Anti-D blend monoclonal, human IgG + IgM

Deutsch

Für die Objektträger-, Röhrchen-, Karten- und Mikrotiterplatten-Methode
NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

ZWECKBESTIMMUNG

Das monoklonal Anti-D blend Testserum wird aus Zellkulturüberständen von Hetero-Hybridoma-Zelllinien gewonnen, die Antikörper vom IgG- bzw. IgM-Typus sezernieren, die spezifisch gegen das korrespondierende Blutgruppenantigen gerichtet sind. Der Antikörper ist jeweils humanes Protein. Das Testserum wird zum qualitativen In-Vitro Nachweis des Vorhandenseins oder Fehlens des Blutgruppenantigens D auf menschlichen Erythrozyten verwendet.
Dieses Testserum reagiert mit dem IgM-Antikörper negativ und mit dem IgG-Antikörper im indirekten Coombs-Test positiv mit Blutproben der Kategorie D^{VI}.
Die Anwendung dieses Testserums ist nur für qualifiziertes und geschultes Fachpersonal vorgesehen.

PRINZIP DES VERFAHRENS

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

TESTSEREN

Das aufgeführte Blutgruppentestserum enthält Antikörper der folgenden Klone:

Anti-D blend monoclonal, human IgG+IgM clones: MS-26, TH-28

Dieses Testserum enthält als Konservierungsmittel <0.1% (w/v) Natriumazid.
Außer dem aktiven Antikörperbestandteil beinhaltet das Testserum Natriumchlorid, hochmolekulare Verbindungen und Rinderalbumin, das durch die US Veterinay service Inspectoren überprüft und zertifiziert wurde.

WARNUNG

Dieses Testserum wird aus Zellkulturüberständen hergestellt. Unabhängig davon sollte dieses biologische Produkt wegen nie völlig auszuschließender Gefährdung durch Krankheitserreger als potentiell infektiös angesehen werden. Das Testserum enthält 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 sollte dieses Testserum 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 Produktes.
3. Die Reaktionsfähigkeit des Testserums wird durch leichte Trübung nicht beeinträchtigt. Eine bakterielle und chemische Kontamination ist zu vermeiden. Wenn eine sichtbare Veränderung des Testserums festgestellt wird, sollte das Testserum nicht mehr eingesetzt werden, es kann auf eine mikrobielle Kontamination hinweisen.
4. Die Stärke der positiven Reaktion ist vom Alter des verwendeten Blutes abhängig.
5. Zentrifugieren außerhalb des angegebenen Drehzahl-Bereiches kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Bei der Kartenmethode kann der Einsatz einer anderen karten-spezifischen Zentrifuge (jede Kartenzentrifuge hat seine festgelegte unveränderlicher g-Zahl) auf Grund der dadurch veränderten g-Zahl zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
6. Die beschriebenen Testmethoden zur Anwendung gelten ausschließlich für manuelle Verfahren. Werden Automaten oder halbautomatische Systeme verwendet, müssen die Laboratorien die Angaben der Gerätehersteller befolgen und Validierungen nach anerkannten Verfahren durchführen.
7. Bei der Anwendung dieses Testserums 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)“ [1] in ihrer gültigen Fassung.
8. Dieses Testserum reagiert mit dem IgM-Antikörper negativ und mit dem IgG-Antikörper im indirekten Coombs-Test positiv mit Blutproben der Kategorie D^{VI}.
9. Die Angaben zum Einsatz der Testkarten, in der jeweils zugehörigen Gebrauchsinformation, sind unbedingt zu beachten.

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 des Testserums ist nicht erforderlich.
Das Testserum wird direkt aus dem Fläschchen entnommen und eingesetzt.

VERFAHRENSWEISE

Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber benötigte Materialien

Objektträgermethode:	Objektträger; Pasteurpipette; Rührstäbchen; Kurzzeitwecker
Röhrchenmethode:	Teströhrchen (10 x 75 mm oder 12 x 75 mm); Mikroliterpipette; Kurzzeitwecker; Brutschrank; Zentrifuge; isotonische Kochsalzlösung (0,85 - 0,9% Natriumchlorid); Anti-Human-Globulin-Serum (Coombs-Serum / AHG-Serum)
Kartenmethode:	Karten: - BIO-RAD (*DiaMed*) „NaCl, Enzyme Test and cold Agglutinins“ - BIO-RAD (*DiaMed*) LISS/Coombs - Grifols „DG Gel Neutral“ - Grifols „DG Gel Coombs” Röhrchen; Mikroliterpipette; Zentrifuge; Kurzzeitwecker; entsprechende Kartenzentrifuge; Karten-Inkubator kartenspezifisches Verdünnungsmittel; isotonische Kochsalzlösung (0,85 - 0,9% Natriumchlorid)
Mikrotiterplatten Methode:	Mikrotiterplatte mit 96 U-Vertiefungen; Mikroliterpipette; Zentrifuge; Kurzzeitwecker; Mikrotiterplatten-Schüttler; Mikrotiterplatten -Zentrifuge; isotonische Kochsalzlösung (0,85 - 0,9% Natriumchlorid)

