

## GEBRAUCHSANWEISUNG

**Anti-C (RH2), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-E (RH3), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-c (RH4), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-e (RH5), monoclonal IgM (human) OrthoClone**

**REF** 690211A  
**REF** 690321A  
**REF** 690281A  
**REF** 690361A

### ZWECKBESTIMMUNG

Monoklonal Anti-C, -E, -c, -e – Testseren werden aus Zellkulturüberständen von Heterohybridoma-Zelllinien gewonnen, die Antikörper vom IgM-Typus sezernieren, die spezifisch gegen das jeweilige korrespondierende Blutgruppenantigen gerichtet sind. Der Antikörper ist dabei jeweils humanes Protein. Die Testseren werden zum qualitativen In-Vitro-Nachweis des Vorhandenseins oder Fehlens der Blutgruppenantigene C, c, E, bzw. e auf menschlichen Erythrozyten verwendet. Die beschriebenen Verfahren gelten für die aufgeführten manuellen Methoden und für die Anwendung mit Ortho BioVue® Reverse Diluent Kassetten auf den Automaten ORTHO VISION™ Analyzer und ORTHO AutoVue® Innova. Die Anwendung dieser Testseren ist nur für qualifiziertes und geschultes Fachpersonal vorgesehen.

### PRINZIP DES VERFAHRENS

Die bei Verwendung dieser Produkte angewendeten Testmethoden beruhen auf dem Prinzip der Agglutination. Normale menschliche Erythrozyten, die das entsprechende Antigen tragen, werden durch den korrespondierenden Antikörper agglutiniert.

### TESTSEREN

Die aufgeführten Blutgruppentestseren werden aus folgenden Zellklonen produziert:

Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273  
 Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260  
 Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35  
 Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69

Alle Testseren enthalten als Konservierungsmittel <0,1% (w/v) Natriumazid. Außer dem aktiven Antikörper-Bestandteil beinhalten die Testseren Natriumchlorid, hochmolekulare Verbindungen und Rinderalbumin, das durch die US Veterinary service Inspectoren überprüft und zertifiziert wurde.

**WARNUNG:** Diese Testseren werden aus Zellkulturüberständen hergestellt. Unabhängig davon sollten diese biologischen Produkte wegen nie völlig auszuschließender Gefährdung durch Krankheitserreger als potentiell infektiös angesehen werden. Die Testseren enthalten Natriumazid, das toxisch wirken und mit Blei oder Kupfer explosive Salze bilden kann. Bei der Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen. Aus den oben genannten Gründen sollten die Testseren mit angemessener Sorgfalt gehandhabt werden.

### LAGERUNG

Bei +2 bis +8 °C (ungeöffnet / angebrochen) lagern, kurzzeitig zur Anwendung auch bei Raumtemperatur. Werden die Geräte ORTHO VISION™ Analyzer oder ORTHO AutoVue® Innova eingesetzt, können die Testseren maximal 5 Tage auf dem Gerät verbleiben (+15 bis +30 °C). Grundsätzlich nur bis zum angegebenen Verfallsdatum lagern und anwenden!

### HINWEISE

- Es sollten bei jeder Austestung positive und negative Kontrollen mitgeführt werden.
- Unschonbare Lagerung beeinträchtigt die Wirksamkeit der Produkte.
- Die Reaktionsfähigkeit eines der oben aufgeführten Testseren wird durch eine leichte Trübung nicht beeinträchtigt. Eine bakterielle und chemische Kontamination ist zu vermeiden. Wenn eine sichtbare Veränderung eines Testserums festgestellt wird, sollte das Testserum nicht mehr eingesetzt werden, es kann auf eine mikrobielle Kontamination hinweisen.
- Die Stärke der positiven Reaktion ist vom Alter des verwendeten Blutes abhängig.
- Zentrifugieren außerhalb des angegebenen Drehzahl-Bereiches kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Bei der Kartenmethode kann der Einsatz einer anderen kartenspezifischen Zentrifuge (jede Kartenzentrifuge hat seine festgelegte unveränderliche g-Zahl) auf Grund der dadurch veränderten g-Zahl zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die beschriebenen Verfahren zur Anwendung gelten nur für die aufgeführten manuellen Methoden und Automaten. Werden andere Automaten oder halbautomatische Systeme verwendet, müssen die Laboratorien die Angaben der Gerätehersteller befolgen und Validierungen nach anerkannten Verfahren durchführen.
- Bei der Anwendung der Testseren sind alle gültigen nationalen Gesetze, Verordnungen und Richtlinien zu beachten, in Deutschland insbesondere die „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ in ihrer gültigen Fassung.
- Die Angaben zum Einsatz der Testkarten, in der zugehörigen Gebrauchsinformation, sind unbedingt zu beachten.

### PROBENVORBEREITUNG

- Blutproben sollten mit einer der üblichen Entnahmetechnik gewonnen werden.
- Das auszutestende Blut sollte so bald wie möglich nach der Blutentnahme geprüft werden, um die Gefahr falsch positiver bzw. falsch negativer Reaktionen, durch unsachgemäße Lagerung oder Kontamination der Probe, zu minimieren. Nicht sofort getestetes Blut ist bei +2 bis +8 °C zu lagern. Mit EDTA antikoagulierte Blutproben müssen innerhalb von 7 Tagen und mit Natriumzitrat behandelte Proben innerhalb von 14 Tagen nach der Entnahme getestet werden. Konserven/Spenderblute können bis zum Verfallsdatum ausgetestet werden.

### VORBEREITUNG DER TESTSEREN

Eine Vorbereitung der Testseren ist nicht erforderlich. Die Seren werden direkt aus den Fläschchen entnommen und eingesetzt.

### VERFAHRENSWEISE

Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber benötigte Materialien bei der:

Objektträgermethode	Röhrchenmethode	Mikrotiterplattenmethode	Verwendung von Ortho BioVue® Kassetten
1. Objektträger	1. Teströhrchen, 10 x 75 mm	1. Mikrotiterplatten mit U-Boden, ggf. vorbehandelt	1. Ortho BioVue® System Zentrifuge
2. Pasteurpipette	oder 12 x 75 mm	2. Kurzzeitwecker	2. Isotonische Kochsalzlösung (0,85 – 0,9 % Natriumchlorid)
3. Rührstäbchen	2. Mikroliterpipette für 50 µL/100 µL	3. Laborzentrifuge, die Mikrotiterplatten(-träger) aufnehmen kann	3. Mikroliterpipette zur Abgabe von 10 µL, 40 µL und 50 µL
4. Kurzzeitwecker	3. Kurzzeitwecker	4. Mikrotiterplatten-träger für Zentrifugen (optional)	4. Einweg-Pipettenspitzen
	4. Zentrifuge	5. Mikrotiterplatten-Schüttler	5. Ortho BioVue® System Arbeitsstände
	5. Isotonische Kochsalzlösung (0,85 - 0,9% Natriumchlorid)	6. Ablesespiegel für Mikrotiterplatten-tests (optional)	6. Ortho BioVue® Reverse Diluent Kassetten
	6. Einweg Pipettenspitzen	7. Mikroliterpipetten zur Abgabe von 50 µL	7. Teströhrchen, 10x75 mm oder 12x75 mm
		8. Isotonische Kochsalzlösung (0,85 - 0,9 % Natriumchlorid)	8. Kurzzeitwecker
		9. Einweg Pipettenspitzen	9. Zentrifuge
		10. Teströhrchen, 10 x 75 mm oder 12 x 1 75 mm	

### Testdurchführung

#### Objektträgertest

- Nur Erythrozytensediment verwenden.
- Auf einen beschrifteten Objektträger einen Tropfen (ca. 50 µL) des entsprechenden Testserums auftropfen.
- Geben Sie zu dem Tropfen Testserum auf dem Objektträger mit einer Pasteurpipette einen Tropfen (ca. 50 µL) Erythrozytensediment.
- Die Erythrozyten- / Testserenmischung mit einem Rührstäbchen gut vermischen und zu einem Kreis von ca. 2 cm Durchmesser ausbreiten.
- Bei leichtem Schwenken des Objektträgers innerhalb einer Minute auf Agglutination prüfen (Reaktionsbeginn nach Sekunden).
- Ergebnisse protokollieren.

#### Röhrchen-Zentrifugationstest

- Eine 2-5%ige Erythrozytensuspension in isotonischer Kochsalzlösung vorbereiten (Erythrozyten können vorab 1-3 Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden).
- In jedes Teströhrchen 100 µL (alternativ je einen Tropfen (ca. 50 µL)) des entsprechenden Testserums geben.
- Geben Sie zu jedem Teströhrchen 100 µL (alternativ je einen Tropfen (ca. 50 µL)) der entsprechenden Erythrozytensuspension.
- Die Erythrozyten-/Testserenmischungen durch leichtes Schütteln vermischen.
- Teströhrchen 1-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Teströhrchen 1 Minute bei 2.000 U/min (ca. 800 - 1.000 g) zentrifugieren.
- Zellen durch vorsichtiges Schütteln vollständig vom Röhrchenboden lösen und innerhalb 3 Minuten makroskopisch auf Agglutination untersuchen.
- Ergebnisse protokollieren.

#### Mikrotiterplattentest

- Herstellen einer 2-5%igen Erythrozytensuspension in isotoner Kochsalzlösung. (Erythrozyten können vorab 1-3 Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden).
- Einen Tropfen (ca. 50 µL) des entsprechenden Testserums in eine beschriftete Vertiefung geben.
- Geben Sie einen Tropfen (ca. 50 µL) der entsprechenden Erythrozytensuspension in die Testkavität.
- Mischen Sie die Mikrotiterplatte auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler.

#### HINWEIS: Empfohlene Dauer für mechanische Schüttler:

- Mischen: 10 bis 30 Sekunden bei mittlerer Schüttelstärke;
- Resuspendieren: 10 bis 30 Sekunden bei mittlerer Schüttelstärke bzw. mit einer Dauer und Geschwindigkeit, die eine vollständige Resuspension des gesamten Zellknopfes erlaubt, ohne die positiven Reaktionen zu zerstören.

- Zentrifugieren Sie die Platte.

Vorgeschlagene Zentrifugationsdauer: 30 Sekunden bei ca. 400 x g oder so lange, wie erforderlich, um mit der verwendeten Zentrifuge und Mikrotiterplatte die stärkste Reaktion der Antikörper mit den Antigen tragenden Erythrozyten zu erlauben, bei der die Resuspension der Antigen-negativen Erythrozyten noch leicht möglich ist.

**HINWEIS:** Die auf die Zell-/Testserenmischung angewandte Zentrifugalkraft sollte die minimale Kraft sein, mit der ein Erythrozytenknopf und ein klarer Überstand erzeugt werden kann. Wegen der großen Zahl der im Handel erhältlichen Zentrifugen kann keine eindeutige Zentrifugationsgeschwindigkeit oder -dauer empfohlen werden, die für alle Konfigurationen ideal wäre. Jedes Labor muss das vorhandene Gerät kalibrieren und testen, wie lange bei einer gegebenen Geschwindigkeit zentrifugiert werden muss, um das gewünschte Ergebnis zu erhalten.

- Lösen Sie die Erythrozytenknöpfe auf dem Schüttler und positionieren Sie die Platte für das Ablesen.

- Lesen Sie das Ergebnis ab und protokollieren Sie es.

- Inkubieren Sie negative oder fragile Tests für eine Dauer von 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur.

- Wiederholen Sie die Schritte 5 bis 7 nach der Inkubation bei Raumtemperatur.

**HINWEIS:** Alle Ansätze sollten unmittelbar nach der Zentrifugation und Resuspendierung ausgewertet werden.

## Manuelle Testmethode in Ortho BioVue® Reverse Diluent Kassetten

Das im Folgenden geschilderte Verfahren gilt ausschließlich für die manuelle Testdurchführung mit Ortho BioVue® Kassetten. Beachten Sie bitte in der Gebrauchsanweisung für Ortho BioVue® Reverse Diluent Kassetten die Abschnitte LAGERUNG, VORSICHTSMAßNAHMEN, PROBENENTNAHME und -VORBEREITUNG, VORBEREITUNG DER TESTSEREN sowie INTERPRETATION DER ERGEBNISSE, und -soweit zutreffend- BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS.

1. Zur Vorbereitung der Kassetten befolgen Sie bitte in der Gebrauchsanweisung für Ortho BioVue® Reverse Diluent Kassetten den Abschnitt „Testdurchführung“ Punkt 1 und 2.
2. Eine 3-5%ige Erythrozytensuspension in isotonischer Kochsalzlösung vorbereiten. (Erythrozyten können vorab 1-3 mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden).
3. 10 µL der entsprechenden 3 bis 5%igen Erythrozytensuspension in die beschriftete Reaktionskammer der Kassette geben.
4. 40 µL des entsprechenden Testserums in die Reaktionskammer zugeben.  
(Berühren Sie mit der Pipettenspitze nicht den Rand der Reaktionskammer. Sollte dies dennoch passieren, wechseln Sie bitte die Pipettenspitze, bevor Sie die nächste Reaktionskammer befüllen.)
5. Zentrifugieren Sie die Kassette mit der Ortho BioVue® System Zentrifuge, mit der, für die Zentrifuge unveränderliche g-Zahl.  
**HINWEIS:** Die Zentrifugation muss innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Proben in die Reaktionskammern erfolgen.
6. Nach Beendigung des Tests überprüfen Sie die Vorder- und Rückseite der einzelnen Säulen auf Agglutination und/oder Hämolyse.
7. Die Reaktionsstärke von der Seite mit dem ausgeprägteren positiven Ergebnis protokollieren.

