

 CE-Immundiagnostika GmbH Karl-Landsteiner-Str. 6, D-69151 Neckargemünd Telefon: Telefon: +49 6223-80094 00 Fax: +49 6223-80094 00 +49 6223-80094 99 www.ce-immundiagnostika.com		
Návod k použití		
Rev. 002/07/2021		
Popis		REF
Anti D RUM-1 (monoklonální) 10ml		06210
Anti D MS-201 (monoklonální) 10ml		06110

DIAGNOSTICKÝ ZDRAVOTNICKÝ PROSTŘEDEK *IN VITRO*

SHRNUTÍ

Systém krevních skupin rhesus byl poprvé popsán v roce 1940. Kromě antigenů ABO má zvláštní klinický význam antigen D, protože chyba při transfuzi krve může způsobit závažné hemolytické potransfuzní reakce a hemolytickou nemoc plodu a novorozence (HDFN).

Rhesus pozitivní (D pozitivní)/rhesus negativní (D negativní) znamená, že na povrchu erytrocytů jedince je/není přítomen antigen D.

Distribuce antigenu D

Anti D	Fenotyp	béloši %	Afroameričané %
+	Rh D pozitivní	85	72
-	Rh D negativní	15	28

Tabulka 1: Frekvence antigenů podle Mollisona et al.

URČENÉ POUŽITÍ

Anti D (monoklonální IgM) je určen pro specifickou a kvalitativní detekci erytrocytů, které nesou odpovídající antigen D (RH1), a je vhodný pro použití technikou na sklíčku, bodové destičce, mikrodestičce a ve zkumavce.

Výše uvedené techniky jsou založeny na principu přímé hemaglutinace. Po přidání erytrocytů k anti D (monoklonálnímu IgM) dojde ke specifické reakci antigen-protilátka, pokud je na erytrocytech přítomen odpovídající antigen D (RH1). Tato reakce se projeví snadno viditelnou aglutinací erytrocytů. Absence aglutinace erytrocytů prokazuje - s ohledem na omezení testovacích metod - nepřítomnost odpovídajícího antigenu D (RH1).

Oba klony rozpoznávají většinu D_{weak} variant s výjimkou D VI.

INFORMACE O PRODUKTU

Monoklonální anti D činidla typu IgM se získávají z lidských hybridomových buněk.

Ředící médium pro toto činidlo s nízkým obsahem bílkovin obsahuje následující potenciátory: NaCl, BSA, pufr a některé další vybrané složky. Konzervační látka: < 0,1 % azidu sodného.

Při použití v souladu s návodem k použití reagencie aglutinuje lidské erytrocyty, pokud je přítomen odpovídající antigen D (RH1).

Anti D (monoklonální IgM) rozpozná a přímo aglutinuje mnoho červených krvinek se slabým fenotypem D, které byly dříve pravděpodobně interpretovány jako Rh negativní (nebo slabé D). Patří sem také některé typy extrémně vzácných parciálních D krvinek. Klony IgM anti D nevykazují žádnou reaktivitu s dosud testovanými krvinkami kategorie D VI. Slabé varianty lze detekovat pouze pomocí zkumavkové a mikrotitrační techniky.

Specifita každé šarže je prokázána pomocí zkumavkové techniky a panelu D (RH1) antigen negativních erytrocytů.

Tato antiséra byla optimalizována pro použití bez dalšího ředění nebo aditiv.

Číslo šarže a datum použitelnosti jsou uvedeny na štítku lahvičky.

SKLADOVÁNÍ

Testovací činidla skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C do data použitelnosti uvedeného na štítku výrobku. Po prvním otevření přípravku jej opět těsně uzavřete a skladujte při teplotě 2°C-8°C.

ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Vzorky krve by měly být odebírány asepticky do zkumavek s EDTA nebo citrátem. Vzorek by měl být testován co nejdříve po odběru. Pokud dojde k opoždění testování, uchovávejte vzorek při teplotě 2 °C až 8 °C. Vzorky vykazující hemolýzu nebo mikrobiální kontaminaci by neměly být tímto činidlem testovány, protože to může vést k falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům.

Všechny vzorky krve by měly být před testováním technikou ve zkumavce, na bodové destičce a mikrodestičce dvakrát promyty 0,9% roztokem NaCl. Při použití sklíčkové techniky připravte 35-45% suspenzi testovaných erytrocytů (plná krev).

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Tato činidla jsou určena pouze pro použití v diagnostických laboratořích *in vitro*.
2. Tato činidla jsou určena pro použití autorizovanými pracovníky vyškolenými v sérologických technikách.
3. Tato činidla nejsou určena k vnitřnímu použití.
4. Nepoužívejte tato činidla po uplynutí doby použitelnosti.
5. Obsah poškozených lahvíček zlikvidujte.
6. Při manipulaci s těmito produkty používejte ochranné pomůcky, například laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
7. Testovací séra byla filtrována přes 0,2µm kapsli, aby se snížila biologická zátěž.
8. Po otevření lahvičky by měl obsah zůstat použitelný až do data expirace. Pokud se po otevření objeví zákal nebo kontaminace, obsah zlikvidujte.
9. Společnost CE-Immundiagnostika GmbH nemůže zaručit, že produkty pocházející z lidských nebo zvířecích zdrojů neobsahují infekční agens. Při používání a likvidaci každé lahvičky a jejího obsahu je třeba postupovat opatrně.

LIKVIDACE ČINIDLA A ODSTRAŇOVÁNÍ ROZLITÝCH LÁTEK.

Informace o likvidaci činidla a dekontaminaci místa rozlití naleznete v bezpečnostním listu, který je k dispozici na vyžádání u společnosti CE-Immundiagnostika GmbH.

KONTROLY A PORADENSTVÍ

1. Pozitivní a negativní kontrolní erytrocyty se testují souběžně s každou šarží testů. Pokud kontroly nevykazují očekávané reakce, musí být testy považovány za neplatné.
2. Protože tato činidla neobsahují makromolekulární potenciátory, je velmi nepravděpodobné, že by u krvinek potažených IgG docházelo k falešně pozitivním nebo falešně negativním reakcím.
3. Slabé antigeny (parciální D) nemusí být identifikovány.
4. 1 objem je přibližně 35-45 µl při použití dodaného kapátka.
5. Odečítání a interpretaci výsledků musí provádět řádně vyškolený a kvalifikovaný personál v souladu s požadavky země, kde se činidla používají.
6. Tato činidla by se měla používat pouze podle tohoto návodu k použití.

POTŘEBNÝ MATERIÁL A ČINIDLA

- 0,9% roztok NaCl
- Skleněné zkumavky
- Stojan na zkumavky
- Odstředivka na zkumavky
- Odměrné pipety
- Mikrotitrační destičky, třepačka na destičky
- Bodová deska
- Skleněné mikroskopické sklíčko



CE-Immundiagnostika GmbH

Karl-Landsteiner-Str. 6, D-69151 Neckargemünd

Telefon: Telefon: +49 6223-80094 00 Fax: +49 6223-80094 00 +49 6223-80094 99

www.ce-immundiagnostika.com



Návod k použití

Rev. 002/07/2021

Anti D

- Aplikační tyčinka
- Pozitivní a negativní kontrolní erytrocyty
- Stopky

DOPORUČENÉ TECHNIKY

A. ZKUMAVKOVÁ TECHNIKA

1. Připravte 2-4% suspenzi erytrocytů v 0,9% roztoku NaCl.
2. Do označené zkumavky nakapejte 1 objem reagentie a 1 objem suspenze testovaných erytrocytů.
3. Důkladně promíchejte a ihned odstředte při 400 g po dobu 1 minuty (při 1500 otáčkách za minutu nebo při vhodném jiném čase a síle).
4. Ihned odečtěte výsledek: Jemně promíchejte zkumavku, aby se sediment erytrocytů uvolnil ze dna zkumavky, a makroskopicky odečtěte aglutinaci; výsledek zaznamenejte.
5. Všechny negativní nebo slabě pozitivní výsledky inkubujte 15 minut při pokojové teplotě (18-25 °C) a poté opakujte body 3. a 4. Zaznamenejte výsledek a intenzitu reakce.

B. TECHNIKA MIKROTIČKAČNÍCH DESTIČEK

Příprava mikrodestiček:

Mikrodestičky různých výrobců/dodavatelů mají různé statické vlastnosti, které mohou vést k nespecifickým reakcím červených krvinek a proteinů. Před použitím je vhodné nové mikrodestičky předem ošetřit, aby se snížila nespecifická vazba červených krvinek na minimum. Doporučujeme používat jamky tvaru "U" z plastového materiálu.

1. Do příslušných jamek umístěte 1 objem 22% hovězího albuminu (BSA).
2. Důkladně promíchejte nebo použijte třepačku mikrotitračních destiček, abyste zajistili rovnoměrné pokrytí jamek.
3. Inkubujte při pokojové teplotě (18-25 °C) nejméně 10 a nejvýše 15 minut.
4. Odstraňte BSA do vhodné nádoby na odpad.
5. Mikrotitrační destičku propláchněte alespoň 10krát vodou z vodovodu.
6. Poté mikrodestičku dvakrát opláchněte destilovanou nebo deionizovanou vodou.
7. Nakloňte mikrotitrační destičku, abyste z ní odstranili přebytečnou vodu.
8. Před použitím nechte mikrodestičku zaschnout.

Alternativní techniky lze použít za předpokladu, že byly ověřeny uživatelem.

Postup:

1. Připravte 2 - 4% suspenzi testovaných erytrocytů v 0,9% roztoku NaCl.
2. Do označených jamek mikrotitrační destičky umístěte 30 µl příslušného antiséra.
3. Přidejte 30 µl předem připravené suspenze testovaných erytrocytů na mikrotitrační destičku.
4. Míchejte 30 sekund ručně nebo pomocí třepačky.
5. Odstředte mikrodestičku 1 minutu při 400 g (při 1500 otáčkách za minutu nebo při vhodném jiném čase a síle).
6. V případě potřeby krátce promíchejte mikrodestičku pomocí třepačky.
7. Ihned zaznamenejte výsledek a intenzitu reakce a paralelně testujte pozitivní a negativní kontrolní erytrocyty. Čtecí zařízení, pokud jsou použita, musí být validována. Použití dalších vizuálních pomůcek, jako jsou například zrcátka nebo lupy, může usnadnit čtení výsledků.

C. SKLÍČKOVÁ TECHNIKA

1. Použitím plné krve připravte 35-45% suspenzi testovaných erytrocytů.
2. Na sklíčko umístěte 1 objem reagentie a 1 objem suspenze krvinek.
3. Pomocí čisté aplikační tyčinky důkladně promíchejte oba objemy na ploše asi 20x40 mm.
4. Pomalu pohybujte sklíčkem dopředu a dozadu.
5. Nejpozději po 2 minutách proveďte makroskopický odečet a záznam.
6. Nesprávná manipulace nebo příliš dlouhá doba inkubace může vést k artefaktům způsobeným vysycháním a test musí být považován za neplatný.

D. TECHNIKA NA BODOVÝCH DESTIČKÁCH

1. Použitím plné krve připravte 35-45% suspenzi testovaných erytrocytů nebo 10% suspenzi testovaných erytrocytů v 0,9% roztoku NaCl.
2. Na bodovou destičku umístěte 1 objem antiséra + 1 objem suspenze testovaných erytrocytů.
3. Pomocí čisté aplikační tyčinky důkladně promíchejte oba objemy.
4. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5-10 minut.
5. Makroskopicky odečtěte a zaznamenejte.

Nesprávná manipulace nebo příliš dlouhá doba inkubace může vést k artefaktům způsobeným vysycháním.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTŮ

1. **Pozitivní:** Aglutinace testovaných erytrocytů ukazuje v rámci přijatých omezení testovacího postupu (viz níže) na přítomnost antigenu D na testovaných erytrocytech.
2. **Negativní:** Žádná aglutinace v rámci přijatých omezení testovacího postupu (viz níže) znamená nepřítomnost antigenu D na testovaných erytrocytech.

Nesrovnalosti: Pokud výsledky získané pro antigeny na testovaných erytrocytech nekorelují se zjištěnými aloprotilátkami krevních skupin, je nutné provést další vyšetření.

OMEZENÍ

1. Déle skladovaná krev může vyvolat slabší reakce než čerstvá krev.
2. Falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky se mohou vyskytnout také v důsledku:
 - Kontaminace zkušebních materiálů
 - Nesprávné skladování, koncentrace erytrocytů, doba inkubace nebo teplota
 - Nesprávné nebo nadměrné odstředování
 - Odchyly od doporučených technik
3. Tvorbu rouleaux lze očekávat u heparinové krve a u pacientů léčených plazmatickými expandéry (např. dextranem) a také u pacientů s plazmocytomem (vysoký obsah bílkovin, změněné složení bílkovin), onkologickými onemocněními (abnormální hemogram) a poruchou koagulace. Vzorky krve těchto pacientů musí být vždy vyšetřeny zkumavkovou technikou, protože při použití suspenze erytrocytů se tento jev všeobecně nevyskytuje. Přítomnost slabých antigenů by měla být prokázána z důvodu větší citlivosti zkumavkovou technikou, případně po 30 minutách inkubace.
4. Krevní vzorky od pacientů trpících určitými poruchami mohou vykazovat falešně pozitivní/ falešně negativní reakce. Vzorky pupečnickové krve kontaminované Whartonovým želež mohou vykazovat falešně pozitivní reakce.



CE-Immundiagnostika GmbH

Karl-Landsteiner-Str. 6, D-69151 Neckargemünd
Telefon: Telefon: +49 6223-80094 00 Fax: +49 6223-80094 00 +49 6223-80094 99
www.ce-immundiagnostika.com



Návod k použití

Rev. 002/07/2021

Anti D

- Pro stanovení antigenů D použijte vždy dva různé klony.

STABILITA REAKCÍ

- Všechny testy ve zkuševkách a na mikrotitračních destičkách odečítejte ihned po odstředění.
- Testy na sklíčku by měly být interpretovány do 2 minut, aby byla zajištěna specifita a aby se zabránilo možnosti, že negativní výsledek bude nesprávně interpretován jako pozitivní v důsledku zaschnutí činidla.
- Zkoušky je třeba považovat za neplatné, pokud byly provedeny při jiných než doporučených teplotách.

SPECIFICKÉ VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

- Před schválením byla antiséra testována všemi doporučenými postupy.
- Každá šarže anti D (monoklonální IgM) je testována v souladu s požadavky společných technických specifikací pro výrobky definované v příloze II seznamu A směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro* a splňuje požadavky.
- Reaktivita každé šarže se prokazuje pomocí panelu erytrocytů v souladu s technikami doporučenými v tomto návodu k použití.
- Specifita monoklonálních protilátek je prokázána pomocí panelu antigen-negativních erytrocytů.
- Kontrola kvality činidel byla provedena s použitím kontrolních erytrocytů nebo plné krve, která byla dvakrát promyta 0,9% fyziologickým roztokem.
- Testy provedené s více než 1,000 vzorky s citlivostí a specifitou > 99 %.

VYLOUČENÍ ODPOVĚDNOSTI

- Uživatel je odpovědný za použití jiných než doporučených metod.
- Jakékoli odchylky od doporučených technik by měly být před použitím validovány.

BIBLIOGRAFIE

- 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/

INDEX SYMBOLŮ

	Číslo šarže		Pouze pro diagnostiku <i>in vitro</i>
	Katalogové číslo		Skladování mezi (°C)
	Datum vypršení platnosti		Výrobce
	Přečtěte si návod k použití		

KATALOGOVÁ ČÍSLA

REF	Balení
06210 Anti-D RUM-1	1 x 1 x 10 ml 5 x 1 x 10 ml 10 x 1 x 10 ml 50 x 1 x 10 ml
06110 Anti-D MS-201	1 x 1 x 10 ml 5 x 1 x 10 ml 10 x 1 x 10 ml 50 x 1 x 10 ml

Distributor:

EXBIO Olomouc s.r.o.
Ovesná 14, 779 00 Olomouc
Česká republika
Tel.: +420 587 301 011
E-mail: info@exbio.com
www.exbio.com