Testdurchführung

Objektträgermethode

1. Nur Erythrozytensediment verwenden.
2. Auf einen beschrifteten Objektträger einen Tropfen (ca. 50 µL) des Testserums auftropfen.
3. Zu dem Tropfen Testserum auf dem Objektträger einen Tropfen (ca. 50 µL) Erythrozyten-sediment mit einer Pasteurpipette geben.
4. Die Erythrozyten-/Testserummischung mit einem Rührstäbchen gut vermischen und zu einem Kreis von ca. 2 cm Durchmesser ausbreiten.
5. Bei leichtem Schwenken des Objektträgers innerhalb einer Minute auf Agglutination prüfen (Reaktionsbeginn nach Sekunden).
6. Ergebnis protokollieren.

Röhrchen-Zentrifugationsmethode

1. Eine 2-5%ige Erythrozytensuspension in isotonischer Kochsalzlösung vorbereiten. (Erythrozyten können vorab 1-3 Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden).
2. In ein beschriftetes Teströhrchen 100 µL des Testserum geben und anschließend in das Teströhrchen 100 µL der entsprechenden Erythrozytensuspension zugeben.
   Alternativ können ein Tropfen = ca. 50 µL Erythrozytensuspension zu einem Tropfen = ca. 50 µL Testserum gegeben werden.
3. Die Erythrozyten-/Testserummischung durch leichtes Schütteln mischen
4. Teströhrchen 1-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Teströhrchen 1 Minute bei 2.000 U/min (ca. 800-1.000 x g) zentrifugieren.
6. Zellen durch vorsichtiges Schütteln vollständig vom Röhrchenboden lösen und innerhalb 3 Minuten makroskopisch auf Agglutination untersuchen.
7. Ergebnis protokollieren.

Bei negativen Ergebnissen Weiterführung zum Indirekten Coombs-Test

8. Schritte 1. bis 3. neu durchführen oder nach dem Ablesen des Ergebnisses direkt fortfahren.
9. Teströhrchen 30 Minuten bei +37 °C inkubieren.
10. Die Erythrozyten dreimal mit (kalter) isotonischer Kochsalzlösung waschen.
11. Zu dem 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 vom Röhrchenboden lösen und innerhalb 3 Minuten makroskopisch auf Agglutination untersuchen.
14. Ergebnis protokollieren.

Kartenmethode (manuelle Methode / gültig für die Karten:

- BIO-RAD (*DiaMed*) „NaCl, Enzyme Test and cold Agglutinins“
- Grifols „DG Gel Neutral“)

1. Eine 0,8%ige Erythrozytensuspension im kartenspezifischen Verdünnungsmedium vorbereiten (Erythrozyten können vorab 1-3 Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden).
2. In ein beschriftetes Mikroröhrchen 50 µL der entsprechenden Erythrozytensuspension geben.
3. In das Mikroröhrchen 25 µL des Testserums zugeben.
4. Die Karte in der jeweils entsprechenden Kartenzentrifuge mit der, für die Zentrifuge unveränderlichen g-Zahl innerhalb 30 Minuten zentrifugieren.
5. Innerhalb von 30 Minuten Mikroröhrchen makroskopisch auf Agglutination untersuchen.
6. Ergebnis protokollieren.

Bei negativen Ergebnissen weitere Austestung mit der Coombs-Karte (indirekter Coombs-Test)
(manuelle Methode / gültig für die Karten:

- BIO- RAD (*DiaMed*) “LISS/Coombs “
- Grifols „DG Gel Coombs“)

1. Eine 0,8%ige Erythrozytensuspension in kartenspezifischem Verdünnungsmedium vorbereiten (Erythrozyten können vorab 1-3 Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden).
2. In ein beschriftete Mikroröhrchen 50 µL der entsprechenden Erythrozytensuspension geben.
3. In das Mikroröhrchen 25 µL des Testserums zugeben.
4. Die Karte 15 Minuten bei +37 °C inkubieren.
5. Die Karte in der jeweils entsprechenden Kartenzentrifuge mit der, für die Zentrifuge unveränderlichen g-Zahl zentrifugieren.
6. Innerhalb von 30 Minuten Mikroröhrchen makroskopisch auf Agglutination untersuchen.
7. Ergebnis protokollieren.

Mikrotiterplattenmethode

1. Eine 2-5%ige Erythrozytensuspension in isotonischer Kochsalzlösung vorbereiten. (Erythrozyten können vorab 1-3 Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden).
2. In eine beschriftete Vertiefung 50 µL des Testserums geben.
3. In die Vertiefung 50 µL der entsprechenden Erythrozytensuspension zugeben.
4. Die Mikrotiterplatte auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler für 30 Sekunden auf mittlerer Stufe schütteln.
5. Die Mikrotiterplatte in einer entsprechenden Mikrotiterplatten-Zentrifuge für 30 Sekunden bei 400 x g zentrifugieren.
6. Die Mikrotiterplatte auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler für 30 Sekunden auf mittlerer Stufe kurz schütteln.
7. Die Testergebnisse direkt nach dem aufschütteln makroskopisch auf Agglutination unter-suchen.
8. Ergebnis protokollieren.
9. Die Tests mit negativen oder fraglichen Ergebnissen für eine Dauer von 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Die Schritte 5 bis 8 nach der Inkubation wiederholen.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

"Vorsichtiges Schwenken / Schütteln"
bei der Objektträgermethode / Röhrchen-Zentrifugationsmethode / 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 Test-ergebnis zu bewerten, das entsprechende Antigen ist nicht nachweisbar.

Die Ablesung und Interpretation der Ergebnisse bei der Kartenmethode entsprechend der Gebrauchsinformation der jeweiligen Karte durchführen.

➔

sifin diagnostics gmbh
Berliner Allee 317-321
13088 Berlin / Germany
☏ +49 30 700 144-0

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. Enzymbehandelte Erythrozyten oder die Zugabe von Rinderalbumin und/oder anderer proteinhaltiger Lösungen können mit diesem Testserum zu unspezifischen Reaktionen führen.
4. Hämolysierte, trübe, kontaminierte oder geronnene Blutproben dürfen nicht eingesetzt werden.
5. Beim Objektträgertest können unspezifische Reaktionen beim Eintrocknen des Reaktionsansatzes bzw. beim Erwärmen des Objektträgers auftreten
6. Beim Objektträgertest werden die meisten schwachen D-Antigene (D^{weak}) und Kategorie Blute nicht angezeigt.
7. Dieses Testserum reagiert negativ mit Bluten der Kategorie D^{VI} im agglutinierenden Ansatz und positiv im indirekten Coombs-Test.
8. Aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung der Antigene kann es bei bestimmten Phänotypen mit diesem Testserum zu einer schwächeren Reaktion kommen als mit Kontrollerythrozyten.
9. Kein einzelnes Testserum oder eine einzelne Methode kann garantieren alle seltenen oder schwachen Antigene und alle Varianten der Antigene zu detektieren. [2]
10. 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 die Austestung ungeeignet.
11. Bei Erythrozyten, die stark mit Antikörpern beladen sind (Erythrozyten positiv im direkten Antiglobulintest), kann es im Kartentest zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. Diese Zellen reagieren auch ohne Testserum positiv!
12. 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]
13. Angaben zu Grenzen in der Gebrauchsanweisung der eingesetzten Karte sind zu beachten.
14. Bei Verwendung von Produkten aus 1 L Flaschen ist der Inhalt innerhalb 6 Monaten nach dem ersten Öffnen der Flasche zu verbrauchen.

LEITUNGSDATEN

Eine Leistungsbewertung für dieses Produkt wurde entsprechend der Common Technical Specifications (CTS Entscheidung der Kommission vom 03. Februar 2009) durchgeführt.
Es wurde unterschiedliches Probenmaterial (Spender-, Patienten-, Neugeborenen -, Panelblute) eingesetzt und mit anderen Referenzmethoden / Produkten verglichen.

Produkt	Positive	Negative	Falsch Positive	Falsch Negative
Anti- D blend	2164	590	0	0 *

Die errechneten Werte betrugen für:

Produkt	Sensitivität	Spezifität
Anti- D blend	100% *	100%

* für Anti-D blend monoclonal, human IgG+IgM, clones: MS-26,TH-28 wurden im Objektträgertest 4 D^{weak}-Proben falsch negativ bewertet, sodass in dieser Technik die Sensitivität lediglich 99,82% betrug.

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 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.
5. Blood Transfusion Management for Patients Treated with Anti-CD38 monoclonal Antibodies.
   Frontiers in Immunology November 2018 / Artikel 2616

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	

REF

BG1487 Anti-D blend monoclonal, human IgG+IgM clones: MS-26, TH-28 10 ml

730-13-2412 Version 012 / 01.07.2021

CE 0483

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

sifin diagnostics gmbh
Berliner Allee 317-321
13088 Berlin / Germany
☏ +49 30 700 144-0

Anti-D blend monoclonal, human IgG + IgM

English

For Slide-, Tube-, Card- and Microplate Method
FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTENDED USE

Monoclonal Anti-D blend reagent is produced from cell culture supernatants of heterohybridoma - cell lines. The cells are secreting an antibody of IgG- or IgM-type which reacts specific with the corresponding blood group antigen. The antibody in each case is human protein. The reagent is used for In-Vitro-Diagnostic, to determine qualitative whether human red blood cells possess or lack the corresponding blood group antigen D. This reagent reacts negative with erythrocytes of category D^{VI} with the IgM-antibody and positive with the IgG-antibody in indirect Coombs-test.
The reagent is intended to be used by qualified and technical personnel only.

PRINCIPLE OF PROCEDURE

The test methods used with this reagent is 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-D blend monoclonal, human IgG+IgM clones: MS-26, TH-28

This reagent contain <0.1% (w/v) sodium azide as preservative.
Additionally the reagent is prepared of active antibody, sodium chloride, macromolecules and bovine albumin, which has been tested and certified by the US Veterinay service inspectors.

WARNING

This reagent is prepared from supernatants of cell cultures. As biological product it should be looked upon as potentially infectious because of never complete exclusion of danger through excitants of disease. The reagent contain 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.
For the reasons mentioned above, reagent should be handled with proper care.

STORAGE REQUIREMENT

Store opened and unopened product at +2 to +8°C. May be at room temperature while in use.
In principle, store and use the reagent to indicated 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 product should be avoided. If a visible change is detected, the reagent should no longer be use, 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 test methods identified below are 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 Germany especially the „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestand-teilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)"[1] in its current version.
8. This reagent reacts negative with erythrocytes of category D^{VI} with the IgM-antibody and positive with the IgG-antibody in indirect Coombs-test.
9. The information on the use of the test cards in the relevant insert must be observed.

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 preparation of the reagent required.
Take and use reagent directly from the vials.

PROCEDURE

Not provided material, additionally needed

Slide Method:	glass slide; Pasteur pipette; mixing stick; timer;
Tube Centrifugation Method:	tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm); microliter pipette; centrifuge; timer; incubator; isotonic saline (0,85 - 0,9% sodium chloride): Anti-Human-Globulin-Serum (Coombs-Serum / AHG-Serum)
Card Method:	Cards: - BIO-RAD (*DiaMed*) „NaCl, Enzyme Test and cold Agglutinins" - BIO-RAD (*DiaMed*) „LISS/Coombs" - Grifols „DG Gel Neutral" - Grifols „DG Gel Coombs" tubes; microliter pipette; centrifuge; timer; corresponding card centrifuge; card Incubator; card specific diluent; isotonic saline (0,85 - 0,9% sodium chloride)
Microplate Method:	microplate with 96 U-wells; microliter pipette; centrifuge; timer; microplate shaker; microplate centrifuge; isotonic saline (0,85 - 0,9% sodium chloride)

Test procedure

Slide Method

1. Use erythrocyte sediment only.
2. Place one drop (approximately 50 µL) of the 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. At first put 100 µL of appropriate reagent in a marked tube subsequently add 100 µL of appropriate cell suspension in the tube.
   Alternative one drop = approximately 50 µL cell suspension can be added to one drop = approximately 50 µL test serum.
3. Mix Erythrocytes-/Reagent mixture well by slightly shaking.
4. Incubate tube at room temperature for 1-15 min.
5. Centrifugation of tube for 1 minute at 2.000 rpm (approximately 800-1.000 x g).
6. Gently shake the red cells completely from the bottom of the tube and check macroscopically for agglutination within 3 minutes.
7. Document the result

If the results are negative, continue with the indirect Coombs

8. Repeat step 1. to 3. with fresh material or continue after reading of result directly.
9. Incubate tube at +37 °C for 30 min.
10. Wash red cells 3 times with (cold) isotonic saline.
11. Add 100 µL Anti-Human-Globulin-serum (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. Centrifugation of tube for 1 min at 1.000 rpm (approximately 180-270 x g).
13. Gently shake the red cells completely from the bottom of the tube and check macroscopically for agglutination within 3 minutes.
14. Document the result.

Card Method (manual method / valid for the cards:
- BIO-RAD *(DiaMed)* „NaCl, Enzyme Test and cold Agglutinins"
- Grifols „DG Gel Neutral")

1. Prepare 0,8 % suspension of red blood cells in card specific diluent (red blood cells may be washed 1-3 times with isotonic saline).
2. Add 50 µL of appropriate cell suspension to a marked micro tube.
3. Add 25 µL of reagent to the micro tube.
4. Centrifuge the card in appropriate card centrifuge with the for this centrifuge unchangeable g-force after latest 30 minutes.
5. Check macroscopically micro tube for agglutination within 30 minutes.
6. Document the result.

If the results are negative, continue with the Coombs-card (indirect Coombs-test)

(manual method / valid for the cards:
- BIO- RAD (*DiaMed*) "LISS/Coombs "
- Grifols „DG Gel Coombs")

1. Prepare 0,8 % suspension of red blood cells in card specific diluent (red blood cells may be washed 1-3 times with isotonic saline).
2. Add 50 µL of appropriate cell suspension to a marked micro tube.
3. Add 25 µL of reagent to the micro tube.
4. Incubate card at +37°C for 15 minutes.
5. Centrifuge the card in appropriate card centrifuge with the for this centrifuge unchangeable g-force.
6. Check macroscopically micro tube for agglutination within 30 minutes.
7. Document the result.

Microplate Method

1. Prepare 2-5% suspension of red blood cells in isotonic saline (red blood cells may be washed 1-3 times with isotonic saline).
2. Add 50 µL of reagent to a marked well.
3. Add 50 µL of appropriate cell suspension to the well.
4. Shake the microplate for 30 seconds on microplate shaker with medium speed.
5. Centrifuge the microplate in appropriate microplate centrifuge for 30 seconds at 400 x g.
6. Shake microplate for 30 seconds on a microplate shaker with medium speed.
7. Evaluated macroscopically for agglutination directly after centrifugation.
8. Document the result.
9. Tests with negative or doubtful results have to be incubated for 5 to 10 minutes at room temperature.
10. Repeat steps 5 to 8 after incubation at room temperature

INTERPRETATION OF RESULTS

"Slightly rotating / shaking"
at Slide Method / at Tube Centrifugation Method / Microplate 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.
Read and interpret the results of the card according to the instruction for use of the corresponding card.

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. Enzyme treated erythrocytes or addition of bovine albumin and/or other solutions containing protein may cause unspecific reactions with this reagent.
4. Hemolyzed, turbid, contaminated or clotted samples should not be used.
5. With the slide method, unspecific reactions might appear due to drying of the reaction-formation or if the slide is heated
6. With the slide method most of weak D-antigens (Dweak) and categories are not recognized.
7. This reagent reacts negative with erythrocytes of category D^{VI} with the IgM-antibody and positive with the IgG-antibody in indirect Coombs-test.
8. Due to variability of antigen expression, reactivity of this reagent against certain phenotypes may give weaker reactivity compared to control cells.
9. No one specific antiserum or technique can be guaranteed to detect all rare, weak or variant antigens [2].

➔

sifin diagnostics gmbh
Berliner Allee 317-321
13088 Berlin / Germany
☏ +49 30 700 144-0

10. 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)) are not suitable for this test procedure.
11. Red blood cells coated with antibodies (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.
12. As described in the literature, samples from patients treated with anti-CD38 monoclonal antibodies can cause false positive results in the Coombs test.[5]
13. Pay attention to all statements to limitations in the instruction for use of the cards.
14. If products are taken out of 1 L flasks, the material of this bottle has to be used within 6 month.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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	Negative	False Positive	False Negative
Anti- D blend	2164	590	0	0 *

The calculated values found for:

Product	Sensitivity	Spezifitcity
Anti- D blend	100% *	100%

* for Anti-D blend monoclonal, human IgG+IgM, clones: MS-26; TH-28 in slide method 4 D^{weak} samples were tested false negative, so in this method sensitivity was 99,82% only.

LITERATURE

1. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blut-produkten (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.
5. Blood Transfusion Management for Patients Treated with Anti-CD38 monoclonal Antibodies. Frontiers in Immunology November 2018 / Artikel 2616

REF Product Code	LOT Batch
Store from - to	Expiration Date
IVD In-Vitro Diagnostic	CE EU CE symbol
Manufacturer according to 98/79/EG	Consult instructions for use
UDI Unique Device Identification	

REF

BG1487 Anti-D blend monoclonal, human IgG+IgM clones: MS-26, TH-28 10 ml

730-13-2412 Version 012 / 01.07.2021

CE 0483

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

sifin diagnostics gmbh
Berliner Allee 317-321
13088 Berlin / Germany
☏ +49 30 700 144-0