



**Instrukcja użycia**

Wyd. 002/07-2021

Opis	Nr katalogowy
Anti D RUM-1 (monoclonal) 10ml	06210
Anti D MS-201 (monoclonal) 10ml	06110

WYRÓB MEDYCZNY DO DIAGNOSTYKI *IN VITRO*

**PODSUMOWANIE**

System grupy krwi Rhesus został opisany po raz pierwszy w 1940 roku. Oprócz antygenów AB0, antygen D ma szczególne znaczenie kliniczne, ponieważ błąd podczas przetaczania krwi może spowodować ciężkie hemolityczne reakcje transfuzyjne oraz chorobie hemolityczną płodu i noworodka (HDFN). Rhesus dodatni (D dod.) / rhesus ujemny (D uj.) oznacza, że antygen D jest obecny / nieobecny na powierzchni erytrocytów danej osoby.

**Występowanie antygeny D**

Anty-D	Fenotyp	Rasa kaukaska %	Afroamerykanie %
+	Rh D dodatni	85	72
-	Rh D ujemny	15	28

Tabela 1: Częstość występowania antygenów według Mollison i in.

**ZASTOSOWANIE**

Anti-D (monoclonal IgM) zostało zaprojektowane do specyficznej i jakościowej detekcji erytrocytów, które posiadają odpowiadający antygen D (RH1), i jest odpowiednie do użycia przy użyciu techniki szkiełkowej, płytkowej, mikropłytkowej oraz probówkowej. Wymienione wyżej techniki opierają się na zasadzie bezpośredniej hemaglutynacji. Po dodaniu erytrocytów do anti-D (monoclonal IgM) zachodzi specyficzna reakcja antygen-przeciwciała, jeśli odpowiadający antygen D (RH1) jest obecny na erytrocytach. Ta reakcja jest wykazana przez łatwo widoczną aglutynację erytrocytów. Brak aglutynacji krwinek czerwonych, biorąc pod uwagę ograniczenia metod testowych, oznacza brak odpowiadającego antygeny D (RH1). Oba klony rozpoznają większość wariantów D słabych (D<sub>WEAK</sub>), z wyjątkiem D VI.

**INFORMACJE O PRODUKCJI**

Odczynnik monoklonalny anti-D typu IgM są pozyskiwane z ludzkich hybridom komórkowych. Środek rozcieńczający ten niskobiałkowy odczynnik zawiera następujące substancje wzmacniające: NaCl, BSA, bufor oraz niektóre inne wybrane składniki. Konsentant: <0,1% azydok sodu. Przy stosowaniu zgodnie z instrukcjami, odczynnik aglutynuje ludzkie erytrocyty, jeśli odpowiadający antygen D (RH1) jest obecny. Anti-D (monoclonal IgM) rozpoznaje i bezpośrednio aglutynuje wiele krwinek czerwonych o słabym fenotypie D, które wcześniej mogły zostać zinterpretowane jako Rh negatywne (lub słabe D). Obejmują to również niektóre rodzaje niezwykle rzadkich komórek D częściowych. Klony IgM anti-D nie wykazują reaktywności z komórkami kategorii D VI, które zostały dotychczas przetestowane. Warianty słabe mogą być wykryte tylko za pomocą techniki probówkowej i na mikropłytkach. Specyficzność każdej serii jest wykazywana za pomocą techniki probówkowej i panelu erytrocytów ujemnych dla antygeny D (RH1). Te przeciwciała zostały zoptymalizowane do użycia bez dalszego rozcieńczenia ani dodatków. Numer LOT i data ważności są szczegółowo opisane na etykiecie fiolki.

**PRZECHOWYWANIE**

Przechowywać odczynniki testowe w temperaturze 2°C-8°C do daty ważności, która jest szczegółowo opisana na etykiecie produktu. Po otwarciu produktu po raz pierwszy, ponownie szczelnie zamknąć i przechowywać w temperaturze 2°C-8°C.

**POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK**

Próbki krwi należy pobierać aseptycznie do probówek z EDTA lub cytrynianem. Próbkę należy zbadać jak najszybciej po pobraniu. W przypadku opóźnienia w badaniu, przechowywać próbkę w temperaturze 2°C-8°C. Nie należy testować z odczynnikami próbek wykazujących hemolizę lub zanieczyszczenie mikrobiologiczne, ponieważ może to prowadzić do fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych wyników.

Przed badaniem techniką probówkową, płytkową i mikropłytkową wszystkie próbki krwi należy dwukrotnie przemyć roztworem NaCl 0,9%. W przypadku techniki szkiełkowej, należy przygotować zawiesinę erytrocytów (krew pełna) w stężeniu 35-45%.

**OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI**

- Niniejsze odczynniki są przeznaczone wyłącznie do stosowania w diagnostyce laboratoryjnej *in vitro*.
- Niniejsze odczynniki są przeznaczone do użytku przez upoważnionych operatorów, przeszkolonych w technikach serologicznych.
- Niniejsze odczynniki nie są przeznaczone do samodzielnego stosowania.
- Nie stosować odczynników po dacie ważności.
- Zawartość uszkodzonych fiolek należy odrzucić.
- Podczas użycia niniejszych produktów należy nosić odzież ochronną, taką jak fartuch laboratoryjny i jednorazowe rękawice.
- Testowe surowice zostały prefiltrowane przez kapsułkę o średnicy 0,2 µm, aby zmniejszyć obciążenie biologiczne.
- Po otwarciu fiolki zawartość nadaje się do użycia do daty ważności. Wyrzucić zawartość, jeśli po otwarciu pojawi się zmętnienie lub zanieczyszczenie.
- CE-Immundiagnostika GmbH nie może zagwarantować, że produkty pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego są wolne od czynników zakaźnych. Należy zachować ostrożność w stosowaniu i usuwaniu każdej fiolki i jej zawartości.

**UTYLIZACJA ODCZYNNIKA I POSTĘPOWANIE W PRZYPADKU ROZLANIA**

Informacje na temat utylizacji odczynników i odkażaniamejsca rozlania znajdujące się w dostępnych na żądanie kartach charakterystyki materiału z CE-Immundiagnostika GmbH.

**KONTROLE I PORADY**

- Dodatnie i ujemne krwinki kontrolne powinny być przebadane równocześnie z każdą partią testów. Badanie należy uznać za nieważne, jeśli kontrole nie wykazują oczekiwanych reakcji.
- Ponieważ niniejsze odczynniki nie zawierają wzmacniaczy makromolekularnych, jest mało prawdopodobne, że fałszywe wyniki dodatnie lub ujemne są spowodowane z krwinkami pokrytymi IgG.
- Słabe antygeny (częściowe D) mogą nie zostać zidentyfikowane.
- 1 objętość wynosi około 35-45 µl przy użyciu kroplomierza dostarczonego razem z fiolką.
- Odczyt i interpretacja wyników musi być przeprowadzona przez odpowiednio przeszkolony i wykwalifikowany personel zgodnie z wymaganiami kraju, w którym odczynniki są stosowane.
- Niniejsze odczynniki należy stosować tylko zgodnie z instrukcją użytkownika.

**WYMAGANE MATERIAŁY I ODCZYNNIKI**

- \* 0,9% roztwór NaCl
- \* Szklane probówki
- \* Stojak na probówki
- \* Wirówka do probówek
- \* Pipety objętościowe
- \* Mikropłytki, mieszadło do płyty
- \* Płytko
- \* Szkiełko mikroskopowe
- \* Aplikator
- \* Dodatnie i ujemne krwinki kontrolne
- \* Stoper

**REKOMENDOWANE TECHNIKI**

**A. TECHNIKA PROBÓWKOWA**

- Przygotować 2-4% zawiesinę krwinek w 0,9% roztworze NaCl.
- Umieścić 1 objętość surowicy oraz 1 objętość zawiesiny testowanych krwinek w opisanej probówce.
- Dokładnie wymieszać i natychmiast odwirować w wirówce o sile 400g przez 1 minutę (przy 1500 rcf lub przez odpowiedni inny czas i siłę).
- Odczytać wynik natychmiast: delikatnie wymieszać probówkę, aby usunąć osad erytrocytów z dna probówki i odczytać makroskopowo aglutynację; zapisać wynik.
- Inkubować wszystkie wyniki ujemne lub słabo dodatnie przez 15 minut w temperaturze pokojowej (18-25°C), następnie powtórzyć kroki 3 i 4. Zapisać wynik i intensywność reakcji.

**B. TECHNIKA MIKROPŁYTKOWA**

Przygotowanie mikropłytek: mikropłytki różnych producentów / dostawców mają różne właściwości statyczne, które mogą prowadzić do nieswoistych reakcji krwinek czerwonych i białek. Zaleca się wstępne przygotowanie nieużywanych mikropłytek przed zastosowaniem, aby zmniejszyć gromadzenie się krwinek czerwonych do minimum. Zaleca się użycie mikropłytek typu "U" wykonanych z materiału plastikowego.

- Umieść 1 objętość albuminy wołowej 22% (BSA) w odpowiednich dołkach mikropłytki.
- Dokładnie wymieszać, delikatnie potrząsając lub używając wytrząsarki do mikropłytek, aby zapewnić równomierne pokrycie dołków.
- Inkubować w temperaturze pokojowej (18-25°C) przez co najmniej 10 i nie więcej niż 15 minut.
- Odsączyć BSA i usunąć zawartość dołków do odpowiedniego pojemnika do usuwania odpadów.
- Przetukać mikropłytkę co najmniej 10 razy wodą z kranu.
- Następnie przepłukać mikropłytkę dwa razy wodą destylowaną lub dejonizowaną.
- Przechylić i wytrzeć mikropłytkę, aby usunąć nadmiar wody.
- Pozwolić, aby mikropłytki wyschły przed użyciem. Alternatywne techniki mogą być stosowane, pod warunkiem że zostały zweryfikowane przez użytkownika.

**Procedura:**

- Przygotować zawiesinę krwinek testowych w stężeniu 2-4% w roztworze 0,9% NaCl.
- Umieścić 30 µl odpowiedniej surowicy w oznaczonych dołkach mikropłytki.
- Dodać 30 µl wcześniej przygotowanej zawiesiny krwinek testowych do mikropłytki.
- Wymieszać przez 30 sekund, ręcznie lub za pomocą wytrząsarki.
- Odwirować mikropłytkę przez 1 minutę przy 400g (lub 1500 rcf lub z inną odpowiednią siłą i czasie).
- Wstrząsnąć mikropłytką przez krótki czas, używając wytrząsarki, jeśli to konieczne.
- Natychmiast odczytać wynik i intensywność reakcji, testując równocześnie dodanie i ujemne krwinki kontrolne. Urządzenia odczytujące, jeśli używane, muszą być zwalidowane. Dodatkowo narzędzia wizualne, takie jak lusterka lub lupy, mogą ułatwić odczyt wyników.

**C. TECHNIKA SZKIEŁKOWA**

- Przygotować zawiesinę testowych krwinek w stężeniu 35-45% z użyciem krwi pełnej.
- Na szkiełko umieścić 1 objętość surowicy oraz 1 objętość krwi pełnej.
- Za pomocą czystego aplikatora dokładnie wymieszać obie objętości na powierzchni o wymiarach około 20x40 mm.
- Powoli poruszać obracając szkiełkiem.
- Odczytać wynik makroskopowo po nie więcej niż 2 minutach i zapisać.
- Niewłaściwa obsługa lub zbyt długi czas inkubacji mogą prowadzić do powstawania artefaktów wynikających z wysychania, co skutkuje nieważnością testu.

#### D. METODA PŁYTKOWA

1. Przygotować zawieszinę testowych krwinek w stężeniu 35-45% z użyciem krwi pełnej lub zawieszinę testowych krwinek w stężeniu 10% w roztworze 0,9% NaCl.
2. Na płytce umieścić 1 objętość surowicy oraz 1 objętość zawiesziny testowych krwinek.
3. Za pomocą czystego aplikatora dokładnie wymieszać obie objętości.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5-10 minut.
5. Odczytać wynik makroskopowo i zapisać.

Niewłaściwa obsługa lub zbyt długi czas inkubacji mogą prowadzić do powstawania artefaktów wynikających z wysychania.

#### INTERPRETACJA WYNIKÓW

1. **Dodatni:** Aglutynacja testowanych krwinek w ramach akceptowalnych ograniczeń procedury testowej (patrz poniżej) wskazuje na obecność antygeny D na tych erytrocytach.
2. **Ujemny:** Brak aglutynacji testowanych krwinek w ramach akceptowalnych ograniczeń procedury testowej (patrz poniżej) wskazuje na brak antygeny D na tych erytrocytach.

Nieścisłości: Jeśli wyniki uzyskane dla antygenów na testowych erytrocytach nie korelują z wykrytymi alloprzeciwciałami grup krwi, wymagane jest dalsze badanie.

#### OGRANICZENIA

1. Przechowywana krew może dawać słabsze reakcje niż krew świeża.
2. Falszywie dodatnie lub fałszywie negatywne wyniki mogą również wystąpić z powodu:
  - Zanieczyszczenia materiałów testowych
  - Nieprawidłowego przechowywania, stężenia erytrocytów, czasu inkubacji lub temperatury
  - Nieprawidłowego lub nadmiernego wirowania
  - Odstępstw od zalecanych technik
3. Zjawisko rulonizacji może być oczekiwane w krwi heparynowej oraz u pacjentów leczonych środkami zwiększającymi objętość osocza (np. dekstran), a także u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym (wysoka zawartość białka, zmodyfikowany skład białkowy), chorobami onkologicznymi (nieprawidłowa hemoglobina) i zaburzeniami krzepnięcia. Próbkę krwi od tych pacjentów muszą zawsze być testowane za pomocą techniki próbówkowej, ponieważ to zjawisko zazwyczaj nie może być wykazane przy użyciu zawiesziny krwinek. Obecność słabych antygenów należy wykazać za pomocą techniki próbówkowej, ze względu na większą czułość, po czasie inkubacji wynoszącym 30 minut, jeśli jest to stosowne.
4. Próbkę krwi od pacjentów cierpiących na niektóre choroby mogą wykazywać fałszywie dodatnie/fałszywie ujemne reakcje. Próbkę krwi powinno się zanieczyszczone galareta Whartona mogą wykazywać fałszywie dodatnie reakcje.
5. Zawsze należy używać dwóch różnych klonów do oznaczania antygenów D.

#### STABILNOŚĆ REAKCJI

1. Wszystkie testy w technice próbówkowej i na mikropłytkach powinny być odczytywane bezpośrednio po odwirowaniu.
2. Testy w technice szkiełkowej powinny być interpretowane w ciągu 2 minut, aby zapewnić swoistość i uniknąć możliwości, że wynik ujemny może zostać błędnie zinterpretowany jako dodatni z powodu wysychania odczynnika.
3. Testy należy uznać za nieważne, jeśli zostały wykonane w temperaturach innych niż zalecane.

#### SWOISTA CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

1. Przed zatwierdzeniem, surowice zostały przetestowane zgodnie ze wszystkimi zalecanymi procedurami.
2. Każda partia anti-D (monoclonal IgM) jest testowana zgodnie z wymaganiami Wspólnych Specyfikacji Technicznych dla produktów zdefiniowanych w Załączniku II, Listy A Dyrektywy 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* spełnia wymagania.
3. Reaktywność każdej partii jest demonstrowana za pomocą panelu erytrocytów zgodnie z zalecanymi technikami w niniejszej instrukcji użycia.
4. Swoistość przeciwciał monoklonalnych jest wykazywana za pomocą panelu erytrocytów ujemnych pod względem antygeny.
5. Kontrola jakości odczynników była przeprowadzana za pomocą erytrocytów lub krwi pełnej, które zostały dwukrotnie przepłukane roztworem soli fizjologicznej 0,9%.
6. Testy przeprowadzone na ponad 1000 próbek wykazały czułość i swoistość powyżej 99%.








#### OGRANICZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI

1. Użytkownik ponosi odpowiedzialność za działanie odczynników podczas korzystania z dowolnej metody innej niż wymienione zalecane metody.
2. Wszelkie odstępstwa od zalecanych metod powinny zostać zweryfikowane przed użyciem.

#### LITERATURA



1. Cartron JP. Defining the Rh Blood Group Antigens. Blood Reviews 1994; 8:199-212
2. Garratty G et al. Spontaneous Agglutination of Red Cells with a Positive Direct Antiglobulin Test in Various Media. Transfusion 1984; 24:214-217
3. Issitt PD, Anstee DJ. Applied Blood Group Serology. Wydanie 4. Montgomery Scientific. Durham 1998
4. Levine P, Stetson RE. An Unusual Case of Intragroup Agglutination. J. Amer Med Assoc. 1939; 113:126-127
5. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine. Wydanie 6. Blackwell Science. Oxford. 1979
6. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man. Wydanie 6. Blackwell Scientific. Oxford. 1975
7. Technical manual of the American Association of Blood Banks, Wyd. 17., 2011
8. 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
9. Westhoff CM, Sipherd BD, Toalson ID. Red cell antigen stability in K3EDTA. Immunohematol 1993; 9:109-111
10. 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
11. Immunhämatologie und Transfusionsmedizin, Reinhold Eckstein / Robert Zimmermann, 6. Auflage, Urban & Fischer bei Elsevier, 2010
12. Blutgruppen und Transfusion, M. Metaxas-Bühler, Verlag Hans Huber, 1994
13. Flegel AW, Northoff H, Wagner FF. Rhesus-D-Bestimmung beim Transfusionsempfänger www.uni-ulm.de/~wfllegel/RH/MTA/

#### INDEKS SYMBOLI

 LOT	Numer serii	 IVD	Wyłącznie do użytku w diagnostyce <i>in vitro</i>
 REF	Numer katalogowy		Przechowywać w temperaturze +2°C do +8°C
	Data ważności		Producent
	Zapoznać się z instrukcją		

#### NUMERY KATALOGOWE

REF	Ilość
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

 Dystrybutor	Farmator Sp. z o.o. ul. Na Zapleczu 4B 87-100 Toruń, Polska
 Tłumaczenie	