

MONOSPEZIFISCHES ANTIHUMANGLOBULIN-REAGENS (KANINCHEN)
GEBRAUCHSANWEISUNG

Anti-Human IgG (Clear oder Green): Für Coombs-Tests.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Jahr 1945 beschrieben Coombs, Mourant und Race die Verwendung von Antihumanglobulinserum zur Erkennung von Antikörpern, die an rote Blutkörperchen gebunden und nicht agglutinierend sind.

VERWENDUNGSZWECK

Diese Reagenzien sind monospezifische Reagenzien zur Blutgruppenbestimmung, die zur qualitativen Erkennung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von sensibilisierenden IgG-Antikörpern (alle 4 Unterklassen) auf menschlichen roten Blutkörperchen herangezogen werden sollen, wenn sie in Übereinstimmung mit den in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen empfohlenen Methoden untersucht werden.

GRUNDSATZ

Die Reagenzien enthalten Antikörper gegen menschliche IgG-Antikörper auf menschlichen roten Blutkörperchen und bewirken eine direkte Agglutination (Verklumpung) der roten Blutkörperchen, die mit menschlichen IgG-Antikörpern sensibilisiert sind. Erfolgt keine Agglutination, zeigt dies im Allgemeinen das Nichtvorhandensein von sensibilisierenden IgG-Antikörpern auf menschlichen roten Blutkörperchen an (siehe **Einschränkungen**).

REAGENZIEN

Die Reagenzien Lorne Monospecific Anti-Human IgG Clear und Anti-Human IgG Green enthalten von Kaninchen hergeleitetes Anti-IgG. Jede nicht-spezifische Aktivität wird durch Adsorption entfernt. Die Reagenzien enthalten weder CMR-Stoffe oder Stoffe mit endokriner Wirkung oder Stoffe, die beim Benutzer zu einer Sensibilisierung oder einer allergischen Reaktion führen könnten, noch bestehen sie aus solchen Stoffen. Die Reagenzien werden mit der optimalen Verdünnung zur Verwendung mit allen unten angegebenen empfohlenen Methoden geliefert, ohne dass sie weiter verdünnt werden müssen oder ihnen etwas hinzugefügt werden muss. Die Los-Referenznummer und das Ablaufdatum befinden sich auf dem **Etikett der Epruvette**.

Reagens	Zelllinie/Klon	Farbe	Verwendeter Farbstoff
Anti-Human-IgG klar	Kaninchen-Anti-Human-IgG	Farblos	Keiner
Anti-Human-IgG grün	Kaninchen-Anti-Human-IgG	Grün	Patentblau und Tartrazin

LAGERUNG

Epruvetten mit Reagenzien sollten bei Erhalt bei 2 - 8 °C gelagert werden. Eine längere Lagerung bei Temperaturen außerhalb dieses Bereichs kann zu einem beschleunigten Verlust der Reaktionsfähigkeit des Reagens führen. Dieses Reagens wurde Transportstabilitätsstudien bei 37 °C und -25 °C unterzogen, wie sie im Dokument EN13640:2002 beschrieben werden.

PROBENNAHME UND VORBEREITUNG

Proben sollten aseptisch mit EDTA entnommen und so schnell wie möglich untersucht werden. Ist EDTA nicht verfügbar, sind mit ACD, CPD oder CPDA-1 entnommene Proben geronnenen Proben vorzuziehen. Wenn nur geronnene Proben verfügbar sind, diese vor der Untersuchung nicht einfrieren. Alle Blutproben sollten mindestens zweimal mit PBS oder isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden, ehe sie untersucht werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reagenzien sind nur zur Verwendung bei der *In-vitro*-Diagnostik vorgesehen.
- Weist eine Epruvette mit einem Reagens Risse auf oder leckt sie, sind die Inhalte unverzüglich zu entsorgen.
- Die Reagenzien nicht nach dem Ablaufdatum verwenden (siehe **Etikett der Epruvette**).
- Die Reagenzien nicht verwenden, wenn ein Niederschlag vorhanden ist.
- Bei der Handhabung der Reagenzien ist Schutzkleidung wie Einmalhandschuhe und ein Laborkittel zu tragen.
- Die Reagenzien wurden zur Reduzierung der Keimbelastung durch eine 0,2 µm-Kapsel gefiltert, werden jedoch nicht steril geliefert. Nach erfolgter Öffnung einer Epruvette sollten die Inhalte bis zum Ablaufdatum brauchbar sein, solange keine ausgeprägte Trübung vorliegt, die auf eine Verschlechterung oder Kontamination des Reagens hinweisen kann.
- Die Reagenzien enthalten < 0,1 % Natriumazid. Natriumazid kann bei Verschlucken giftig sein und kann mit Abflussrohren aus Blei und Kupfer reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit großen Mengen Wasser wegspülen.