## Test in Ortho BioVue® Reverse Diluent Kassetten mit den Automaten ORTHO VISION™ Analyzer oder ORTHO AutoVue® Innova

Bitte befolgen Sie die Anweisungen im Benutzerhandbuch des jeweiligen Gerätes.

### INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

„Vorsichtiges Schwenken/ Schütteln“ bei der Objektträger-, Rörchen-, sowie Mikrotiterplatten-Methode:

- Positives Ergebnis (+):** Eine Agglutination der Erythrozyten ist als positives Testergebnis zu werten und zeigt die Anwesenheit des entsprechenden Antigens an.  
**Negatives Ergebnis (-):** Das Fehlen einer Agglutination der Erythrozyten ist als negatives Testergebnis zu bewerten, das entsprechende Antigen ist nicht nachweisbar.  
Zur Beurteilung der Ergebnisse in Ortho BioVue® Reverse Diluent Kassetten bei der manuellen Methode befolgen Sie bitte den Abschnitt „INTERPRETATION DER ERGEBNISSE“ in der zugehörigen Gebrauchsanweisung. Bei den Automaten erfolgt die Ablesung und Auswertung durch das Gerät.

### GRENZEN DER METHODE

1. Ungenauigkeiten bei der Einhaltung der Anweisungen in den Abschnitten „Testdurchführung“ und „Interpretation der Testergebnisse“ können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
2. Mitgeführte Kontrollen mit nicht eindeutigen oder falschen Ergebnissen führen automatisch zur nicht Verwertbarkeit aller Ergebnisse.
3. Enzymbehandelte Erythrozyten oder die Zugabe von Rinderalbumin und/oder anderer proteinhaltiger Lösungen können mit diesen Testseren zu unspezifischen Reaktionen führen.
4. Hämolytierte, trübe, kontaminierte oder geronnene Blutproben dürfen nicht eingesetzt werden.
5. Bei der Objektträgermethode können unspezifische Reaktionen beim Eintrocknen des Reaktionsansatzes bzw. beim Erwärmen des Objektträgers auftreten.
6. Auf Grund der unterschiedlichen Ausprägung der Antigene kann es bei bestimmten Phänotypen mit diesen Reagenzien zu einer schwächeren Reaktion kommen als mit Kontrollerythrozyten.
7. Einige Erythrozyten können Rh-Varianten ausgebildet haben, die mit monoclonalen Antikörpern eines Klons möglicherweise nicht erkannt werden. Die Austestungen sollten / müssen mit mindestens zwei unterschiedlichen Klone / Klonmischungen durchgeführt werden, wie es in einigen Ländern vorgeschrieben ist. Bei abweichenden Testergebnissen müssen weitere Austestungen durchgeführt werden.
8. Kein einzelnes Testserum oder eine einzelne Methode kann garantieren alle seltenen oder schwachen Antigene und alle Varianten der Antigene zu detektieren <sup>2</sup>.
9. Bei Erythrozyten, die mit Alloantikörpern oder Autoantikörpern derselben oder einer ähnlichen Spezifität wie das Testserum sensibilisiert sind (z.B. Erythrozyten positiv im direkten Antiglobulintest), sind für diese Austestungen ungeeignet.
10. Bei Erythrozyten mit positivem direkten Coombs-Test kann es in der Kassette-Technik zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Diese Zellen reagieren auch ohne Testserum positiv.
11. Beachten Sie Angaben zu Grenzen in der Gebrauchsanweisung von eingesetzten Ortho BioVue® Reverse Diluent Kassetten und im Benutzerhandbuch des verwendeten Automaten.
12. Beim Mikrotiterplattentest sind alle negativen Ergebnisse mit Anti-e (Klone: MS-62, MS-69) in einer anderen Technik zu wiederholen, da es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.
13. Bei Nabelschnurbluten kann Anti-c (Klon: MS-33) Anti-I/i Kälteantikörper Aktivitäten zeigen und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen.
14. Neugeborenen-Blute sind für die Testmethode auf der Mikrotiterplatte ausgeschlossen.

### LEISTUNG

Eine Leistungsbewertung für die Produkte wurde entsprechend der Common Technical Specifications (CTS Entscheidung der Kommission vom 03. Februar 2009) durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Proben (Spender-, Patient-, Panelblute) eingesetzt und mit anderen Produkten verglichen.











Produkt	Positiv	Falsch negativ	Sensitivität	Negativ	Falsch positiv	Spezifität
Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273	844	0	100%	391	0	100%
Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35	1005	0	100%	230	0	100%
Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260	327	0	100%	908	0	100%
Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69	1417	0*	100%*	65	0	100%

\* für Anti-e (Klone: MS-62, MS-69) wurden im Mikrotiterplatten-Test 42 Proben falsch negativ bewertet, so dass in dieser Technik die Sensitivität lediglich 97,12% betrug. (siehe „Grenzen der Methode“ Punkt 8).


### LITERATUR




1. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)
2. CLSI, I/LA33-A Validatin of Automated System for Immunhematological Testing Before Implementation; Approved Guideline CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE Dezember 2009
3. Peter D. Issit, David J. Anstee Applied Blood Group Serology, fourth edition, Montgomery Scientific Publications 1998
4. Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel Transfusionsmedizin, 3. Auflage, Springer-Verlag 2004.

### SYMBOL - LEGENDE

 Lagerung von - bis	 Artikel- Nummer	 Verfallsdatum	 Hersteller nach 98/79/EG
 Los	 Klon(e)	 In-vitro- Diagnostikum	 EG CE-Symbol
 Unique Device Identification	 Gebrauchsinformation beachten		

730-22-0518 Version 018 / 01.07.2021

 Antitoxin GmbH, Industriestraße 88, 69245 Bammental, Deutschland

 +49 (0) 6223/ 8661-0  +49 (0) 6223/ 8661-13  [gara@antitoxin-gmbh.de](mailto:gara@antitoxin-gmbh.de)

## INSTRUCTIONS FOR USE

**Anti-C (RH2), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-E (RH3), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-c (RH4), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-e (RH5), monoclonal IgM (human) OrthoClone**

REF	690211A
REF	690321A
REF	690281A
REF	690361A

### INTENDED USE

Monoclonal Anti-C, -E, -c, -e reagents are produced from cell culture supernatants of heterohybridoma cell lines. The cells secrete an antibody of IgM-type that reacts specifically with the corresponding antigen. The antibody in each case is human protein. The reagents are used for In-Vitro-Diagnostic, to determine whether human red blood cells possess or lack the corresponding blood group antigens C, E, c and e. The procedures described are for the listed manual methods and application with Ortho BioVue® Reverse Diluent cassettes on the ORTHO VISION™ Analyzer and ORTHO AutoVue® Innova.

The test sera are intended to be used by qualified technical personnel only.

### PRINCIPLE OF PROCEDURE

The procedures used with these reagents are based on the principle of agglutination. Normal human erythrocytes, possessing the corresponding antigen, will agglutinate in the presence of the specific antibody directed towards the antigen.

### REAGENT

The listed reagent contains antibodies of the following cell clones:

Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273

Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35

Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260

Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69

These reagents contain <0.1% (w/v) sodium azide as preservative. Additionally these reagents are comprised of active antibody, sodium chloride, macromolecules and bovine albumin, which has been tested and certified by the US Veterinary service inspectors.

**CAUTION:** Please handle biological reagents with proper care: These test serum are prepared from supernatants of cell cultures. As biological products they should be looked upon as potentially infectious because of never complete exclusion of danger through excitants of disease. The test serum contains sodium azide that may be toxic and may react with lead or copper to form highly explosive salts. On disposal, flush with large quantities of water.

Found from the above reasons the reagents should be handled with proper care.

### STORAGE REQUIREMENTS

Store at +2 to +8 °C (unopened / opened), or shortly at room temperature while in use. If the devices ORTHO VISION™ Analyzer or ORTHO AutoVue® Innova are used, the reagents may remain a maximum of 5 days on the device (+15 bis +30 °C). Do not use reagents beyond the stated expiration date!

### REMARKS

1. It is recommended that each lot of reagents be tested with appropriate positive and negative controls.
2. Inappropriate storage impairs efficacy of the reagent.
3. Weak turbidity of the reagent does not affect its reactivity. Bacteria and chemical contamination of the product should be avoided. If a visible change is detected, the reagent should no longer be used, this sign may indicate a microbiological contamination.
4. Strength of positive reactions also depends on age of used blood.
5. Centrifugation outside the specified speed range may lead to false results. With the card method, the use of another card-specific centrifuge (each card centrifuge has its specified unchangeable g-force) may lead to false results due to the changed g-force.
6. The procedures described below are for manual methods and listed analyzers only. When using other automated or semi-automated instruments, follow the device manufacturer's procedures in the operator's manual. Laboratories must follow approved validation procedures.
7. For usage of these test sera all effective national laws, directives and guidelines in its current version must be followed. [In Germany especially: „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“<sup>1</sup>].

### SAMPLE PREPARATION

1. Blood sample should be collected by approved medical procedure.
2. Blood sample to be tested should be used as soon as possible after blood collection to reduce the risk of false-positive and false-negative results due to improper storage or contamination of the sample.

If a delay in testing occurs, sample should be stored at +2 to +8°C.

Blood drawn into EDTA should be tested within 7 days and sample treated with sodium citrate within 14 days after collection.

Blood bag / Donor Blood can be tested until the expiry date.

### REAGENT PREPARATION

There is no specific preparation of the reagents required. Use reagents directly from the vial.

### PROCEDURE

Material required but not provided:

#### Slide Method

1. Glass slide
2. Pasteur pipette
3. Mixing stick
4. Timer

#### Tube Centrifugation Method

1. Test tubes, 10 x 75 mm or 12 x 75 mm
2. Mikroliter pipette designed to deliver approximately 50µL/100 µL
3. Timer
4. Centrifuge
5. Isotonic saline (0,85 - 0,9% sodium chloride)
6. Disposable pipette tips

#### Microplate Method

1. Microplate with U-bottom, (optional: pre-treated)
2. Timer
3. Centrifuge, suitable for centrifugation of microplates
4. Microplate-carrier for centrifuge (option)
5. Microplate shaker
6. Microplatetest mirror (option)
7. Pipette for 50 µL
8. Isotonic saline; (0.85 – 0.9 % sodium chloride)
9. Disposable pipette tips
10. Test tubes, 10 x 75 mm or 12 x 75 mm

#### Application of Ortho BioVue® Cassettes

1. Ortho BioVue® System Centrifuge
2. Isotonic saline (0,85 – 0,9 % sodium chloride)
3. Mikroliter pipette for 10 µL, 40 µL and 50 µL
4. Disposable pipette tips
5. Ortho BioVue® System Work Rack
6. Ortho BioVue® System Reverse
7. Timer
8. Test tubes, 10 x 75 mm or 12 x 75 mm
9. Centrifuge

### Test procedure

#### Slide Method

1. Use erythrocyte sediment only.
2. Place one drop (approximately 50 µL) of appropriate reagent on a marked glass slide.
3. Using a Pasteur pipette add one drop erythrocyte sediment (approximately 50 µL) to the drop of reagent on the glass slide.
4. Mix the erythrocytes with reagent well with a stick and spread to a circle with a diameter of approximately 2 cm.
5. By slightly rotating the slide, check for agglutination within 1 minute (reaction starts within seconds).
6. Document the result.

#### Tube Centrifugation Method

1. Prepare a 2% to 5% suspension of red blood cells in isotonic saline (red blood cells may be washed 1-3 times with isotonic saline).
2. Add 100 µL (alternative: one drop, approximately 50 µL) of appropriate reagent in a marked tube.
3. Add 100 µL (alternative: one drop, approximately 50 µL) of appropriate cell suspension to the tube.
4. Mix well by slightly shaking.
5. Incubate tube at room temperature for 1-15 min.
6. Centrifugation of tube for 1 minute at 2.000 rpm (approximately 800-1.000 g).
7. Gently shake the red cells completely from the bottom of the tube and check macroscopically for agglutination within 3 minutes.
8. Document the result.

#### Microplate Method

1. Prepare a 2% to 5% suspension of red blood cells in isotonic saline (red blood cells may be washed 1-3 times with isotonic saline).
2. Add one drop (approximately 50 µL) of appropriate reagent into a marked well.
3. Add one drop (50 µL) of cell suspension into the well.
4. Mix microplate on a microplate shaker.

**Note:** Recommended: (1) To mix: 10 to 30 seconds at medium strength. (2) To resuspend: 10 to 30 seconds at medium strength respectively with duration and strength, allowing a full resuspension of sediment without destruction of positive reactions.

5. Centrifugation of microplate. Recommended duration of centrifugation: 30 seconds at approximately 400 x g, or as long as necessary to produce best positive reactions with antigen positive cells, with used centrifuge and microplate, and still have an easy resuspension of antigen negative cells.

**Note:** The used centrifugal force should be the minimum force to produce a sediment and a clear supernatant. Because of multitude offered centrifuges a general speed or duration for best results can not be recommended. Each laboratory has to test and validate its equipment for speed and duration to obtain best results.

6. Resuspend the erythrocyte knobs on the shaker and position microplate for reading.
7. Read microplate and document the result.
8. Tests with negative or doubtful results have to be incubated for 5 to 10 minutes at room temperature.
9. Repeat steps 5 to 7 after incubation at room temperature.

**Note:** All tests should be resuspended and evaluated directly after centrifugation.

## Manual Test Method in Ortho BioVue® Reverse Diluent Cassettes

The procedure described below is for manual Ortho BioVue® Cassettes testing only. Please refer to the instructions for use of the Ortho BioVue® Reverse Diluent Cassettes, sections STORAGE REQUIREMENT, SAMPLING AND PREPARATION, PREPARATION OF THE TEST SERIES, and INTERPRETATION OF RESULTS, as well as -where applicable- LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.

- For preparation of the cassettes, please refer to the instructions for use for Ortho BioVue® Reverse Cassettes, chapter „procedure“ point 1 and 2.
  - Prepare a 3 - 5% erythrocyte suspension in isotonic sodium chloride solution. (red blood cells may be washed 1-3 times with isotonic saline)
  - Add 10 µL of a appropriate 3 to 5% red blood cell suspension to the marked reaction chamber of the cassette.
  - Add 40 µL appropriate reagent to the appropriate reaction chambers of the cassette.  
(The pipette tips shall not contact the rim of the reaction chambers. If this should adversely happen, please replace the tip with a new one, before you will fill the next reaction chamber.)
  - Centrifuge the cassette in the Ortho BioVue® System centrifuge with the for this centrifuge unchangeable g-force.
- Note:** Centrifugation must be performed within 30 minutes after addition of specimens to the reaction chambers.
- After completion of test, read each column from the cassette's front and rear sides for agglutination and/or hemolysis.
  - Protocol the final test result from the cassette side with the more clearly expressed positive reading.

## Test in Ortho BioVue® Reverse Diluent Cassettes on ORTHO VISION™ Analyzer or ORTHO AutoVue® Innova

Please follow the instructions in the user manual of the respective analyzer.

### INTERPRETATION OF RESULTS

"Slightly rotating / shaking" at Slide-, Tube- and Microplate Method

- Positive result (+):** visible agglutination of erythrocytes indicates the presence of the corresponding antigen.  
**Negative result (-):** no visible agglutination of erythrocytes indicates the absence of the corresponding antigens.

**Cassettes:** As for the manual method, for interpretation of results, please refer to the instructions for use of Ortho BioVue® Reverse Cassettes, chapter „INTERPRETATION OF RESULTS“. As for analyzers, reading and interpretation is effected automatically by each device.

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The "Procedure" and "Interpretation of Results" sections must be followed closely to assure the accuracy of the test results.
- No valid conclusion concerning the test result can be reached, if controls with uncertain or false results occur.
- Enzyme treated erythrocytes or addition of bovine albumin and/or other solutions containing protein may cause unspecific reactions.
- Hemolyzed, turbid, contaminated or clotted samples should not be used.
- With the slide method, unspecific reactions might appear due to drying of the reaction-formation or if the slide is heated.
- Due to variability of antigen expression, reactivity of these reagents against certain phenotypes may produce a weaker reaction compared to control cells.
- Some red blood cells may have developed Rh variants that may not be recognized with monoclonal antibodies of a clone. Therefore the tests should / have to be carried out with at least two different clones / cloning mixtures as required in some countries. Deviating test results require further testing.
- No one specific antiserum or technique can be guaranteed to detect all rare, weak or variant antigens <sup>2</sup>.
- Red blood cells coated with alloantibodies or autoantibodies of the same or similar specificity as the reagent (i.e., cells that are positive in the direct antiglobulin-test [DAT]) may give false-positive results in card method. These cells react positive without testserum too.
- Red blood cells coated with antibodies (cells that are positive in the direct antiglobulin-test [DAT]) are not suitable for this test procedure.
- Pay attention to all statements to limitations in inserts of used Ortho BioVue® Reverse Diluent Cassettes and the user manual of respective analyzer.
- Negative test results with anti-e (clones: MS-62, MS-69) in microplate method have to be confirmed by another technique, as false negative results may occur.
- Do not use blood of newborn on microplates.
- With cord cells anti-c (clone: MS-33) may possess anti-I/i cold agglutinin activity and therefore show false positive results.

### PERFORMANCE

In compliance with Common Technical Specifications (CTS Commission Decision of 03. February 2009) a performance evaluation was conducted. Different samples (donor, patient, neonates-, panel blood) was used and compared with other reference methods / products.

Product	Positive	False negative	Sensitivity	Negative	False positive	Specificity
Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273	844	0	100%	391	0	100%
Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35	1005	0	100%	230	0	100%
Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260	327	0	100%	908	0	100%
Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69	1417	0*	100%*	65	0	100%

\* for Anti-e (clones MS-62, MS-69) in microplate method 42 samples were tested false negative, so in this method sensitivity was 97,12% only.  
(see "Limitations of the procedure" item 8)

### LITERATURE

- Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)
- CLSI, I/LA33-A Validatin of Automated System for Immunhematological Testing Before Implementation; Approved Guidline CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE Dezember 2009
- Peter D. Issit, David J. Anstee Applied Blood Group Serology, fourth edition, Montgomery Scientific Publications 1998
- Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel Transfusionsmedizin, 3. Auflage, Springer-Verlag 2004.

### LEGEND OF SYMBOLS

	Store from + to	<b>REF</b>	Product Code		Expiration Date		Manufacturer as to 98/79/EU
<b>LOT</b>	Lot	<b>CLON</b>	Clone(s)	<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device		EU CE-symbol
<b>UDI</b>	Unique Device Identification		Consult Instrucion for use				

730-22-0518 Versione 018 / 01.07.2021

Antitoxin GmbH, Industriestraße 88, 69245 Bammental, Germany

+49 (0) 6223/ 8661-0 +49 (0) 6223/ 8661-13 gara@antitoxin-gmbh.de

## ISTRUZIONI PER L'USO

**Anti-C (RH2), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-E (RH3), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-c (RH4), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-e (RH5), monoclonal IgM (human) OrthoClone**

REF	690211A
REF	690321A
REF	690281A
REF	690361A

### USO PREVISTO

I reagenti monoclonali Anti-C, -E, -c, -e sono preparati da sovrinatanti di colture cellulari di linee cellulari di etero-ibridomi, che secerne anticorpi di tipo IgM specifici per l'antigene corrispondente. L'anticorpo è sempre una proteina umana. Il reagente viene impiegato per l'analisi qualitativa in vitro della presenza o assenza dell'antigene del gruppo sanguigno C, c, E, e su eritrociti umani. Le procedure individuate sono per i metodi manuali quotate e applicazione delle cassette BioVue® Reverse Diluent sulle seguenti macchine ORTHO VISION™ Analyzer e ORTHO AutoVue® Innova. L'uso di questi antisieri deve essere fatto solamente da personale tecnico qualificato.

### PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Le procedure utilizzate con questi reagenti sono basate sul principio dell'agglutinazione. Gli eritrociti umani, che possiedono il corrispondente antigene, agglutinano in presenza dello specifico anticorpo diretto contro l'antigene stesso.

### REAGENTI

I reagenti sono prodotti dai seguenti cloni:

Anti-C monoclonale, human IgM Clone: MS-273

Anti-c monoclonale, human IgM Clone: MS-35

Anti-E monoclonale, human IgM Clones: MS-12, MS-260

Anti-e monoclonale, human IgM Clones: MS-62, MS-69

Tutti questi reagenti contengono <0.1% (w/v) di Sodio Azide come conservante. In aggiunta, i reagenti contengono anticorpi attivi, cloruro di sodio, macromolecole ed albumina bovina.

**AVVERTENZE:** Questi reagenti sono preparati da sovrinatanti di colture cellulari. Come tutti i prodotti biologici deve essere trattato come materiale potenzialmente infettivo a causa della impossibilità di escludere totalmente il pericolo di trasmissione di malattie. I reagenti contenenti Sodio Azide possono essere tossici e possono reagire con piombo o rame formando sali ad alto potenziale esplosivo. Durante lo smaltimento, sciacquare abbondantemente con acqua. Per i motivi sopra elencati maneggiati con estrema cura.

### CONSERVAZIONE

Conservare (chiuso non ancora usato/chiuso già usato) da +2 a +8 °C. Tenere a temperatura di laboratorio mentre sono in uso. Se utilizzate i dispositivi ORTHO VISION™ Analyzer o ORTHO AutoVue® Innova, i reagenti può rimanere nel dispositivo fino a 5 giorni (da +15 a +30 °C). Conservare ed utilizzare i reagenti solamente fino alla data di scadenza.

### NOTE

- In ogni sessione di test devono essere eseguiti controlli positivi e negativi.
- Una conservazione inadeguata compromette l'efficacia dei reagenti.
- Una debole torbidità dei reagenti non influisce sulla sua reattività. Evitare la contaminazione batterica e chimica del prodotto. Se viene rilevato un cambiamento visibile, potrebbe trattarsi di un segno di contaminazione microbiologica e il reagente non deve più essere utilizzato.
- La forza delle reazioni positive dipende anche dall'età del sangue usato.
- Una centrifugazione molto differente da quella consigliata può causare risultati non adeguati. Con il metodo della scheda l'uso di un'altra centrifuga per scheda specifica (ogni centrifuga per schede ha la sua specifica forza g non modificabile) può portare a risultati falsi a causa della forza g modificata.
- Le procedure sotto descritte si riferiscono all'esecuzione manuale dei test e strumentazioni automatiche. Utilizzando altri strumentazioni automatiche o semi-automatiche, seguire le procedure contenute nei manuali forniti dal produttore dello strumento. I laboratori devono seguire procedure di validazione approvate.
- Per l'utilizzo di questo reagente è necessario rispettare tutte le leggi, direttive e linee guida nazionali vigenti. In Germania in particolare le "Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten Hämotherapie"<sup>74</sup> nella versione attuale.

### PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- I campioni di sangue devono essere raccolti secondo una procedura medica approvata.
- I campioni di sangue da testare devono essere utilizzati il prima possibile Dopo il prelievo di sangue, in modo da ridurre il rischio di risultati falsi positivi e falsi negativi a causa della conservazione inadeguata o della contaminazione dei reagenti.  
Se si verifica un ritardo nel test, i campioni devono essere conservati a una temperatura compresa tra +2 e +8°C.  
I campioni di sangue anticoagulati con EDTA devono essere analizzati entro 7 giorni e quelli trattati con citrato di sodio entro 14 giorni dal prelievo.  
Sacca di sangue / Il sangue del donatore può essere testato entro la data di scadenza.

### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Non è richiesta alcuna preparazione dei reagenti. Utilizzare direttamente i reagenti dai flaconi.

### PROCEDURA

Materiale non provvisto, ma necessario:

Slide Method	Metodo in Provetta con Centrifugazione	Metodo in Micropietra	Utilizzare Cassette Ortho BioVue®
1. Vetrino	1. Provette, 10 x 75 mm o 12 x 75 mm	1. Micropietra con fondo ad U, se possibile pre-trattata	1. Centrifuga Ortho BioVue® System
2. Pipetta Pasteur	2. Micropipetta da 50µL/100 µL	2. Centrifuga, con possibilità di centrifugazione delle micropietre	2. Soluzione fisiologica isotonica (0,85 - 0,9% Cloruro di Sodio)
3. Bastoncino per miscelare	3. Centrifuga	3. Porta-piastre per centrifuga (opzionale)	3. Micropipetta da 10 µL, 40 µL e 50 µL
4. Cronometro	4. Soluzione fisiologica Isotonica (0,85 - 0,9% Cloruro di Sodio)	4. Agitatore per micropiastre	4. Puntali per micropipetta
	5. Puntali per micro-pipetta	5. Specchio per micropiastre (opzionale)	5. Stazione di lavoro Ortho BioVue® System
	6. Cronometro	6. Micropipetta da 50 µL	6. Ortho BioVue® Reserve Diluent cassette
		7. Soluzione fisiologica Isotonica (0,85 - 0,9% Cloruro di Sodio)	7. Provette, 10 x 75 mm o 12 x 75 mm
		8. Puntali per micro-pipetta	8. Cronometro
		9. Provette, 10 x 75 mm o 12 x 75 mm	9. Centrifuga
		10. Cronometro	

### Procedura del test

#### Metodo su Vetrino

- Usare emazie sedimentate.
- Aggiungere una goccia (ca. 50 µL) del reagente appropriato sul vetrino.
- Usando una pipetta Pasteur aggiungere una goccia di emazie sedimentate (ca. 50 µL) sul vetrino.
- Miscelare reagente ed emazie con un bastoncino in maniera circolare di circa 2 cm di diametro.
- Ruotando dolcemente il vetrino, controllare per agglutinazione entro 1 minuto (la reazione parte in pochi secondi).
- Registrare il risultato.

#### Metodo in Provetta con Centrifugazione

- Preparare una sospensione in soluzione fisiologica al 2-5% di emazie (emazie lavate da una a tre volte con soluzione fisiologica isotonica).
- Aggiungere 100 µL (in alternativa una goccia, ca. 50 µL) del reagente appropriato in una provetta etichettata.
- Aggiungere 100 µL (in alternativa una goccia, ca. 50 µL) della appropriata sospensione eritrocitaria in provetta.
- Miscelare bene con delicatezza.
- Incubare la provetta a temperatura ambiente per 1-15 Minuti.
- Centrifugare 1 Minuto a 2.000 rpm (ca. 800 - 1.000 g).
- Staccare completamente le cellule dal fondo scuotendole delicatamente e verificare macroscopicamente per agglutinazione entro 3 Minuti.
- Registrare il risultato.

#### Metodo in Micropietra

- Preparare una sospensione eritrocitaria in soluzione fisiologica al 2-5%. Le emazie devono essere lavate da una a tre volte con Soluzione fisiologica isotonica.
- Aggiungere in ogni pozzetto una goccia (ca. 50 µL) del reagente appropriato.
- Aggiungere in ogni pozzetto una goccia (ca. 50 µL) della sospensione eritrocitaria.
- Agitare la micropietra su un agitatore per micropiastre.

**Note:** Raccomandazioni: (1) Agitare da 10 a 30 secondi con media velocità; (2) Risospensione: da 10 a 30 Secondi con media velocità e forza adeguata, permettendo una completa risospensione delle emazie senza distruggere i risultati positivi.

- Centrifugazione della micropietra. Tempo di centrifugazione consigliato: 30 Secondi a circa 400 x g o quanto è necessario per produrre le migliori reazioni positive con le emazie antigeniche positive, pur avendo ancora una facile risospensione delle emazie antigeniche negative.

**Note:** La forza di centrifugazione usata dovrebbe essere la forza minima utile a produrre un sedimentazione con un sovrinatante limpido. A causa delle differenze fra le centrifughe utilizzate non può essere suggerita una velocità o durata di centrifugazione ottimale. Ogni laboratorio deve testare e validare la sua attrezzatura per la velocità ed i tempi di centrifugazione ottimali.

- Allentare i pulsanti eritrociti sul shaker e posizionare la micropietra per la lettura.
- Leggere la micropietra e documentare i risultati.
- I test con risultati negativi o dubbi devono essere incubati da 5 a 10 minuti a temperatura ambiente.
- Ripetere i passi da 5 a 7 dopo l'incubazione a temperatura ambiente.

**Note:** Tutti i tests dovranno essere risospesi e valutati direttamente dopo la centrifugazione.

## Methodo di Test Manuale in Cassette Ortho BioVue® Reverse Diluent

Il metodo descritto di seguito è valido unicamente per analisi manuale sulle cassette Ortho BioVue®. Fare per favore riferimento alle istruzioni per l'uso delle Cassette Ortho BioVue® Reverse Diluente, sezione MODALITÀ DI CONSERVAZIONE, PRECAUZIONI, PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE, e INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI, AL MEGLIO - DOVE APPLICABILE - LIMITI DELLA PROCEDURA.

1. Per la preparazione delle cassette, fare riferimento alle istruzioni per l'uso delle cassette Ortho BioVue® Reverse Diluent, capitolo "PROCEDURA" punto 1 o 2.
  2. Preparare una sospensione eritrocitaria al 3-5% in soluzione fisiologica. In modo facoltativo, gli eritrociti potrebbero essere lavati più di tre volte in soluzione fisiologica.
  3. Aggiungere 10 µL della sospensione eritrocitaria al 3-5% del campione in esame alla appropriata camera di reazione della cassetta.
  4. Aggiungere 40 µL di antisiero nella colonna di reazione. Il puntale non deve venire a contatto con la camera di dispensazione. Se questo avviene è indispensabile sostituire il puntale stesso prima di passare alla dispensazione successiva.
  5. Centrifugare le cassette nella centrifuga Ortho BioVue® System.
- Nota:** La centrifugazione deve essere eseguita entro 30 minuti dal momento dell'aggiunta dei campioni nella camera di reazione.
6. Al termine del test, leggere ogni colonna della cassetta da entrambi i lati per rilevare agglutinazione e/o emolisi.
  7. Registrare il risultato finale del test considerando dal lato con il risultato positivo più pronunciato.

## Tests in Cassette Ortho BioVue® Reverse Diluent su ORTHO VISION™ Analyzer o ORTHO AutoVue® Innova

Si prega di seguire le istruzioni nel manuale utente del rispettivo dispositivo.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

"Attenta rotazione / agitazione" per il metodo su vetrino, di centrifugazione del tubo e in micropiastrella:

Risultati Positivi (+): L'agglutinazione visibile di emazie è un risultato positivo ed indica la presenza dei corrispondenti antigeni.

Risultati Negativi (-): Una agglutinazione non visibile degli eritrociti è un risultato negativo ed indica l'assenza degli antigeni corrispondenti.

Cassette: Per l'interpretazione dei risultati in cassette Ortho BioVue® Reverse nel metodo manuale, fare riferimento alle istruzioni per l'uso delle cassette, capitolo "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI". Per gli analizzatori, la lettura e l'interpretazione viene effettuata automaticamente da ogni dispositivo.

### LIMITI DELLA PROCEDURA

1. Il mancato rispetto delle istruzioni riportate nella sezione „Procedure“ ed „Interpretazione dei risultati“ può produrre risultati non corretti.
2. Se i controlli sono dubbi o non corretti, non può essere raggiunta alcuna conclusione valida per quanto riguarda i risultati.
3. Gli eritrociti trattati con enzima possono reagire aspecificamente.
4. Campioni di sangue emolizzati, torbidi, contaminati o coagulati non possono essere impiegati nel test.
5. Possono riscontrarsi reazioni aspecifiche da artefatti dovuti all'essiccazione o per il riscaldamento del vetrino.
6. A causa della variabilità degli antigeni, la reattività di questi reagenti verso alcuni fenotipi potrebbe dare reazioni più deboli rispetto a quelle ottenute con le emazie di controllo.
7. Alcuni eritrociti potrebbero aver formato varianti Rh che potrebbero non essere rilevate con anticorpi monoclonali di un clone. Le prove devono essere eseguite con almeno due cloni/miscela di cloni diversi, così come in alcuni paesi è prescritto è prescritto. Se i risultati della prova differiscono, devono essere effettuate ulteriori prove.
8. Non è possibile garantire l'esistenza di un antisiero o di una tecnica specifica per rilevare tutti gli antigeni varianti, deboli o rari.2
9. Gli eritrociti sensibilizzati con alloanticorpi o autoanticorpi di specificità pari o simile a quella del reagente (per es. eritrociti positivi al test diretto dell'antiglobulina) non sono adatti a questo test.
10. In caso di eritrociti con test di Coombs diretto positivo il Card test può produrre risultati "falsi positivi".
11. Prestare attenzione a tutte le indicazioni per le limitazioni in inserti di Ortho BioVue® Reverse Diluent Cassette utilizzate e il manuale utente dell'analizzatore rispettivo.
12. Presso il test con metodo in micropiastrella, tutti i risultati negativi con anti-e (cloni: MS-62, MS-69) deve essere ripetuta con una tecnica diversa perché può causare risultati falsi negativi.
13. Presso sangue del cordone ombelicale Anti-c (clone: MS-33) può mostrare attività dei Anti-I/i anticorpi freddi. Questo può portare a risultati falsi positivi.
14. Il sangue appena nato è escluso per il metodo di prova sulla piastra del microtitolo.

### PRESTAZIONI

Una valutazione delle prestazioni dei prodotti è stata effettuata in conformità con le Common Technical Specifications (decisione CTS della Commissione, del 3 febbraio 2009). Ci sono stati diversi campioni (del donatore, del paziente, pannelli sangue) sono confrontati e utilizzati con altri prodotti.











Prodotto	Positivo	Falso negativo	Sensibilità	Negativo	Falso positivo	Specificità
Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273	844	0	100%	391	0	100%
Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35	1005	0	100%	230	0	100%
Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260	327	0	100%	908	0	100%
Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69	1417	0*	100%*	65	0	100%

\* per Anti-e (cloni: MS-62, MS-69) 42 campioni sono risultati a tassi di falsi negativi nel test micropiastrella, in modo che in questa tecnica, la sensibilità era solo 97,12%. (vedere "Limiti della procedura" item 8)


### LETTERATURA




1. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)
2. CLSI, I/LA33-A Validatin of Automated System for Immunhematological Testing Before Implementation; Approved Guidline CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE Dezember 2009
3. Peter D. Issit, David J. Anstee Applied Blood Group Serology, fourth edition, Montgomery Scientific Publications 1998
4. Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel Transfusionsmedizin, 3. Auflage, Springer-Verlag 2004.

### SIMBOLI

 Conservare da..... a.... °C	 REF Art.- N° Articolo	 Data di scadenza	 Fornitore 98/79/EU
 LOT Codice lotto	 CLON Clone	 IVD Diagnostico-In-Vitro	 CE EU CE-symbol
 UDI Unique Device Identification	 Consultare le istruzioni per l'uso		

730-22-0518 Versione 018 / 01.07.2021

 Antitoxin GmbH, Industriestraße 88, 69245 Bammental, Germania

 +49 (0) 6223/ 8661-0  +49 (0) 6223/ 8661-13  [gara@antitoxin-gmbh.de](mailto:gara@antitoxin-gmbh.de)

## UPUTE ZA UPOTREBU

**Anti-C (RH2), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-E (RH3), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-c (RH4), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-e (RH5), monoclonal IgM (human) OrthoClone**

**REF** 690211A  
**REF** 690321A  
**REF** 690281A  
**REF** 690361A

### NAMJENA

Monoklonski pretraživani serumi anti-C, E, c i e dobivaju se od supernatanata staničnih kultura heterohibridnih staničnih linija koje izlučuju antitijela tipa IgM posebno usmjerena protiv odgovarajućeg antigena krvne grupe. Antitijelo je pritom ljudski protein. Pretraživani serumi upotrebljavaju se za kvalitativno in vitro otkrivanje prisutnosti ili nepostojanja antigena krvnih grupa C, c, E ili e na ljudskim eritrocitima. Opisani postupci odnose se na navedene ručne metode i primjenu s kasetama Ortho BioVue® Reverse Diluent na automatskim uređajima ORTHO VISION™ Analyzer i ORTHO AutoVue® Innova. Samo kvalificirano i obučeno osoblje smije upotrebljavati ove pretraživane serume.

### PRINCIP POSTUPKA

Ispitne metode koje se primjenjuju pri upotrebi ovih proizvoda temelje se na načelu aglutinacije. Normalne ljudske eritrocite koji nose odgovarajući antigen aglutinira odgovarajuće antitijelo.

### PRETRAŽIVANI SERUMI

Navedeni pretraživani serumi krvnih grupa proizvode se od sljedećih staničnih klonova:

Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273

Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35

Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260

Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69

Svi pretraživani serumi sadržavaju < 0,1 % (w/v) natrijeva azida kao konzervansa. Osim aktivnog sastojka antitijela pretraživani serumi sadržavaju natrijev klorid, spojeve velike molekulske mase i goveđi albumin, koje su provjerili i certificirali inspektori Američke veterinarske službe (US Veterinary Service).

**UPOZORENJE:** Ovi pretraživani serumi proizvode se od supernatanata staničnih kultura. Neovisno o tome, ti se biološki proizvodi trebaju smatrati potencijalno zaraznima zbog opasnosti od patogena koja se nikad ne može potpuno isključiti. Pretraživani serumi sadržavaju natrijev azid, koji može djelovati otrovno te tvoriti eksplozivne soli s olovom ili bakrom. Pri zbrinjavanju isperite s puno vode. Iz gore navedenih razloga potrebno je oprezno rukovati pretraživanim serumima.

### ČUVANJE

Čuvajte na temperaturi od 2 do 8 °C (neotvoreno/otvoreno), a kratkotrajno za upotrebu i na sobnoj temperaturi. Ako se upotrebljavaju uređaji ORTHO VISION™ Analyzer ili ORTHO AutoVue® Innova, pretraživani serumi mogu ostati na uređaju najviše pet dana (15 °C do 30 °C). Načelno čuvajte i upotrebljavajte samo do navedenog roka valjanosti!

### NAPOMENE

- Pri svakom testiranju potrebno je uz sebe imati pozitivne i negativne kontrole.
- Neispravno čuvanje utječe na učinkovitost proizvoda.
- Lagana mutnoća ne utječe na reaktivnost gore navedenih pretraživanih seruma. Mora se spriječiti bakterijska i kemijska kontaminacija. Ako primijetite vidljive promjene u pretraživanom serumu, nemojte ga više upotrebljavati jer to može upućivati na mikrobnu kontaminaciju.
- Jakost pozitivne reakcije ovisi o starosti upotrijebljene krvi.
- Centrifugiranje izvan specificiranog raspona broja okretaja može dovesti do netočnih rezultata. U metodi s karticama primjena centrifuge specifične za drugu karticu (svaka centrifuga kartica ima svoj fiksni nepromjenjivi broj g) može dovesti do pogrešnih rezultata zbog promijenjenog broja g.
- Opisani postupci za primjenu vrijede samo za navedene ručne metode i automatske uređaje. Ako se upotrebljavaju drugi automatski ili poluautomatski sustavi, laboratoriji moraju slijediti upute proizvođača uređaja i provesti validaciju u skladu s prihvaćenim postupcima.
- Prilikom primjene pretraživanih seruma potrebno je pridržavati se svih važećih nacionalnih zakona, uredbi i smjernica, a u Njemačkoj posebno „Smjernica za prikupljanje krvi i krvnih sastojaka te za primjenu proizvoda od krvi (hemoterapija)” u najnovijoj verziji.
- Obavezno se pridržavajte napomena o primjeni kartica za testiranje u pripadajućim uputama za upotrebu.

### PRIPREMA UZORAKA

- Uzorke krvi potrebno je prikupljati jednom od uobičajenih tehnika uzorkovanja.
- Krv koja se ispituje potrebno je provjeriti čim prije nakon uzimanja uzorka kako bi se opasnost od lažno pozitivnih odnosno lažno negativnih reakcija zbog nepropisnog čuvanja ili kontaminacije uzorka svela na najmanju moguću mjeru. Krv koja se ne ispita odmah pohranite na temperaturi od 2 do 8 °C. Uzorke krvi antikoagulirane s pomoću EDTA-e potrebno je ispitati u roku od 7 dana, a uzorke obrađene natrijevim citratom u roku od 14 dana od prikupljanja. Konzervirana/darovana krv može se ispitati do datuma isteka valjanosti.

### PRIPREMA PRETRAŽIVANIH SERUMA

Pretraživane serume nije potrebno pripremiti. Serumi se uzimaju i upotrebljavaju izravno iz bočica.

### POSTUPAK

Materijali koji nisu uključeni u isporuku, ali su potrebni:

#### Metoda predmetnih stakalaca

- Predmetno stakalce
- Pasteurova pipeta
- Štapići za miješanje
- Brojač vremena

#### Metoda epruveta

- Epruveta, 10 x 75 mm ili 12 x 75 mm
- Mikrolitarska pipeta za 50 µL/100 µL
- Brojač vremena
- Centrifuga
- Izotonična fiziološka otopina (0,85-0,9 % natrijeva klorida)
- Jednokratni nastavci za pipetu

#### Metoda mikrotitarskih pločica

- Mikrotitarske pločice s dnom u obliku slova U, po potrebi prethodno obrađene
- Brojač vremena
- Laboratorijska centrifuga koja može primiti (nosače) mikrotitarske pločice
- Nosač mikrotitarske pločice za centrifugu (opcionally)
- Tresilica mikrotitarskih pločica
- Ogledalo za očitavanje testova mikrotitarskih pločica (opcionally)
- Mikrotitarske pipete za doziranje od 50 µL
- Izotonična fiziološka otopina (0,85-0,9 % natrijeva klorida)
- Jednokratni nastavci za pipetu
- Epruveta 10 x 75 mm ili 12 x 75 mm

#### Upotreba kaset Ortho BioVue®

- Centrifuga sustava Ortho BioVue®
- Izotonična fiziološka otopina (0,85-0,9 % natrijeva klorida)
- Mikrolitarska pipeta za doziranje od 10 µL, 40 µL i 50 µL
- Jednokratni nastavci za pipetu
- Radni stalak sustava Ortho BioVue®
- Kaseta Ortho BioVue® Reverse Diluent
- Epruveta 10 x 75 mm ili 12 x 75 mm
- Brojač vremena
- Centrifuga

### Provođenje ispitivanja

#### Test predmetnog stakalca

- Upotrebljavajte samo sediment eritrocita.
- Na označeno predmetno stakalce nanosite jednu kap (oko 50 µL) odgovarajućeg pretraživanog seruma.
- Kapi pretraživanog seruma na predmetnom stakalcu s pomoću Pasteurove pipete dodajte jednu kap (oko 50 µL) sedimenta eritrocita.
- Dobro promiješajte smjesu eritrocita i pretraživanog seruma štapićem za miješanje i rasporedite je u obliku kruga promjera oko 2 cm.
- Uz jednodimenzionalno lagano njihanje predmetnog stakalca provjerite je li došlo do aglutinacije (početak reakcije nakon nekoliko sekundi).
- Zabilježite rezultate.

#### Test centrifugiranja epruveta

- Pripremite 2 – 5 %-tnu suspenziju eritrocita u izotoničnoj fiziološkoj otopini (eritrociti se mogu prethodno 1-3 puta oprati izotoničnom fiziološkom otopinom).
- U svaku epruvetu dodajte 100 µL (alternativno po jednu kap (oko 50 µL)) odgovarajućeg pretraživanog seruma.
- U svaku epruvetu dodajte 100 µL (alternativno po jednu kap (oko 50 µL)) odgovarajuće suspenzije eritrocita.
- Lagano protresite smjesu eritrocita i pretraživanog seruma.
- Inkubirajte epruvete pri sobnoj temperaturi 1-15 minuta.
- Centrifugirajte epruvete 1 minutu pri 2000 okr./min (oko 800-1000 g).
- Stanice oprezno u potpunosti otrese s dna epruveta i u roku od 3 minute makroskopski provjerite je li došlo do aglutinacije.
- Zabilježite rezultate.

#### Test mikrotitarskih pločica

- Pripremite 2 – 5 %-tnu suspenziju eritrocita u izotoničnoj fiziološkoj otopini (eritrociti se mogu prethodno 1 – 3 puta oprati izotoničnom fiziološkom otopinom).
- Dodajte jednu kap (oko 50 µL) odgovarajućeg pretraživanog seruma u označeno udubljenje.
- Dodajte jednu kap (oko 50 µL) odgovarajuće suspenzije eritrocita u ispitnu šupljinu.
- Na tresilici mikrotitarskih pločica pomiješajte mikrotitarsku pločicu.

**NAPOMENA:** Preporučeno trajanje za mehaničke tresilice:

- Miješanje: 10 do 30 sekundi pri srednjoj jačini protresanja;
- Resuspendiranje: 10 do 30 sekundi pri srednjoj jačini protresanja odnosno uz trajanje i brzinu kojima se omogućuje potpuna resuspenzija cijele nakupine stanica, a da se pritom ne unište pozitivne reakcije.

#### Centrifugiranje pločica

Predloženo vrijeme centrifugiranja: 30 sekundi na oko 400 x g ili koliko je potrebno da bi se s korištenom centrifugom i mikrotitarskom pločicom omogućila najjača reakcija antitijela s eritrocitima koji nose antigen pri kojoj se još uvijek lako može postići resuspenzija antigen negativnih eritrocita.

**NAPOMENA:** Centrifugalna sila koja se primjenjuje na smjesu stanica i pretraživanog seruma treba biti minimalna sila kojom se mogu stvoriti nakupina eritrocita i jasan supernatant.

Zbog velikog broja centrifuga dostupnih na tržištu ne možemo preporučiti određenu brzinu ili vrijeme centrifugiranja koji bi bili idealni za sve konfiguracije.

Svaki laboratorij mora kalibrirati postojeći uređaj i ispitati koliko dugo je potrebno centrifugirati pri zadanoj brzini kako bi se postigao željeni rezultat.

6. Otpustite nakupine eritrocita na tresilici i postavite pločicu za očitavanje.

7. Očitajte i zabilježite rezultat.

8. Inkubirajte negativne ili sumnjive testove na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 do 10 minuta.

9. Ponovite korake od 5 do 7 nakon inkubacije na sobnoj temperaturi.

**NAPOMENA:** Sve smjese treba ocijeniti odmah nakon centrifugiranja i resuspendiranja.

## Ručna metoda ispitivanja u kasetama Ortho BioVue® Reverse Diluent

Postupak opisan u nastavku odnosi se isključivo na ručno provođenje ispitivanja s pomoću kaset Ortho BioVue®. U uputama za upotrebu kaset Ortho BioVue® Reverse Diluent obratite pozornost na odjeljke ČUVANJE, MJERE OPREZA, UZORKOVANJE I PRIPREMA UZORAKA, PRIPREMA PRETRAŽIVANIH SERUMA I TUMAČENJE REZULTATA te ako je primjenjivo OGRANIČENJA POSTUPKA.

1. Za pripremu kasete slijedite točke 1. i 2. u odjeljku „Provođenje ispitivanja“ u uputama za upotrebu kaset Ortho BioVue® Reverse Diluent.
2. Pripremite 3 – 5 %-tnu suspenziju eritrocita u izotoničnoj fiziološkoj otopini (eritrociti se mogu prethodno 1 – 3 puta oprati izotoničnom fiziološkom otopinom).
3. Dodajte 10 µL odgovarajuće 3 do 5 %-tne suspenzije eritrocita u označenu reakcijsku komoru kasete.
4. Dodajte 40 µL odgovarajućeg pretraživanog seruma u reakcijsku komoru.  
(Nemojte nastavkom za pipetu dodirnuti rub reakcijske komore. Ako se to ipak dogodi, zamijenite nastavak za pipetu prije punjenja sljedeće reakcijske komore.)
5. Centrifugirajte kasetu s pomoću centrifuge sustava Ortho BioVue® s nepromjenjivim brojem g za centrifugu.

**NAPOMENA:** Centrifugiranje se mora izvršiti u roku od 30 minuta nakon dodavanja uzoraka u reakcijske komore.

6. Nakon završetka testa provjerite na prednjoj i stražnjoj strani svakog stupca je li došlo do aglutinacije i/ili hemolize.

7. Zabilježite jačinu reakcije sa strane s izraženijim pozitivnim rezultatom.

## Test u kasetama Ortho BioVue® Reverse Diluent s automatskim uređajima ORTHO VISION™ Analyzer ili ORTHO AutoVue® Innova

Slijedite upute u korisničkom priručniku za odgovarajući uređaj.

### TUMAČENJE REZULTATA TESTA

„Oprezno njihanje/protresanje“ pri metodama predmetnih stakalaca, epruveta i mikrotitrarskih pločica:

Pozitivni rezultat (+): Aglutinacija eritrocita smatra se pozitivnim rezultatom testa i pokazuje prisutnost odgovarajućeg antigena.

Negativni rezultat (-): Izostanak aglutinacije eritrocita smatra se negativnim rezultatom testa te se odgovarajući antigen ne može otkriti.

Kasete: Za ocjenu rezultata u kasetama Ortho BioVue® Reverse Diluent pri ručnoj metodi pogledajte odjeljak „TUMAČENJE REZULTATA“ u pripadajućim uputama za upotrebu. U slučaju automatskih uređaja uređaj sam očitava i ocjenjuje rezultat.

### OGRANIČENJA METODE

1. Nepravilnosti u pridržavanju uputa iz odjeljaka „Provođenje ispitivanja“ i „Tumačenje rezultata testa“ mogu dovesti do pogrešnih rezultata.
2. Provedene kontrole s nejasnim ili netočnim rezultatima automatski dovode do neiskoristivosti svih rezultata.
3. Enzimski obrađeni eritrociti ili dodavanje goveđeg albumina i/ili drugih otopina koje sadržavaju proteine mogu dovesti do nespecifičnih reakcija s ovim pretraživanim serumima.
4. Ne smiju se upotrebljavati hemolizirani, mutni, kontaminirani ili zgrušani uzorci krvi.
5. Pri metodi predmetnih stakalaca može doći do nespecifičnih reakcija pri sušenju reakcijske smjese odnosno zagrijavanju predmetnog stakalca.
6. Zbog različite manifestacije antigena pri određenim fenotipovima s tim reagensima može doći do slabije reakcije nego s kontrolnim eritrocitima.
7. Neki eritrociti mogu imati razvijene Rh-varijante koje se možda ne mogu otkriti monoklonalnim antitijelima klona. Testovi bi se trebali / moraju se provesti s najmanje dva različita klona / dvije različite klonске smjese kako je propisano u nekim zemljama. U slučaju odstupanja rezultata testa moraju se provesti dodatni testovi.
8. Nijedan pojedinačni pretraživani serum i nijedna pojedinačna metoda ne može jamčiti otkrivanje svih rijetkih ili slabih antigena i svih varijanti antigena <sup>2</sup>.
9. Eritrociti koji su senzibilizirani aloantitijelima ili autoantitijelima iste ili slične specifičnosti kao pretraživani serum (npr. eritrociti pozitivni u izravnom antiglobulinskom testu) nisu prikladni za ove testove.
10. U slučaju eritrocita s pozitivnim izravnim Coombsovim testom može doći do lažno pozitivnih rezultata u tehnici s kasetama. Te stanice reagiraju pozitivno i bez pretraživanog seruma.
11. Obratite pozornost na napomene o ograničenjima u uputama za upotrebu korištenih kaset Ortho BioVue® Reverse Diluent i korisničkom priručniku korištenog automatskog uređaja.
12. Pri testu mikrotitrarskih pločica sve negativne rezultate s anti-e (klonovi: MS-62, MS-69) potrebno je ponoviti u drugoj tehnici jer mogu dati lažno negativne rezultate.
13. U slučaju krvi iz pupkovine anti-c (klon: MS-33) može pokazivati aktivnosti hladnih antitijela anti-I/i te stoga dovesti do lažno pozitivnih rezultata.
14. Krv novorođenčadi nije dopuštena za metodu ispitivanja na mikrotitrarskoj pločici.

### UČINAK

Učinak proizvoda ocijenjen je u skladu sa zajedničkim tehničkim specifikacijama (odluka CTS Komisije od 3. veljače 2009.). Upotrijebljeni su različiti uzorci (krv darivatelja, pacijenata, panela) te su uspoređeni s drugim proizvodima.











Proizvod	Pozitivno	Lažno negativno	Osetljivost	Negativno	Lažno pozitivno	Specifičnost
Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273	844	0	100 %	391	0	100 %
Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35	1005	0	100 %	230	0	100 %
Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260	327	0	100 %	908	0	100 %
Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69	1417	0*	100 %*	65	0	100 %

\* za anti-e (klonovi: MS-62, MS-69) u testu mikrotitrarskih pločica lažno su negativno ocijenjena 42 uzorka te je stoga osjetljivost u toj tehnici iznosila samo 97,12 %.  
(Pogledajte „Ograničenja metode“, točka 8.).

### POPIS LITERATURE




1. Smjernice za prikupljanje krvi i krvnih sastojaka te za primjenu proizvoda od krvi (hemoterapija)
2. CLSI, I/LA33-A Validatin of Automated System for Immunhematological Testing Before Implementation; Approved Guideline  
CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, prosinac 2009.
3. Peter D. Issit, David J. Anstee Applied Blood Group Serology, fourth edition, Montgomery Scientific Publications 1998.
4. Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel Transfusionsmedizin, 3. izdanje, Springer-Verlag 2004.

### SIMBOL – LEGENDA

 Čuvanje od – do	 REF Broj artikla	 Rok valjanosti	 Proizvođač prema 98/79/EZ
 LOT Serija	 CLON Klon/klonovi	 IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod	 Simbol CE EZ-a
 UDI Jedinствена identifikacija proizvoda	 Obratiti pozornost na upute za upotrebu		

730-22-0518 Verzija 018 / 01.07.2021

 Antitoxin GmbH, Industriestraße 88, 69245 Bammental, Njemačka

 +49 (0) 6223/ 8661-0  +49 (0) 6223/ 8661-13  [gara@antitoxin-gmbh.de](mailto:gara@antitoxin-gmbh.de)



## NAVODILA ZA UPORABO

**Anti-C (RH2), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-E (RH3), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-c (RH4), monoclonal IgM (human) OrthoClone**  
**Anti-e (RH5), monoclonal IgM (human) OrthoClone**

**REF** 690211A  
**REF** 690321A  
**REF** 690281A  
**REF** 690361A

### NAMENSKA UPORABA

Testni serumi monoklonskih anti-C, -E, -c, -e se pridobivajo iz supernatantov celične kulture celičnih linij heterohibridoma, ki izločajo protitelesa tipa IgM, ki so specifično usmerjena proti ustreznemu antigenu krvne skupine. Protitelesa so pri tem človeške beljakovine. Testni serumi se uporabljajo za kvalitativno in vitro detekcijo prisotnosti ali odsotnosti antigenov krvne skupine C, c, E ali e na človeških eritrocitih. Opisani postopki veljajo za navedene ročne metode in za uporabo s kasetami Ortho BioVue® Reverse Diluent na avtomatiziranim analizatorju ORTHO VISION™ in napravi ORTHO AutoVue® Innova. Uporaba teh testnih serumov je namenjena samo kvalificiranemu in usposobljenemu specializiranemu osebju.

### NAČELO POSTOPKA

Testne metode, ki se uporabljajo pri uporabi teh izdelkov, temeljijo na principu aglutinacije. Normalni človeški eritrociti, ki nosijo ustrezen antigen, so aglutinirani z ustreznim protitelesom.

### TESTNI SERUMI

Navedeni testni serumi krvnih skupin so proizvedeni iz naslednjih celičnih klonov:

Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273

Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35

Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260

Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69

Vsi testni serumi vsebujejo < 0,1 % (mase/prostornino) natrijevega azida kot konzervansa. Poleg aktivne komponente protiteles testni serumi vsebujejo natrijev klorid, spojine z visoko molekularno maso in goveji albumin, ki so ga pregledali in certificirali inšpektorji ameriškega veterinarske urada.

**OPOMBA:** Ti testni serumi so narejeni iz supernatantov celične kulture. Ne glede na to je treba te biološke proizvode obravnavati kot potencialno nalezljive zaradi nevarnosti patogenov, ki jih nikoli ni mogoče popolnoma izključiti. Testni serumi vsebujejo natrijev azid, ki je strupen in lahko tvori eksplozivne soli s svincem ali bakrom. Pri odstranjevanju sperite z veliko vode. Iz zgoraj navedenih razlogov je treba s testnimi serumi ravnati previdno.

### HRAMBA

Shranjujte pri +2 do +8 °C (neodprto/odlomljeno), kratkotrajno za uporabo tudi pri sobni temperaturi. Če uporabljate naprave ORTHO VISION™ Analyzer ali ORTHO AutoVue2® Innova, lahko testni serumi ostanejo v napravi največ 5 dni (+15 do +30 °C). Shranjujte in uporabljajte samo do navedenega roka uporabnosti!

### OPOMBE

1. Pozitivne in negativne kontrole morajo biti vključene v vsak test.
2. Nepravilno shranjevanje bo vplivalo na učinkovitost izdelkov.
3. Rahla motnost ne vpliva na reaktivnost katerega koli od zgoraj navedenih testnih serumov. Preprečite bakterijsko in kemično kontaminacijo. Če se v testnem serumu odkrije vidna sprememba, se ga ne sme več uporabljati, saj lahko to kaže na kontaminacijo z mikrobi.
4. Moč pozitivne reakcije je odvisna od starosti uporabljene krvi.
5. Centrifugiranje zunaj določenega območja hitrosti lahko povzroči napačne rezultate. Pri kartični metodi lahko uporaba druge centrifuge, specifične za kartico (vsaka centrifuga s kartico ima svojo fiksno, nespremenljivo g-silo), vodi do napačnih rezultatov zaradi spremembe g-sile.
6. Opisani postopki uporabe veljajo samo za navedene ročne in avtomatizirane metode. Če se uporabljajo drugi avtomatski ali polavtomatski sistemi, morajo laboratoriji upoštevati navodila proizvajalcev naprav in izvajati validacije po priznanih metodah.
7. Pri uporabi testnih serumov je treba upoštevati vse veljavne nacionalne zakone, odloke in smernice; v Nemčiji zlasti »Smernice za odvzem krvi in krvnih komponent ter uporabo krvnih pripravkov (hemoterapija)« v trenutni različici.
8. Upoštevati je treba informacije o uporabi testnih kartic v pripadajočih navodilih za uporabo.

### PRIPRAVA VZORCA

1. Vzorce krvi je treba pridobiti s standardnimi tehnikami odvzema.
2. Kri za testiranje je treba testirati čim prej po odvzemu krvi, da zmanjšate tveganje lažno pozitivnih ali lažno negativnih reakcij zaradi nepravilnega shranjevanja ali kontaminacije vzorca. Kri, ki se ne testira takoj, je treba hraniti pri +2 do +8 °C.
3. Vzorce krvi, antikoagularne z EDTA, je treba testirati v 7 dneh, vzorce, obdelane z natrijevim citratom, pa v 14 dneh po odvzemu. Konzerve/krvni darovalcev je mogoče testirati do datuma izteka roka uporabnosti.

### PRIPRAVA TESTNIH SERUMOV

Priprava testnih serumov ni potrebna. Serumi se vzamejo neposredno iz steklenič in uporabijo.

### POSTOPEK

Materiali, ki niso vključeni v obseg dobave, vendar so potrebni za:

Metoda z objektnimi stekelcem

1. Objektno stekelce
2. Pasteurjeva pipeta
3. Mešalna paličica
4. Merilnik časa

Metoda z epruveto

1. Testne epruvete 10 x 75 mm ali 12 x 75 mm
2. Mikrolitrska pipeta za 50 µL/100 µL
3. Merilnik časa
4. Centrifuga
5. Izotonična fiziološka raztopina (0,85-0,9 % natrijevega klorida)
6. Pipetne konice za enkratno uporabo

Metoda z mikroploščo

1. Mikroploščice z dnom v obliki črke U, po potrebi predhodno obdelane
2. Merilnik časa
3. Laboratorijska centrifuga, ki lahko sprejme mikroploščice (nosilec)
4. Nosilec mikroplošč za centrifuge (opcjsko)
5. Stresalnik za mikroploščice
6. Steklo za branje testov z mikroploščami (opcjsko)
7. Mikrolitrske pipete za prenos 50 µL
8. Izotonična fiziološka raztopina (0,85-0,9 % natrijev klorid)
9. Pipetne konice za enkratno uporabo
10. Testne epruvete, 10 x 75 mm oder 12 x 75 mm

Uporaba kaset Ortho BioVue®

1. Sistem centrifuge Ortho BioVue®
2. Izotonična fiziološka raztopina (0,85-0,9 % natrijev klorid)
3. Mikrolitrska pipeta za prenos 10 µL, 40 µL in 50 µL
4. Pipetne konice za enkratno uporabo
5. Stojalo za sistem Ortho BioVue®
6. Kasete Ortho BioVue® Reverse
7. Testne epruvete, 10 x 75 mm ali 12 x 75 mm
8. Merilnik časa
9. Centrifuga

### Izvedba testa

#### Test z objektnimi stekelcem

1. Uporabljajte samo sediment eritrocitov.
2. Kapnite kapljico (približno 50 µL) ustreznega testnega seruma na označeno stekelce.
3. S pasteurjevo pipeto kapnite eno kapljico (približno 50 µL) sedimenta eritrocitov v testni serum na objektnem stekelcu.
4. Mešanico eritrocitov in testnega seruma dobro premešajte z mešalno paličico in razporedite v krog s premerom približno 2 cm.
5. V eni minuti preverite aglutinacijo z nežnim stresanjem objektnega stekelca (reakcija se začne v nekaj sekundah).
6. Zabeležite rezultate.

#### Test s centrifugiranjem epruvete

1. Pripravite 2-5-odstotno suspenzijo eritrocitov v izotonični fiziološki raztopini (rdeče krvne celice lahko predhodno sperete 1-3-krat z izotonično fiziološko raztopino).
2. V vsako epruveto dodajte 100 µL (ali po eno kapljico (približno 50 µL)) ustreznega testnega seruma.
3. V vsako epruveto dodajte 100 µL (ali po eno kapljico (približno 50 µL)) ustrezne suspenzije eritrocitov.
4. Zmešajte mešanico eritrocitov in testnega serume z nežnim stresanjem.
5. Inkubirajte epruveto pri sobni temperaturi 1-15 minut.
6. Epruveto centrifugirajte 1 minuto pri 2.000 vrt/min (približno 800-1.000 g).
7. V celoti odstranite celice z dna epruvete tako, da jih nežno stresete in v 3 minutah makroskopsko pregledate za aglutinacijo.
8. Zabeležite rezultate.

#### Test z mikroploščicami

1. Pripravite 2-5-odstotno suspenzijo eritrocitov v izotonični fiziološki raztopini. (Rdeče krvne celice lahko predhodno sperete 1-3-krat z izotonično fiziološko raztopino).
2. Eno kapljico (približno 50 µL) ustreznega testnega seruma dajte v označeno vdolbino.
3. V testno vdolbino dodajte eno kapljico (približno 50 µL) ustrezne suspenzije rdečih krvnih celic.
4. Mikroploščico zmešajte na stresalniku za mikroploščice.

**OPOMBA:** Priporočeno trajanje mehanskega stresanja:

- (1) Mešanje: 10 do 30 sekund pri srednji jakosti stresanja;
- (2) Resuspendiranje: 10 do 30 sekund pri zmerni moči tresenja ali za čas in hitrost, ki sta dovoljena za popolno resuspendiranje celotnega celičnega gumba, ne da bi se uničile pozitivne reakcije.

5. Ploščico centrifugirajte.

Predlagano trajanje centrifugiranja: 30 sekund pri približno 400 x g ali toliko časa, kolikor je potrebno, da se omogoči najmočnejša reakcija protiteles z eritrociti, ki nosijo antigen, z uporabljenimi centrifugo in mikroploščico, pri čemer je resuspenzija antigen-negativnih eritrocitov še vedno zlahka možna.

**OPOMBA:** Centrifugalna sila, uporabljena na mešanico celic in testnih serumov, mora biti minimalna sila, s katero je mogoče ustvariti gumb eritrocitov in jase supernatant. Zaradi velikega števila komercialno dostopnih centrifug ni mogoče priporočiti nobene posamezne hitrosti ali časa centrifugiranja, ki bi bila idealna za vse konfiguracije. Vsak laboratorij mora umeriti in testirati obstoječi instrument, da se zagotovijo želeni rezultat pri navedeni hitrosti.

6. Sprostite gumbe eritrocitov na stresalniku in namestite ploščico za odčitavanje.

7. Odčitajte rezultat in ga zabeležite.

8. Negativne ali vprašljive teste inkubirajte pri sobni temperaturi 5 do 10 minut.

9. Po inkubaciji pri sobni temperaturi ponovite korake od 5 do 7.

**OPOMBA:** Vse izhodiščne mešanice je treba oceniti takoj po centrifugiranju in resuspendiranju.

## Ročna metoda testiranja v kasetah Ortho BioVue® Reverse Diluent

Spodaj opisani postopek velja samo za ročno testiranje s kasetami Ortho BioVue®. V navodilih za uporabo kaset Ortho BioVue® Reverse Diluent upoštevajte razdelke HRAMBA, PREVIDNOSTNI UKREPI, JEMANJE in PRIPRAVA VZORCEV, PRIPRAVA TESTNIH SERUMOV ter INTERPRETACIJA REZULTATOV in, če je primerno, OMEJITEV POSTOPKA.

1. Za pripravo kaset upoštevajte v navodilih za uporabo kaset Ortho BioVue® Reverse Diluent, točki 1 in 2 v razdelku »Izvedba testa«.
2. Pripravite 3-5-odstotno eritrocitno suspenzijo v izotonični fiziološki raztopini. (Rdeče krvne celice lahko predhodno sperete 1-3-krat z izotonično fiziološko raztopino).
3. 10 µL ustrezne 3 do 5-odstotne eritrocitne suspenzije dajte v označeno reakcijsko komoro kasete.
4. V reakcijsko komoro dodajte 40 µL ustreznega testnega seruma.  
(Ne dotikajte se roba reakcijske komore s konico pipete. Če se to vseeno zgodi, zamenjajte konico pipete, preden napolnite naslednjo reakcijsko komoro.)
5. Centrifugirajte kaseto s centrifugo Ortho BioVue® System, z g-silo, nespremenljivo za centrifugo.

**OPOMBA:** Centrifugiranje je treba izvesti v 30 minutah po dodajanju vzorca v reakcijsko komoro.

6. Po zaključku testa pregledajte sprednji in zadnji del vsakega stolpca glede aglutinacije in/ali hemolize.

7. Zabeležite stopnjo reakcije s strani z bolj izrazitim pozitivnim rezultatom.

## Testiranje s kasetami Ortho BioVue® Reverse Diluent z avtomatoma ORTHO VISION™ Analyzer ali ORTHO AutoVue® Innova

Upoštevajte navodila v uporabniškem priročniku zadevne naprave.

### INTERPRETACIJA REZULTATOV TESTOV

»Previdno mešanje/tresenje« pri metodi z objektnimi stekelcem, epruveto in mikroploščicami:

Pozitivni rezultat (+): Aglutinacijo eritrocitov je treba oceniti kot pozitiven rezultat testa in prikazati prisotnost ustreznega antigena.

Negativni rezultat (-): Odsotnost aglutinacije eritrocitov je treba oceniti kot negativen rezultat testa, ustrezni antigeni dokazljivi.

Kasete: Za oceno rezultatov v kasetah Ortho BioVue® Reverse Diluent pri ročni metodi upoštevajte razdelek

»INTERPRETACIJA REZULTATOV« v pripadajočih navodilih za uporabo. V primeru strojev odčitavanje in vrednotenje izvaja naprava.

### OMEJITVE METODE

1. Netočnosti pri upoštevanju navodil v razdelkih »Izvedba testa« in »Razlaga rezultatov testov« lahko vodijo do napačnih rezultatov.
2. Kontrole z dvomimni ali napačnimi rezultati, samejno vodijo do tega, da so vsi rezultati neuporabni.
3. Eritrociti, obdelani z encimi, ali dodajanje govejega albumina in/ali drugih raztopin, ki vsebujejo beljakovine, lahko povzročijo nespecifične reakcije s temi testnimi serumi.
4. Hemoliziranih, motnih, kontaminiranih ali koaguliranih vzorcev krvi se ne sme uporabljati.
5. Pri metodi objektnega stekelca se lahko pojavijo nespecifične reakcije, ko se reakcijska zmes posuši ali se stekelce segreje.
6. Zaradi različnih lastnosti antigenov lahko nekateri fenotipi s temi reagenti povzročijo šibkejšo reakcijo kot s kontrolnimi eritrociti.
7. Nekateri eritrociti so morda razvili različice Rh, ki jih monoklonska protitelesa klona morda ne prepoznajo. Teste je treba izvesti z vsaj dvema različnima klonskima mešanica, kot je predpisano v nekaterih državah. V primeru odstopajočih rezultatov testov je treba opraviti dodatne teste.
8. Noben testni serum ali ena sama metoda ne zagotavlja, da bodo odkriti vsi redki ali šibki antigeni in vse različice antigenov<sup>2</sup>.
9. Eritrociti, občutljivi na aloprotitelesa ali avtoprotitelesa enake ali podobne specifičnosti kot testni serum (npr. eritrociti, pozitivni v neposrednem antiglobulinskem testu), niso primerni za te teste.
10. Pri eritrocitih s pozitivnim neposrednim testom Coombs lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov s kaseto. Te celice pozitivno reagirajo tudi brez testnega seruma.
11. Upoštevajte omejitve v navodilih za uporabo, ki so priložena kasetam Ortho BioVue® Reverse Diluent in v uporabniškemu priročniku uporabljenega avtomata.
12. Za test z mikroploščicami je treba vse negativne rezultate z anti-e (kloni: MS-62, MS-69) ponoviti z drugo tehniko, saj se lahko pojavijo lažno negativni rezultati.
13. Anti-c (klon: MS-33) anti-I/i protitelesa hladnega okolja lahko kažejo aktivnosti v popkovnični krvi in tako vodijo do lažno pozitivnih rezultatov.
14. Krvni novorojenčkah so izključene iz testne metode z mikroploščico.

### ZMOGLJIVOST

Ocenjevanje zmogljivosti izdelkov je bilo izvedeno v skladu s skupnimi tehničnimi specifikacijami (odločba CTS Komisije z dne 3. februarja 2009). Uporabljenih je bilo več vzorcev (na primer kri darovalca, bolnika, panelna kri) in primerjanih z drugimi produkti.











Produkt	Pozitivno	Lažno negativno	Občutljivost	Negativno	Lažno pozitivno	Specifičnost
Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273	844	0	100 %	391	0	100 %
Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35	1005	0	100 %	230	0	100 %
Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260	327	0	100 %	908	0	100 %
Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69	1417	0*	100 %*	65	0	100 %

\* za anti-e (kloni: MS-62, MS-69) je bilo 42 vzorcev lažno negativnih v testu z mikroploščico, tako da je bila občutljivost pri tej tehniki le 97,12 % (glej točko 8 »Meje metode«).

### LITERATURA




1. Navodila za odvzem krvi in krvnih komponent ter uporabo krvnih pripravkov (hemoterapija)
2. CLSI, I/LA33-A Validatin of Automated System for Immunhematological Testing Before Implementation; Approved Guideline CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE Deceber 2009
3. Peter D. Issit, David J. Anstee Applied Blood Group Serology, fourth edition, Montgomery Scientific Publications 1998
4. Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel Transfusionsmedizin, 3. Auflage, Springer-Verlag 2004.

### SIMBOL - LEGENDA

 Skladiščenje od-do	 Številka artikla	 Rok uporabe	 Proizvajalec po 98/79/ES
 Šarža	 Klon(i)	 In vitro diagnostični medicinski pripomoček	 Simbol CE
 Unique Device Identification	 Upoštevajte navodila za uporabo		

730-22-0518 Različica 018 / 01.07.2021

 Antitoxin GmbH, Industriestraße 88, 69245 Bammental, Nemčija

 +49 (0) 6223/ 8661-0  +49 (0) 6223/ 8661-13  [gara@antitoxin-gmbh.de](mailto:gara@antitoxin-gmbh.de)

## INSTRUKCJA UŻYCIA

**Anti-C (RH2), monoklonalny IgM (ludzki) OrthoClone**  
**Anti-E (RH3), monoklonalny IgM (ludzki) OrthoClone**  
**Anti-c (RH4), monoklonalny IgM (ludzki) OrthoClone**  
**Anti-e (RH5), monoklonalny IgM (ludzki) OrthoClone**

REF	690211A
REF	690321A
REF	690281A
REF	690361A

### PRZEZNACZENIE

Surowice monoklonalne anti-C, -E, -c, -e - testowe uzyskiwane są z supernatantów hodowli komórkowych linii komórkowych heterohybridoma wydzielających przeciwciała typu IgM skierowane swoiście przeciwko odpowiednim antygenom grup krwi. Przeciwciała w każdym przypadku jest ludzkim białkiem. Surowice testowe są stosowane do jakościowego wykrywania in vitro obecności lub braku antygenów grupy krwi C, c, E lub e na ludzkich erytrocytach. Opisane procedury odnoszą się do wymienionych metod manualnych oraz do stosowania kaset Ortho BioVue® Reverse Diluent w analizatorach ORTHO VISION™ i ORTHO AutoVue® Innova. Użycie tych surowic testowych jest przeznaczone wyłącznie dla wykwalifikowanych i przeszkolonych specjalistów.

### ZASADA POSTĘPOWANIA

Metody testowe stosowane w przypadku tych produktów oparte są na zasadzie aglutynacji. Normalne ludzkie erytrocyty noszące odpowiedni antygen są aglutynowane przez odpowiednie przeciwciała.

### SUROWICE TESTOWE

Wymienione surowice do badania grup krwi są produkowane z następujących klonów komórkowych:

Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273  
 Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260

Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35  
 Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69

Wszystkie surowice testowe zawierają <0,1% (w/v) azydku sodu jako środka konserwującego. Oprócz aktywnego składnika przeciwciała, surowice testowe zawierają chlorek sodu, dużą masę cząsteczkową Związki i albumina wołowa, która została skontrolowana i certyfikowana przez inspektorów amerykańskich służb weterynaryjnych.

**OSTRZEŻENIE:** Te surowice testowe są produkowane z supernatantów hodowli komórkowych. Niezależnie od tego te produkty biologiczne należy traktować jako potencjalnie zakaźne ze względu na ryzyko wystąpienia patogenów, którego nigdy nie można całkowicie wykluczyć. Surowice testowe zawierają azyd sodu, który może być toksyczny i tworzyć wybuchowe sole z ołowiem lub miedzią. Przy usuwaniu służyć dużą ilością wody. Z powyższych powodów, surowice testowe powinny być traktowane z odpowiednią ostrożnością.

### PRZECHOWYWANIE

Przechowywać w temperaturze +2 do +8 °C (nieotwarte / otwarte), przez krótki czas do użycia również w temperaturze pokojowej. Jeżeli używane są urządzenia ORTHO VISION™ Analizer lub ORTHO AutoVue® Innova, surowice testowe mogą pozostać na urządzeniu przez maksymalnie 5 dni (+15 do +30 °C). Przechowywać i używać tylko do podanej daty ważności!

### NOTATKI

1. Pozytywne i negatywne kontrole powinny być przeprowadzone z każdym testem.
2. Niewłaściwe przechowywanie obniża skuteczność działania produktów.
3. Lekkie zmętnienie nie ma wpływu na reaktywność jednej z wyżej wymienionych surowic testowych. Należy unikać skażenia bakteryjnego i chemicznego. W przypadku wykrycia widocznych zmian w surowicy testowej nie należy jej używać, ponieważ może to wskazywać na zanieczyszczenie mikrobiologiczne.
4. Siła reakcji dodatniej zależy od wieku użytej krwi.
5. Wirowanie poza podanym zakresem prędkości może prowadzić do błędnych wyników. W metodzie kartkowej użycie innej wirówki specyficznej dla danej karty (każda wirówka kartkowa ma swoją stałą, niezmienną liczbę g) może prowadzić do nieprawidłowych wyników z powodu wynikającej z tego zmiany liczby g.
6. Opisane sposoby postępowania obowiązują tylko dla wymienionych metod ręcznych i maszyn automatycznych. Jeżeli stosowane są inne zautomatyzowane lub półautomatyczne systemy, laboratoria muszą postępować zgodnie z instrukcjami producentów sprzętu i przeprowadzać walidacje zgodnie z uznanymi procedurami.
7. Podczas stosowania surowic testowych należy przestrzegać wszystkich obowiązujących krajowych ustaw, rozporządzeń i wytycznych, w Niemczech w szczególności „Wytycznych dotyczących pobierania krwi i składników krwi oraz stosowania produktów krwiopochodnych (hemoterapia) 1 z późniejszymi zmianami.
8. Należy przestrzegać informacji dotyczących stosowania kart kontrolnych zawartych w odpowiednich instrukcjach użytkownika.

### PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

1. Próbkę krwi powinny być pobierane przy użyciu jednej z powszechnie stosowanych technik pobierania.
2. Krew do badania powinna być badana możliwie jak najszybciej po jej pobraniu, aby zminimalizować ryzyko fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych reakcji z powodu niewłaściwego przechowywania lub zanieczyszczenia próbki.  
 Krew, która nie jest natychmiast badana, powinna być przechowywana w temperaturze od +2 do +8 °C.  
 Próbkę krwi poddane antykoagulacji z użyciem EDTA muszą być zbadane w ciągu 7 dni, a próbki poddane działaniu cytrynianu sodu w ciągu 14 dni od pobrania.  
 Krew w puszkach/darowiznach może być badana do upływu terminu ważności.

### PRZYGOTOWANIE SUROWIC TESTOWYCH

Przygotowanie surowic testowych nie jest konieczne. Surowice są pobierane bezpośrednio z fiolet i wprowadzane.

### PROCEDURA

Materiały nie wchodzące w zakres dostawy, ale niezbędne do wykonania:

#### Metoda szkiełka mikroskopowego

1. Szkiełko mikroskopowe
2. Pipeta Pasteura
3. Pręt do mieszania
4. Budzik krótkoterminowy

#### Metoda próbówkowa

1. Probówka, 10 x 75 mm lub 12 x 75 mm
2. Pipeta mikrolitrowa do 50 µL/100 µL
3. Budzik krótkoterminowy
4. Wirówka
5. Izotoniczny roztwór soli (0,85-0,9% chlorku sodu)
6. Jednorazowe końcówki

#### Metoda płytek mikrotitracyjnych

1. Płytki mikrotitracyjne z dnem w kształcie litery U, w razie potrzeby poddane obróbce wstępnej
2. Budzik krótkoterminowy
3. Wirówka laboratoryjna, płytki mikrotitracyjne (nośniki) może pobierać
4. Nośnik płytek mikrotitracyjnych do wirówek (opcjonalnie)
5. Wytrząsarka do płytek mikrotitracyjnych
6. Lusterko do odczytu dla testów mikropłytkowych (opcjonalnie)
7. Pipety mikrolitrowe do odmierzenia 50 µL
8. Izotoniczny roztwór soli (0,85 - 0,9 % chlorku sodu)
9. Jednorazowe końcówki do pipet
10. Probówki, 10 x 75 mm lub 12 x 175 mm

#### Ortho BioVue®kasety

1. Wirówka systemu Ortho BioVue®
2. Izotoniczny roztwór soli (0,85-0,9% chlorku sodu)
3. Pipeta mikrolitrowa do dozowania 10 µL, 40µL i 50µL
4. Jednorazowe końcówki do pipet
5. Stawisko robocze systemu Ortho BioVue®
6. kasetki do Reverse Diluent (Rozcieńczalnik odwrotny) Ortho BioVue®
7. Probówki 10x75 mm lub 12x75 mm
8. Budzik krótkoterminowy
9. Wirówka

### Procedura testowa

#### Test preparatów

1. Stosować wyłącznie osad erytrocytów.
2. Upuścić kroplę (około 50 µL) odpowiedniej surowicy testowej na oznaczone szkiełko mikroskopowe.
3. Dodać jedną kroplę (ok. 50 µL) osadu erytrocytów do kropli surowicy testowej na szkiełko podstawowym, używając pipety Pasteura.
4. Dobrze wymieszać mieszaninę czerwonych i surowicy testowej za pomocą mieszadła i rozprowadzić ją tak, aby utworzyła okrąg o średnicy około 2 cm.
5. Sprawdzić aglutynację w ciągu jednej minuty, delikatnie wirując szkiełkiem (reakcja rozpoczyna się po kilku sekundach).
6. Zaprojektować wyniki.

#### Test odwirowania próbówki

1. Przygotować 2-5% zawiesinę krwinek czerwonych w izotonicznym roztworze soli fizjologicznej (krwinki czerwone można uprzednio przepłukać 1-3 razy izotonicznym roztworem solifizjologicznej).
2. Do każdej próbówki dodać 100 µL (alternatywnie po jednej kropli (ok. 50 µL)) odpowiedniej surowicy testowej.
3. Do każdej próbówki dodać 100 µL (ewentualnie po jednej kropli (ok. 50 µL)) odpowiedniej zawiesiny krwinek czerwonych.
4. Wymieszać mieszaninę czerwonych krwinek i surowic testowych, delikatnie wstrząsając.
5. Inkubować próbówki przez 1-15 minut w temperaturze pokojowej.
6. Odwirowywać próbówki przez 1 minutę przy 2,000 rpm (ok. 800 - 1,000 g).
7. Całkowicie oddzielić komórki od dna próbówki przez ostrożne wstrząsanie i zbadać makroskopowo pod kątem aglutynacji w ciągu 3 minut.
8. Zaprojektować wyniki.

#### Test mikropłytek

1. Przygotować 2-5% zawiesinę erytrocytów w izotonicznym roztworze soli fizjologicznej. (Krwinki czerwone można wcześniej przepłukać 1-3 razy izotonicznym roztworem soli fizjologicznej).
2. Umieścić jedną kroplę (około 50 µL) odpowiedniej surowicy testowej w oznaczonym baseniku.
3. Dodać jedną kroplę (około 50 µL) odpowiedniej zawiesiny krwinek czerwonych do studzienki testowej.
4. Wymieszać płytkę mikrotitracyjną na wytrząsarce do płytek mikrotitracyjnych.

#### UWAGA:

1. Zalecany czas trwania dla wytrząsarek mechanicznych:
  - (1) Mieszanie: 10 do 30 sekund przy średniej sile wstrząsania;
  - (2) Ponownie zawiesić: 10-30 sekund przy średniej sile wstrząsania lub przy czasie trwania i prędkości, które pozwalają na całkowite ponowne zawieszenie całego gałki komórkowej bez niszczenia reakcji pozytywnych.

#### 5. Odwirować płytkę.

Zalecany czas wirowania: 30 sekund przy około 400 x g lub tak długo, jak jest to konieczne, aby umożliwić najsilniejszą reakcję przeciwciał z czerwonymi krwinkami zawierającymi antygen przy użyciu wirówki i płytki mikromiarczkowej, gdzie ponowne zawieszenie czerwonych krwinek ujemnych pod względem antygenowym jest nadal łatwo możliwe.

#### UWAGA:

Siła odśrodkowa przyłożona do mieszanki komórek i surowicy testowej powinna być minimalną siłą, która spowoduje powstanie guzka czerwonych krwinek i klarownego supernatantu. Ze względu na dużą liczbę komórek dostępnych w handlu, nie można zalecić jednoznacznej prędkości lub czasu trwania wirowania, które byłoby idealne dla wszystkich konfiguracji. Każde laboratorium musi skalić błąd istniejące urządzenie i sprawdzić, jak długo należy wirować z daną prędkością, aby uzyskać pożądany wynik.

- Poluzować pokrętkę czerwonych krwinek na wytrząsarce i ustawić płytkę do odczytu.
- Odczytać wynik i zapisać go.
- Testy negatywne lub wątpliwe inkubować przez 5 do 10 minut w temperaturze pokojowej.
- Powtórzyć kroki 5-7 po inkubacji w temperaturze pokojowej.

**UWAGA:** Wszystkie preparaty powinny być oceniane natychmiast po odwirowaniu i ponownym zawieszeniu.

### Metoda testu ręcznego w kasetach z rozcieńczalnikiem odwrotnym Ortho BioVue® Reverse Diluent

procedura opisana poniżej odnosi się wyłącznie do ręcznego testowania kaset Ortho BioVue®. Informacje na temat Przechowywania, ŚRODKÓW OSTROŻNOŚCI, POBIERANIA I PRZYGOTOWYWANIA PRÓBEK, I PRZYGOTOWYWANIA, SUROWICY TESTOWEJ I INTERPRETACJI WYNIKÓW oraz OGRANICZEŃ PROCEDURY, jeśli dotyczy, znajdują się w instrukcji użytkownika kaset z odwrotnym rozcieńczalnikiem Ortho BioVue® Reverse Diluent.

- W celu przygotowania kaset należy postępować zgodnie z instrukcją użycia kaset Ortho BioVue® Reverse Diluent, rozdział "Procedura testowa" punkt 1 i 2.
- Eine Przygotować 3-5% zawiesinę erytrocytów w izotonicznym roztworze soli fizjologicznej. (Erytrocyty można uprzednio przepłukać 1-3 razy izotonicznym roztworem soli fizjologicznej).
- Dodać 10 µl odpowiedniej zawiesiny krwinek czerwonych o stężeniu od 3 do 5 % do oznaczonej komory reakcyjnej kasety.
- Dodać 40 µl odpowiedniej surowicy testowej do komory reakcyjnej.  
(Nie dotykać końcówką pipety krawędzi komory reakcyjnej. Jeśli nadal tak się dzieje, należy zmienić końcówkę pipety przed napełnieniem następnej komory reakcyjnej).
- Odwirować kasetę w wirówce systemu Ortho BioVue®, stosując siłę g niezmienną dla wirówki.

**UWAGA:** Wirowanie musi być przeprowadzone w ciągu 30 minut od dodania próbek do komór reakcyjnych.

6. Po zakończeniu testu sprawdzić przód i tył każdej kolumny pod kątem aglutynacji i/lub hemolizy.

7. Zapisać siłę reakcji od strony z bardziej wyraźnym wynikiem pozytywnym.

### Test w kasetkach ORTHO BioVue® Reverse Diluent za pomocą automatu ORTHO VISION™ Analzyer lub ORTHO AutoVue® Innova

Należy postępować zgodnie z instrukcjami zawartymi w podręczniku użytkownika danego urządzenia.

### INTERPRETACJA WYNIKÓW TESTU

„Ostrożne wirowanie/wstrząsanie” metodą szkiełka, próbówki, jak również płytki mikrotitracyjnej:

Wynik pozytywny (+):

Wynik ujemny (-):

Kasety:

Aglutynacja erytrocytów jest uważana za pozytywny wynik testu i wskazuje na obecność odpowiedniego antygeny.

Brak aglutynacji erytrocytów należy uznać za negatywny wynik testu, odpowiadający im antygen nie jest wykrywalny.

Aby ocenić wyniki w kasetkach Ortho BioVue® Reverse Diluent podczas stosowania metody manualnej, należy postępować zgodnie z rozdziałem "INTERPRETACJA WYNIKÓW" w dołączonej instrukcji użytkownika. W przypadku automatów odczyt i analiza odbywa się za pomocą urządzenia.

### OGRANICZENIA METODY

- Nieścisłości w stosowaniu się do instrukcji zawartych w rozdziałach "Wykonanie testu" i "Interpretacja wyników testu" mogą prowadzić do błędnych wyników.
- Kontrolne przeprowadzone z niejednoznaczными lub fałszywymi wynikami automatycznie prowadzą do braku możliwości wykorzystania wszystkich wyników.
- Krwinki czerwone poddane działaniu enzymów lub dodanie albuminy wołowej i/lub innych roztworów zawierających białko mogą powodować niespecyficzne reakcje z tymi surowicami testowymi.
- Nie wolno używać próbek krwi hemolizowanej, mętnej, skażonej lub zakrzepłej.
- W przypadku metody szkiełek mikroskopowych reakcje niespecyficzne mogą wystąpić, gdy mieszanina reakcyjna wyschnie lub gdy szkiełko zostanie podgrzane.
- Ze względu na różną ekspresję antygenów, niektóre fenotypy mogą wykazywać słabszą reakcję z tymi odczynnikami niż erytrocyty kontrolne.
- Niektóre erytrocyty mogą mieć rozwinięte warianty Rh, które mogą nie być rozpoznawane przez przeciwciała monoklonalne z jednego klonu. Test powinien / musi być przeprowadzony na co najmniej dwóch różnych klonach / mieszkach klonów, co jest wymagane w niektórych krajach. Jeśli wyniki testów różnią się, należy przeprowadzić dalsze testy.
- Zadna pojedyncza surowica testowa ani metoda nie może zagwarantować wykrycia wszystkich rzadkich lub słabych antygenów oraz wszystkich wariantów antygenów <sup>2</sup>.
- Krwinki czerwone uczulone alloprzeciwciałami lub autoprzeciwciałami o takiej samej lub podobnej swoistości jak surowica badana (np. krwinki czerwone dodatnie w bezpośrednim teście antyglobulinowym) nie nadają się do tych testów.
- Krwinki czerwone z pozytywnym bezpośrednim testem Coombsa mogą dawać fałszywie pozytywne wyniki w technice kasetowej. Komórki te reagują dodatkowo nawet bez surowicy testowej.
- Należy przestrzegać informacji o wartościach granicznych zawartych w instrukcji użytkownika kaset z rozcieńczalnikiem odwrotnym Ortho BioVue® Reverse Diluent oraz w instrukcji obsługi używanego urządzenia.
- W teście na płytkach mikrotitracyjnych wszystkie wyniki negatywne muszą być powtórzone z Anti-e (klony: MS-62, MS-69) przy użyciu innej techniki, ponieważ mogą wystąpić wyniki fałszywie negatywne.
- W krwi pepowinowej anti-c (klon: MS-33) może wykazywać aktywność zimnych przeciwciał anti-I/i, co prowadzi do wyników fałszywie dodatnich.
- Krew noworodków jest wykluczona z badania metodą mikroplitek.

### WYDAJNOŚĆ

Ocena właściwości użytkowych produktów została przeprowadzona zgodnie ze Wspólnymi Specyfikacjami Technicznymi (Decyzja Komisji CTS z dnia 03 lutego 2009 r.).

Użyto różnych próbek (dawca, pacjent, krew panelowa) i porównano je z innymi produktami.











Kod produktu	Pozytywny	Fałszywy negatywny	Czułość	negatywny	Fałszywy pozytywny	Swoistość
Anti-C monoclonal, human IgM Clone: MS-273	844	0	100%	391	0	100%
Anti-c monoclonal, human IgM Clone: MS-35	1005	0	100%	230	0	100%
Anti-E monoclonal, human IgM Clones: MS-12, MS-260	327	0	100%	908	0	100%
Anti-e monoclonal, human IgM Clones: MS-62, MS-69	1417	0*	100%*	65	0	100%

\* dla Anti-e (klony: MS-62, MS-69), 42 próbki były fałszywie ujemne w teście na płytkach mikrotitracyjnych, tak więc czułość w tej technice wynosiła tylko 97,12%.  
(patrz „Granice metody” punkt 8).

### LITERATURA

- Wytyczne dotyczące pobierania krwi i składników krwi oraz stosowania produktów krwiopochodnych (hemoterapia)
- CLSI, I/LA33-A Validatin of Automated System for Immunhematological Testing Before Implementation; Approved Guideline CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE grudzień 2009
- Peter D. Issit, David J. Anstee Applied Blood Group Serology, fourth edition, Montgomery Scientific Publications 1998
- Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel Medycyna transfuzyjna, 3. Wydanie, Springer-Verlag 2004.




### SYMBOL - LEGENDA

 Przechowywa nie od - do	 Numer katalogowy	 Data ważności	 Producent zgodnie z 98/79/WE
 Partia	 Klon(y)	 Diagnostyka in vitro	 Symbol WE CE
 Niepowtarzalny identyfikator wyrobu	 Należy przestrzegać zaleceń zawartych w ulotce dołączonej do opakowania.		

7

30-22-0518 wersja 018 / 01.07.2021

 Antitoxin GmbH, Industriestraße 88, 69245 Bammental, Niemcy

 +49 (0) 6223/ 8661-0  +49 (0) 6223/ 8661-13  [gara@antitoxin-gmbh.de](mailto:gara@antitoxin-gmbh.de)