LISS solution

Deutsch

für die Röhrchenmethode

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

ZWECKBESTIMMUNG

Mollison und Polley entdeckten 1964, dass die Reduzierung der Ionenstärke durch eine entsprechende Lösung (low ionic strength solution = Liss) die Antigen-Antikörper-Reaktion verstärkt.
Die vorliegende Liss-Lösung ist eine Modifizierung des von Löw, B. und Messeter, L. 1974 beschriebenen salzarmen Mediums zur Antikörper-Diagnostik.
LISS - Lösung modifiziert wird in der Blutgruppen - Serologie zur Erhöhung der Empfindlichkeit / Verstärkung von Agglutinationen sowie zur Verkürzung der Reaktionszeit zwischen Antikörpern und Erythrozyten eingesetzt.

Ausgenommen ist die Anwendung bei serologischen Blutgruppenbestimmung für:

— ABNull-System [A (ABO1), B (ABO2), AB (ABO3)];
— Rhesus-System [RH1 (D), RHW1, RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e)];
— Kell-System [Kel1 (K)];
— Kidd-System [JK1 (Jka), JK2 (Jkb)];
— Duffy-System [FY1 (Fya), FY2 (Fyb)].

Die Anwendung dieses Reagenzes ist nur für qualifiziertes und geschultes Fachpersonal vorgesehen.

PRINZIP DES VERFAHRENS

Die bei Verwendung dieses Produktes angewendete Methodik beruht auf dem Prinzip der Agglutinationstechnik. Die geringe Ionenstärke der Lösung in Verbindung mit einem geringen Anteil an Rinderalbuminlösung und der geringeren Ionenkonzentration als in einer physiologischen NaCl-Lösung bewirkt, dass es zum Flüssigkeitseinstrom in die Erythrozyten kommt, sich dadurch eine größere Oberfläche ausbildet, verschiedene Antigene für die entsprechenden Antikörper besser zugänglich werden (Erhöhung der Empfindlichkeit), die AK-Menge außerhalb der Zelle erhöht wird, die Spezifität aber aufrechterhalten bleibt. Normale menschliche Erythozyten, die das entsprechende Antigen tragen werden durch einen korrespondierenden Antikörper erkannt und agglutiniert.

TESTSEREN

Das aufgeführte Reagenz wird in der folgenden Form angeboten:

LISS solution *modified*

Das Reagenz enthält als Konservierungsmittel Thimerosal. Die Lösung enthält zusätzlich Natriumchlorid, hochmolekulare Verbindungen und Rinderalbumin, das durch die US Veterinary Service Inspectoren überprüft und zertifiziert wurde.

WARNUNG

LISS solution modified wird aus biologischem Material hergestellt und sollte wegen nie völlig auszuschließender Gefährdung durch Krankheitserreger als potentiell infektiös angesehen werden. Diese Lösung enthält Thimerosal, das toxisch wirken kann.
Bei der Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen.
Aus den oben genannten Gründen sollte das Reagenz mit angemessener Sorgfalt gehandhabt werden.

LAGERUNG

Ungeöffnet und nach dem erstmaligen Öffnen gut verschlossen bei +2 bis +8 °C lagern, kurzzeitig zur Anwendung auch bei Raumtemperatur.
Grundsätzlich nur bis zum angegebenen Verfallsdatum lagern und anwenden.

HINWEISE

1. Es sollten bei jeder Austestung positive und negative Kontrollen mitgeführt werden.
2. Unsachgemäße Lagerung beeinträchtigt die Wirksamkeit des Reagenzes.
3. Die Reaktionsfähigkeit des Reagenzes wird durch eine leichte Trübung nicht beeinträchtigt. Bakterielle und chemische Kontamination des Reagenzes ist zu vermeiden. Wenn eine sichtbare Veränderung des Reagenzes festgestellt wird sollte es nicht mehr eingesetzt werden, die Veränderung kann auf eine mikrobielle Kontamination hinweisen.
4. Ein leichter schwärzlicher Bodensatz durch Ausflockung des Konservierungsmittels (Thimerosal) ist möglich. Dies hat keine negativen Auswirkungen auf das Testergebnis.
5. Die Stärke der positiven Reaktion ist vom Alter des verwendeten Blutes abhängig.
6. Zentrifugieren außerhalb des angegebenen Drehzahl-Bereiches kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
7. Die beschriebene Testmethode zur Anwendung gilt ausschließlich für manuelle Methoden. Werden Automaten oder halbautomatische Systeme verwendet, müssen die Laboratorien die Angaben der Gerätehersteller befolgen und Validierungen nach anerkannten Verfahren durchführen.
8. Bei der Anwendung dieses Reagenzes sind alle gültigen nationalen Gesetze, Verordnungen und Richtlinien in ihrer gültigen Fassung zu beachten, in Deutschland insbesondere die „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“[1].

PROBENVORBEREITUNG

1. Blutproben sollten mit einer der üblichen Entnahmetechnik gewonnen werden.
2. 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 Lösung ist nicht erforderlich.
Sie wird direkt aus dem Fläschchen entnommen und eingesetzt.

VERFAHRENSWEISE

Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber benötigte Materialien:

Röhrchenmethode:
1. Teströhrchen (10 x 75 mm oder 12 x 75 mm)
2. Mikroliterpipette
3. Zentrifuge
4. Kurzzeitwecker
5. isotonische Kochsalzlösung (0,85 - 0,9% Natriumchlorid)
6. Brutschrank
7. Anti-Human-Globulin-Serum (Coobs-Serum/AHG Serum)

Testdurchführung

Röhrchen-Zentrifugationsmethode

1. 2-5%ige Erythrozytensuspensionen in isotonischer Kochsalzlösung vorbereiten (Erythrozyten können vorab 1-3 Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden).
2. In ein beschriftete Teströhrchen 50µl (alternativ 1 Tropfen = ca. 50µL) der entsprechenden Erythrozytensuspension geben.
3. 100 µl (alternativ je 2 Tropfen = ca. 100µl) eines zu testenden Patienten/Probanden Serums/Plasmas bzw. Testserums zugeben.
4. anschließend 100µl (alternativ 2 Tropfen = ca. 100µl) LISS solution in das Teströhrchen zugeben.
5. Die Erythrozyten-/Reagenzmischung durch leichtes Schütteln mischen.
6. Teströhrchen 10 Minuten bei 37°C inkubieren.
7. Teströhrchen 1 Minute bei 1.000 U/min (ca. 180-270 x g) zentrifugieren.
8. Zellen durch vorsichtiges Schütteln vollständig vom Röhrchenboden lösen und innerhalb 3 Minuten makroskopisch auf Agglutination untersuchen.
9. Ergebnis protokollieren.
10. Die Erythrozyten dreimal mit (kalter) isotonischer Kochsalzlösung waschen.
11. Anschließend in das Teströhrchen 100 µL Anti-Human-Globulin-Serum (Coombs-Serum / AHG-Serum) geben, durch leichtes schütteln den Zellknopf vom Röhrchenboden lösen und mit dem Coombs-Serum / AHG-Serum mischen.
12. Teströhrchen 1 Minute bei 1.000 U/min (ca. 180-270 x g) zentrifugieren.
13. Zellen durch vorsichtiges Schütteln vollständig resuspendieren und innerhalb von 3 Minuten makroskopisch auf Agglutination untersuchen.
14. Ergebnis protokollieren.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

"Vorsichtiges Schütteln" bei der Röhrchen-Zentrifugationsmethode:

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.

GRENZEN DER TESTMETHODEN

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. Hämolysierte, trübe, kontaminierte oder geronnene Blutproben dürfen nicht im Test eingesetzt werden.
4. Kein einzelnes Testserum oder eine einzelne Methode können garantieren alle seltenen oder schwachen Antigene und alle Varianten der Antigene zu detektieren.[2]
5. Aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung der Antigene kann es bei bestimmten Phänotypen mit diesem Testserum zu einer schwächeren Reaktion kommen als mit Kontrollerythrozyten.
6. Erythrozyten, die mit Alloantikörpern oder Autoantikörpern sensibilisiert sind (z.B. Erythrozyten positiv im direkten Antiglobulintest), sind für die Austestung ungeeignet.
7. Es ist in der Literatur beschrieben, dass es mit Proben von Patienten, die mit anti-CD38 monoklonalen Antikörpern behandelt werden, zu falsch positiven Ergebnissen im Coombs-Test kommen kann.[5]

LITERATUR

1. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)
2. Peter D. Issit, David J. Anstee
   Applied Blood Group Serology, 4. Edition, Montgomery Scientific Publications 1998
3. Brecher ME. ed. Technical manual 14th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
4. Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel
   Transfusionsmedizin, 3. Auflage, Springer-Verlag 2004.

REF	Artikel-Nummer	LOT	Charge
	Lagerung von - bis		Verfallsdatum
IVD	In-Vitro Diagnostikum	CE	EG CE Symbol
	Hersteller nach 98/79/EG		Gebrauchsinformation beachten
UDI	Unique Device Identification		Vertreiber

REF

700492/1 LISS solution 10 ml

730-13-2009 Version 009 / 25.02.2025

CE

ANTITOXIN GmbH Industriestraße 88 69245 Bammental Deutschland
+49 (0) 6223/ 8661-0 +49 (0) 6223/ 8661-13 qara@antitoxin-gmbh.de

LOXO GmbH - Gerhart-Hauptmann-Str. 48, D-69221 Dossenheim

LISS solution

English

for Tube Method

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTENDED USE

Mollison and Polley discovered in 1964 that decrease inreducing ionic strength through a low ionic strength solution (LISS) enhances the antigen-antibody response.
The present Liss solution is a modification of the low-salt medium for antibody diagnostics described by Löw, B. and Messeter, L. 1974.
LISS solution modified is used in blood group serology to increase sensitivity / enhancement of agglutinations, as well as to shorten the reaction time between antibodies and erythrocytes.

Excluded is the use in connection with serological blood typing of:

— ABO system [A (ABO1), B (ABO2), AB (ABO3)];
— Rhesus system [RH1 (D), RHW1, RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e)];
— Kell system [Kel1 (K)];
— Kidd system [JK1 (Jka), JK2 (Jkb)];
— Duffy system [FY1 (Fya), FY2 (Fyb)].

The reagent is intended to be used by qualified and technical personnel only.

PRINCIPLE OF PROCEDURE

The test method use with this solution is based on the principle of agglutination. The low ionic strength solution in combination with a small proportion of bovine albumin solution and the lower ion concentration than in a physiological NaCl solution causes fluid inflow into the erythrocytes, thereby forming a larger surface area, making various antigens more accessible to the corresponding antibodies (increasing sensitivity), increasing the amount of AK outside the cell, however, the specificity is maintained. Normal human erythrocytes carrying the corresponding antigen are recognized and agglutinated by a corresponding antibody.

REAGENTS

The listed reagent is offered in the following form:

LISS solution *modified*

The reagent contains Thiomerosal as preservative.
The solution also contains sodium chloride, macromolecules and bovine albumin, which has been tested and certified by the US Veteriany service inspectors.

WARNING

LISS solution is prepared from biological material. As biological product it should be looked upon as potentially infectious because of never complete exclusion of danger through excitants of disease. The solution contains thiomerosal that may be toxic.
On disposal, flush with large quantities of water.
For the reasons mentioned above the reagent should be handled with proper care.

STORAGE REQUIREMENT

Store opened and unopened products at +2 to +8°C.
May be at room temperature while in use.
In principle, store and use the reagent to declared expiry date only.

REMARKS

1. With each testing positive and negative controls should be performed.
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 reagent 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 highly different from appointed relative centrifugal force may lead to false results.
6. The test method identified below is for manual testing only. When using automated or semi-automated instruments, follow the procedures that are contained in the operator's manual provided by the device manufacturer. Laboratories must follow approved validation procedures.
7. For usage of this reagent all effective national laws, directives and guidelines have to be observed in its current valid version, in Germany especially the „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)"[1].

SAMPLE PREPARATION

1. Blood sample should be collected by approved medical procedure.
2. Blood samples 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 reagent.
   If a delay in testing occurs, samples should be stored at +2 to +8°C.
   Blood drawn into EDTA should be tested within 7 days and samples 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 preparation of the reagent required.
Take and use the reagent directly from the vials.

PROCEDURE

Not included but necessary materials:
Tube Centrifugation Method:
1. tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm)
2. microliter pipette
3. timer
4. incubator
5. centrifuge
6. isotonic saline (0,85 - 0,9% sodium chloride)
7. Anti-Human-Globulin-Reagent (Coombs-Serum / AHG- Serum)

Test procedure

Tube Centrifugation Method

1. Prepare 2% to 5% suspensions of red blood cells in isotonic saline (red blood cells may be washed 1-3 times with isotonic saline.
2. In a labeled test tube add 50µl (alternative one drop = approximately 50µl) of appropriate cell suspension
3. Add 100µl (alternative two drops = approximately 100µl) serum/plasma of a patient/proband or bloodgrouping reagent.
4. Subsequently add 100µl (alternative two drops = approximately 100µl) LISS solution to the tube.
5. Mix Erythrocytes / Reagentmixture well by slightly shaking.
6. Incubate tube in an incubator at +37 °C for 10 min.
7. Centrifugation of the tube for 1 minute at 1.000 rpm (approximately 180-270 x g).
8. Gently shake the red cells completely from the bottom of the tube and check macroscopically for agglutination within 3 minutes.
9. Document the result.
10. Wash red cells 3 times with (cold) isotonic saline.
11. Subsequently add 100 µL Anti-Human-Globulin-Reagent (Coombs-Serum / AHG-Serum) to the tube, release the cells from the bottom of the tube by slightly shaking and mix with the Coombs-Serum / AHG-Serum.
12. Centrifuge tube for 1 min at 1.000 rpm (approximately 180-270 x g).
13. Gently shake the red cells from the bottom of the tube and check macroscopically for agglutination within 3 minutes.
14. Document the result

INTERPRETATION OF RESULTS

"Slightly shaking" at Tube Centrifugation Method:

Positive results (+): visible agglutination of erythrocytes is a positive result and indicates the presence of the corresponding antigen.
Negative results (-): No visible agglutination of erythrocytes is a negative result and indicates the absence of the corresponding antigen.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Inaccuracy at compliance with instructions written under section "Procedures" and "Interpretation of results" may lead to incorrect results.
2. No valid conclusion concerning the test result can be reached, if controls with uncertain or false results occur.
3. Hemolyzed, turbid, contaminated or clotted blood samples must not be used in this test.
4. No one specific antiserum or technique can be guaranteed to detect all rare, weak or variant of antigens.[2]
5. Due to variability of antigen expression, reactivity of the reagent against certain phenotypes may give weaker reactivity compared to control cells.
6. Red blood cells coated with alloantibodies or autoantibodies (i.e., cells that are positive in the direct antiglobulin-test (DAT)) are unsuitable for testing.
7. As described in the literature, samples from patients treated with anti-CD38 monoclonal antibodies can cause false positive results in the Coombs test.[5]

LITERATURE

1. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)
2. Peter D. Issit, David J. Anstee
   Applied Blood Group Serology, 4. Edition, Montgomery Scientific Publications 1998
3. Brecher ME. ed. Technical manual 14th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
4. Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel
   Transfusionsmedizin, 3. Auflage, Springer-Verlag 2004.

REF	Product Code	LOT	Lot
	Store from - to		Expiration Date
IVD	In-Vitro Diagnostic	CE	EU CE symbol
	Manufacturer as to 98/79/EG		Observe instruction for use
UDI	Unique Device Identification		Distributor

REF

700492/1 LISS solution 10 ml

730-13-2009 Version 009 / 25.02.2025

CE

ANTITOXIN GmbH Industriestraße 88 69245 Bammental Germany
+49 (0) 6223/ 8661-0 +49 (0) 6223/ 8661-13 qara@antitoxin-gmbh.de

LOXO GmbH - Gerhart-Hauptmann-Str. 48, D-69221 Dossenheim