- Zur Herstellung der Produkte verwendete Materialien wurden an der Quelle getestet und es wurde festgestellt, dass sie unter Verwendung von zugelassenen mikrobiologischen Tests in Bezug auf HIV 1+2- und HCV-Antikörper und HBsAg negativ waren.
- Von den bekannten Tests kann keiner garantieren, dass die aus menschlichen oder tierischen Quellen abgeleiteten Produkte frei von Infektionserregern sind. Bei der Verwendung und Entsorgung einer jeden Epruvette und ihrer Inhalte ist mit Vorsicht vorzugehen.

ENTSORGUNG DES REAGENS UND UMGANG MIT VERSCHÜTTUNGEN

Für Informationen zur Entsorgung der Reagenzien und der Dekontaminierung bei Verschüttungen siehe die **Sicherheitsdatenblätter**, die auf Anfrage verfügbar sind.

KONTROLLEN UND RAT

- Es wird empfohlen, dass mit jeder Testserie parallel eine positive Kontrolle (schwaches Anti-D <0,1 IU/ml) und eine negative Kontrolle (ein inaktives Serum) getestet werden. Zeigen die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse, sind die Tests als ungültig zu betrachten.
- Die Antiglobulinmethoden können nur dann als gültig betrachtet werden, wenn alle negativen Tests positiv mit den IgG-sensibilisierten roten Blutkörperchen reagieren.
- Das Reagens vor der Verwendung auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Nach Verwendung des Reagens das Reagens wieder bei 2-8 °C lagern.
- Bei den **empfohlenen Methoden** beträgt ein Volumen ungefähr 50 µl, wenn der mitgelieferte Tropfer verwendet wird.
- Die Verwendung der Reagenzien und die Interpretation der Ergebnisse muss von ordnungsgemäß geschultem und qualifiziertem Personal in Übereinstimmung mit den Anforderungen des Landes, in dem die Reagenzien verwendet werden, durchgeführt werden.
- Der Benutzer muss bestimmen, ob sich die Reagenzien zur Verwendung bei anderen Methoden eignen.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- Coombs-Zellwaschzentrifuge.
- Glas-Teströhrchen (10 x 75 mm oder 12 x 75 mm).
- IgG-sensibilisierte rote Blutkörperchen, d. h. Lorne Coombs Control Cells (Katalognr. 970010).
- Inaktiver Antikörper, d. h. Lorne Inert AB Serum (Katalognr. 110010).
- Lösung mit geringer Ionenstärke (LISS): Mit 0,03 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄; NaH₂PO₄-Puffer pH 6,7 bei 22 °C ± 1 °C und 0,24 M Glycin.
- PBS-Lösung (pH 6,8-7,2) oder isotonische Kochsalzlösung (pH 6,5-7,5).
- Vollpipetten.
- Wasserbad oder Trockeninkubator, äquilibriert auf 37 °C ± 2 °C.
- Schwaches Anti-D, d. h. Lorne Precise Weak Anti-D (Katalognr. 209005).

