for use</i>
	Monoklonal IgM + IgG / <i>Monoclonal IgM + IgG</i>
	Klon / <i>Clone</i>
	Ursprung: human / <i>Origin: human</i>
	Enthält Natriumazid / <i>Contains Natriumazide</i>
	Titer / <i>Titer</i>
	<p style="text-align: center;">Achtung / <i>Warning</i></p> <p>H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken <i>Harmful if swallowed</i></p> <p>P301 + P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen <i>IF SWALLOWED:</i> <i>Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell</i></p> <p>P264 Nach Gebrauch Hände gründlich waschen <i>Wash hands thoroughly after handling</i></p> <p>P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen <i>Do not eat, drink or smoke when using this product</i></p> <p>P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden <i>Use personal protective equipment as required</i></p>