EMPFOHLENE METHODEN

A. Direkter Coombs-Test (DAT)

- Die roten Test-Blutkörperchen viermal mit PBS oder isotonischer Kochsalzlösung waschen und darauf achten, die Kochsalzlösung zwischen den Waschvorgängen zu dekantieren und jeden Zellknopf nach jedem Waschvorgang zu resuspendieren. Die Kochsalzlösung nach dem letzten Waschvorgang endgültig dekantieren.
- Jedem trockenen Zellknopf 2 Volumina Lorne Anti-IgG hinzufügen.
- Gründlich mischen und alle Röhrchen 20 Sekunden lang bei 1000 rcf oder für einen geeigneten alternativen Zeitraum und mit geeigneter Kraft zentrifugieren.
- Den Zellknopf aus roten Blutkörperchen sanft resuspendieren und makroskopisch auf die Agglutination hin ablesen

B. Indirekter Coombs-Test (NISS IAT)

- Eine 2-3 %-ige Suspension gewaschener roter Blutkörperchen in PBS oder isotonischer Kochsalzlösung erstellen.
- In ein gekennzeichnetes Teströhrchen geben: 2 Volumina Testserum und 1 Volumen der Suspension der roten Test-Blutkörperchen.
- Gründlich mischen und 15 Minuten lang bei 37 °C inkubieren.
- Die roten Test-Blutkörperchen viermal mit PBS oder isotonischer Kochsalzlösung waschen und darauf achten, die Kochsalzlösung zwischen den Waschvorgängen zu dekantieren und jeden Knopf roter Blutkörperchen nach jedem Waschvorgang zu resuspendieren. Die Kochsalzlösung nach dem letzten Waschvorgang endgültig dekantieren.
- Jedem trockenen Zellknopf 2 Volumina Lorne Anti-IgG hinzufügen.

- Gründlich mischen und alle Röhrchen 20 Sekunden lang bei 1000 rcf oder für einen geeigneten alternativen Zeitraum und mit geeigneter Kraft zentrifugieren.
- Den Zellknopf aus roten Blutkörperchen sanft resuspendieren und makroskopisch auf die Agglutination hin ablesen

C. Indirekter Coombs-Test mit LISS (LISS IAT)

- Eine 1,5-2 %-ige Suspension gewaschener roter Blutkörperchen in LISS erstellen.
- In ein gekennzeichnetes Teströhrchen geben: 2 Volumina Testserum und 2 Volumina der Suspension der roten Test-Blutkörperchen.
- Gründlich mischen und 15 Minuten lang bei 37 °C inkubieren.
- Die Schritte 4 bis 7 der **NISS IAT** oben befolgen.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

- Positiv:** Eine Agglutination der roten Test-Blutkörperchen stellt ein positives Testergebnis dar und zeigt innerhalb zulässiger Einschränkungen des Testverfahrens das Vorhandensein von IgG auf den roten Test-Blutkörperchen an.
- Negativ:** Eine nicht vorhandene Agglutination der roten Test-Blutkörperchen stellt ein negatives Testergebnis dar und zeigt innerhalb der zulässigen Einschränkungen des Testverfahrens das Nichtvorhandensein von IgG auf den roten Blutkörperchen an.

STABILITÄT DER REAKTIONEN

- Die Schritte des Waschvorgangs sollten ohne Unterbrechung erfolgen und die Tests unmittelbar nach Hinzufügen des Reagens zentrifugiert und abgelesen werden. Verzögerungen können zur Dissoziation der Antigen-Antikörper-Komplexe führen und falsch negative oder schwach positive Ergebnisse verursachen.
- Bei der Interpretation von Ergebnissen von Untersuchungen, die bei anderen Temperaturen als den **empfohlenen** durchgeführt wurden, ist Vorsicht angebracht.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Rote Blutkörperchen, die wegen einer Beschichtung des IgG einen positiven DAT aufweisen, können nicht anhand des **indirekten Coombs-Tests** typisiert werden.
- Unzureichendes Waschen der roten Blutkörperchen beim indirekten Coombs-Test kann zur Neutralisierung des Antihumanglobulinreagens führen.
- Ein positiver DAT aufgrund von einer Sensibilisierung des Komplements spiegelt sich möglicherweise nicht in der *In-vivo*-Komplementbindung wider, wenn die Testzellen von einer gekühlten geronnenen Probe stammen.
- Ein negativer Coombs-Test schließt nicht zwingend die klinische Diagnose einer ABO-hämolytischen Krankheit beim Neugeborenen oder einer autoimmunhämolytischen Anämie aus. Weiters schließt er nicht zwingend eine HDN aus, vor allem bei einem Verdacht auf eine ABO-Inkompatibilität.
- Falsch positive oder falsch negative Ergebnisse können auch auftreten aufgrund von:
 - Kontamination von Testmaterialien
 - Ungeeigneter Lagerung, Zellkonzentration, Inkubationszeit oder Temperatur
 - Unsachgemäßer oder übermäßiger Zentrifugierung
 - Abweichung von den empfohlenen Methoden

BESTIMMTE LEISTUNGSMERKMALE

- Vor der Freigabe wurden alle Lose mit diesen Reagenzien anhand der in dieser Gebrauchsanweisung aufgeführten empfohlenen Testverfahren an roten Blutkörperchen, die mit Anti-D, Anti-K und Anti-Fy³ beschichtet waren, getestet, um die angemessene Reaktivität zu prüfen. Die Tests erfüllten die Testanforderungen, wie sie in der aktuellen Version/Ausgabe der „Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom“ angegeben werden.
- Die Anti-IgG-Wirksamkeit wurde anhand des folgenden Referenzstandards für die minimale Wirksamkeit getestet, der vom National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC) eingeholt wurde:
 - Anti-AHG-Referenzstandard 96/666
- Die Reaktivität von Anti-IgM, Anti-IgA oder Anti-leichte Kette-Komponenten, die vorhanden sein könnten, wurde nicht bestimmt.
- Die Qualitätskontrolle der Reagenzien erfolgte anhand von roten Blutkörperchen mit Phänotypen, die von einem Bluttransfusionszentrum im Vereinigten Königreich verifiziert wurden und vor der Verwendung mit PBS oder isotonischer Kochsalzlösung gewaschen worden waren.

HAFTUNGSAUSSCHLUSS

- Für das Leistungsverhalten der Reagenzien nach einem anderen Verfahren als den in den **empfohlenen Methoden** erwähnten ist der Benutzer verantwortlich.
- Alle Abweichungen von den **empfohlenen Methoden** sollten vor der Verwendung validiert werden⁶.

BIBLIOGRAPHIE

- Voak D, Downie DM, Moore BPL, und Engelfreit CP. Anti-Human Globulin reagent specification. The European and ISBT/ICSH View. Biotest Bulletin 1: 7-22 (1986).
- Das Department of Health and Social Security. Health Services Management Antiglobulin Test. False negative results, HN (Hazard) (83) 625 Nov 1983.

- Bruce M, Watt AH, Hare W, Blue A, Mitchell R. A serious source of error in antiglobulin testing. Transfusion 1986; **26**: 177-181.
- Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in AHG (AHG) tests: optimum conditions and quality control. Haematologia 1988; **21**(1): 3-16.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6. Ausgabe 2002. The Stationary Office.
- British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 1995, **5**, 145-150.

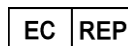
VERFÜGBARE GRÖSSEN DER REAGENZIEN

	Größe der Eprovette	Katalognummer	Tests je Eprovette
Lorne Anti-Human IgG (Clear)	10 ml	401010	100
	1000 ml	401000*	10.000
Lorne Anti-Human IgG (Green)	10 ml	402010	100
	1000 ml	402000*	10.000

*Diese Größe ist nur zur weiteren Verwendung in der Herstellung (FFMU) vorgesehen und trägt daher keine CE-Kennzeichnung.



Lorne Laboratories Limited
 Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
 Danehill
 Lower Earley
 Berkshire, RG6 4UT
 Vereinigtes Königreich
 Tel: +44 (0) 118 921 2264
 Fax: +44 (0) 118 986 4518
 E-Mail: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
 Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta