





|                       | REFERENCE | PACKAGING                                                                                      |
|-----------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HEMATEST A1, B        | 58950     | 1 vial of HEMATEST A1<br>1 vial of HEMATEST B                                                  |
| HEMATEST A1, A2, B, O | 51999     | 1 vial of HEMATEST A1<br>1 vial of HEMATEST A2<br>1 vial of HEMATEST B<br>1 vial of HEMATEST O |

## INTRODUCTION

These reagents are in vitro diagnostic medical devices (IVDMD) of human origin for professional use. They are designed for analysis of human biological samples.

HEMATEST are used for plasma ABO blood group determination.

Following testing for erythrocytic antigens in the red blood cell test, HEMATEST enables verification of the presence of the corresponding antibody in the test plasma using the plate or tube method.

## PRINCIPLE - OVERVIEW

The manual technique employed, on a plate or in a tube, utilizes the principle of hemagglutination. Red blood cells bearing an antigen agglutinate in the presence of test plasma containing the corresponding antibody.

ABO group determination is defined both by demonstration of antigens A and/or B on the surface of human red blood cells and by the presence or absence of anti-A and/or anti-B antibodies in the plasma.

It is thus appropriate to identify the erythrocytic antigens using known anti-A, anti-B and anti-A,B reagents (red blood cell test), then to confirm the preceding results by checking the presence of the corresponding antibodies in the plasma from the test blood using HEMATEST A1, B, and, possibly, HEMATEST A2 and O (plasma test).

## COMPOSITION

HEMATEST are prepared from a mixture of human red blood cells of known groups A1 RH-1, B RH1, A2 RH1 and O RH1.

The red blood cells are prepared in 5 % ready-for-use suspension in a storage solution and are packaged in 5-mL vials fitted with a calibrated dropper.

## PRECAUTIONS

HEMATEST are of human origin. The source samples have been tested and shown to be negative for anti-HIV 1 and 2 antibodies, anti-HCV antibody and HBs antigen. In addition, they have been found to be negative in a serologic test for syphilis. However, none of the currently known methods can absolutely guarantee that these products contain no transmissible pathogenic agent.

It is advisable to wear gloves and safety spectacles and handle samples of human origin with caution. All substrates that have come into contact with the samples are to be handled as potentially infectious products. Special protective measures, conditions for disposal and disinfection should be implemented in accordance with local regulations.

Do not use damaged or leaking reagents.

## STORAGE

The reagent must be stored between 2 and 8°C. Its performance is guaranteed in the method recommended from first use to the expiry date on the label. It must not be used beyond that date. It is advisable to minimize its time outside the refrigerator and to avoid leaving it at room temperature between two uses.

Do not freeze.

## REAGENTS AND MATERIAL NECESSARY

- Glass test tubes, 10 or 12 x 75 mm, tube rack.
- Stirrer-mixer.
- Opaline plate.
- Precision automatic adjustable pipettes.
- Centrifuge with a relative force of 100-1200 g.
- Blood samples with known phenotypes of group A, B, O, such as HEMA CQI (DIAGAST Ref. : cf. catalogue).

## SAMPLES – CONTROLS

### BLOOD SAMPLE TO BE TESTED

Blood collected in anticoagulant : EDTA, heparin or citrate, in a stoppered sterile tube stored between 2 and 8°C must be examined within 48 hours insofar as no sign of hemolysis is visible.

At the time of the test, centrifuge the blood sample at 1200 g for 3 minutes.

### BLOOD SAMPLES WITH KNOWN GROUP PHENOTYPES SUCH AS HEMA CQI

The analytical system must be validated using sets of samples with known phenotypes of group A, group B and group O.

Use of those samples or HEMA CQI enables detection of anomalies (handling, reagents, materials and environment) and implementation of corrective actions.

## PROCEDURE

### 1) PLATE TECHNIQUE AT ROOM TEMPERATURE (+ 18... + 25 °C)

- Gently shake each HEMATEST in order to homogenize the suspension.
- On a rigorously clean plate, using a vial dropper, apply 1 drop of each HEMATEST.
- Take 100 µL of test plasma and apply next to each drop of HEMATEST taking care not to create contact between the drops.
- Mix the plasma and HEMATEST using a spiral movement with the end of a stirrer in order to create a regular lozenge of diameter 2 to 3 cm.
- Hold the plate and give it a rolling movement for 3 minutes while macroscopically observing the possible appearance of agglutinates.
- Read the reactions immediately.

### 2) TUBE TECHNIQUE AT ROOM TEMPERATURE (+ 18... + 25 °C)

- Gently shake each HEMATEST in order to homogenize the suspension.
- Using the vial dropper, transfer 1 drop of each HEMATEST to each tube.
- Add 100 µL of plasma to each tube.
- Shake to homogenize the mixture.
- Centrifuge at 500 g for 1 minute.
- Macroscopically read the tubes while shaking gently to detach the red blood cell pellet.
- Note any appearance of agglutinates.

## INTERPRETATION

If agglutination occurs (the red blood cells form one or several clumps), the reaction is positive and the antibody corresponding to the HEMATEST is present in the test plasma.

If there is no agglutination (the red blood cells remain in homogeneous suspension), the reaction is negative and the corresponding antibody is not present in the test plasma.

The analytical system may be validated using samples of known phenotypes.

The ABO group of a subject can only be unambiguously determined if there is strict concordance between the results of the red blood cell test and those of the plasma test.

If there is discordance, do not report a result and pursue identification of the blood group in compliance with current recommendations and protocols or forward the sample to an expert laboratory.

The 'auto' control, 'allo' control and 'reagent' control, and the clinical context may help elucidate the anomaly.

'Auto' control : under the same conditions, test the subject's plasma vis-à-vis his own red blood cells.

'Allo' control : under the same conditions, test the subject's plasma vis-à-vis a panel of test known O red blood cells (detection of anti-erythrocytic antibodies other than anti-A or anti-B).

'Reagent' control : under the same conditions, test the subject's red blood cells vis-à-vis the negative control.

The use of HEMATEST A2 and O may evidence an anomaly in the plasma determination of ABO group.

## LIMITATIONS OF THE METHOD

Only qualified personnel should use the reagent.

It is imperative to use the calibrated dropper provided in the IVDMD vial to dispense a reagent drop.

The reactions must be read immediately after centrifuging and re-suspension.

It is imperative to work with clean equipment and non-contaminated products (bacterial or other contamination).

The following points must be scrupulously observed :

- storage conditions and expiry date,
- the procedures,
- calibration of recommended equipment.

## PERFORMANCE DATA

The red blood cell concentrates used in the preparation of HEMATEST are collected and controlled by the Etablissement Français du Sang (the French Blood Service) in compliance with current regulations for the qualification of those products for transfusion use and also in compliance with all French applicable texts issued by French competent authorities, particularly :

- the provisions of the decrees relating to Good Practices for the Preparation of labile blood products relating to Good Practices for donation qualification, amended by the current decrees ;
- the current decree relating to laboratory tests and screening tests for transmissible diseases effected on blood samples and their constituents.

A false-positive reaction may occur if the subject tested possesses clot agglutinins.

The intensity of the reactions obtained may depend on the anti-A and/or anti-B antibody levels of the test subject.

Weak or even negative reactions inducing a discordance between the red blood cell and plasma tests may be observed in neonates and immunocompromised subjects.



**DIAGAST** 251, AV. AVINEE - 59120 LOOS - FRANCE



[www.diagast.com](http://www.diagast.com)

key-code :

DIA00302

Revision date : JANUARY 2005

|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                           | Pour obtenir les notices dans la langue de votre choix :<br>For Instructions For Use in your language :<br>Para las instrucciones de uso en su idioma :<br>Para Instruções de Uso na sua língua :<br>Per le istruzioni di uso nella sua lingua :<br>Für Gebrauchsanleitungen in Ihrer Sprache :<br>Föð bruksanviningar pa ditt eget sprak :<br>For brugsanvisninger pa dit sprog : |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
| <b>http://</b>                                                                                                             | <a href="http://www.diagast.com">www.diagast.com</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
| <br><br><b>For<br/>European<br/>Union</b> | <br>Free                                                                                                                                                                                                                                                                                          | België - Belgique - България - Česká Republika - Danmark - Deutschland - Eesti - España - France - Ireland - Italia - Kypros - Latvija - Luxembourg – Magyarország - Nederland - Norge - Österreich - Polska - Portugal - Schweiz - Suisse - Suomi - Slovenija - Sverige - United Kingdom | +800 135 79 135     |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Ελλάδα                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 00800 161 2205 7799 |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Ísland                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 800 8996            |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Lietuva                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 8800 30728          |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | România                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0800 895 084        |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Slovensko                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0800 606 287        |
|                                                                                                                            | <br>Not free                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Liechtenstein                                                                                                                                                                                                                                                                             | +31 20 796 5692     |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Malta                                                                                                                                                                                                                                                                                     | +31 20 796 5693     |



|                       | NUORODA | PAKUOTĖS                                                                                               |
|-----------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HEMATEST A1, B        | 58950   | 1 buteliuko HEMATEST A1<br>1 buteliuko HEMATEST B                                                      |
| HEMATEST A1, A2, B, O | 51999   | 1 buteliuko HEMATEST A1<br>1 buteliuko HEMATEST A2<br>1 buteliuko HEMATEST B<br>1 buteliuko HEMATEST O |

## IVADAS

Šie reagentai yra žmogaus kilmės *in vitro* diagnostiniai medicinos prietaisai (IVDMD), skirti profesionaliam naudojimui. Jie yra skirti žmogaus biologinių mėginių analizei.

HEMATEST yra naudojamas plazmos ABO kraujo grupių nustatymui.

Atliekant eritrocitų antigenų raudonosiose kraujo ląstelėse tyrimą, HEMATEST suteikia galimybę aptikti atitinkamus antikūnus tyrimo plazmoje, naudojant lėkštelės arba mėgintuvėlio metodą.

## PRINCIPAS

Naudojant manualinę technologiją ant lėkštelės ar mėgintuvėlyje, hemagliutinacijos principas yra utilizuojamas. Raudonosios kraujo ląstelės, turinčios antigeną, agliutinoja esant tyrimo plazmai su atitinkamu antikūnu.

ABO grupių nustatymas yra charakterizuojamas antigenų A ir/ar B demonstravimu žmogaus raudonųjų kraujo ląstelių paviršiuje bei antikūnų anti-A ir/ar anti-B buvimu arba nebuvimu plazmoje.

Todėl identifikuojant eritrocitinius antigenus, reikia naudojant žinomus anti-A, anti-B ir anti-A,B reagentus (raudonųjų kraujo ląstelių tyrimas), tada patvirtinti pirmesnius rezultatus patikrinant atitinkamų antikūnų buvimą tiriamo kraujo plazmoje, naudojant HEMATEST A1, B, ir, jei įmanoma, HEMATEST A2 ir O (plazmos tyrimas).

## SUDĖTIS

HEMATEST yra paruošti iš žinomų A1 RH-1, B RH1, A2 RH1 ir O RH1 grupių žmogaus raudonųjų ląstelių mišinio. Raudonosios kraujo ląstelės yra ruošiamos 5% paruoštoje naudoti suspensijoje, saugojimo tirpale ir yra supakuotos 5mL buteliukuose su kalibruotais lašintuvais.

## ĮSPĖJIMAI

HEMATEST yra žmogaus kilmės. Buvo tirti pirminiai mėginiai ir davė neigiamus rezultatus dėl anti-HIV 1 ir 2 antikūnų, anti-HCV antikūno ir HBs antigeno. Be to, gauti rezultatai buvo neigiami atlikus serologinį tyrimą dėl sifilio. Tačiau nei vienas iš šiandien žinomų metodų negali absoliučiai garantuoti, kad šie produktai neturi užkrečiamo patogeninio agento.

Patartina dėvėti pirštines bei saugos akinius ir dirbant su žmogaus kilmės mėginiais labai atidžiai. Visi substratai, kurie kontaktavo su mėginiais, turi būti laikomi potencialiai infekciniais. Būtina paisyti specialių apsaugos priemonių, utilizavimo ir dezinfekavimo sąlygų bei vietinių reikalavimų.

Nenaudokite pažeistų ar tekančių reagentų.

## LAIKYMAS

Reagentai turi būti laikomi tarp 2 ir 8 °C. Veikimas yra garantuojamas naudojant rekomenduojamą metodą nuo pirmo naudojimo iki datos galiojimo pabaigos. Reagentai negali būti naudojami pasibaigus galiojimo datai. Patartina reagentus kuo mažiau laikyti ne šaldytuve ir nepalikti kambario temperatūroje tarp naudojimų.

## REIKALIGI REAGENTAI IR MEDŽIAGOS

- Stikliniai tyrimo mėgintuvėliai, 10 ar 12 x 75 mm, mėgintuvėlių stovas.
- Maišyklė – maišytuvas.
- Opalino lėkštelė.
- Preciziškos automatinės pritaikomos pipetės.
- Centrifuga su santykinė 100-1200g jėga.
- Kraujo mėginiai su žinomais A, B, O grupių fenotipais, tokiais kaip HEMA CQI (DIAGAST Kat.Nr.:žr.katalogą).

## MĖGINIAI – KONTROLĖS

### Tiriamas kraujo mėginys

Kraujas, surinktas su antikoagulantu: EDTA, heparinas ar citratas, laikomas steriliame mėgintuvėlyje prie 2 - 8°C, turi būti tiriamas per 48 valandas kol nebus matoma hemolizė.

Tyrimo metu, centrifuguokite kraujo mėginius prie 1200 g, 3 minutes.

### Kraujo mėginys su žinomos grupės fenotipais, tokiais kaip HEMA CQI

Analitinė sistema turi būti patvirtinta naudojant mėginių komplektus su žinomais grupės A, B ir O fenotipais.

Šių mėginių ar HEMA CQI naudojimas leidžia aptikti anomalijas (darbo, reagentų, medžiagų ir aplinkos) ir atlikti teisingus veiksmus.

## PROCEDŪRA

### 1) Lėkštelės technologija kambario temperatūroje (+18...+25 °C)

- Švelniai papurtykite kiekvieną HEMATEST, kad suspensija homogenizuotųsi,
- Ant griežtai švarios lėkštelės užlašinkite po 1 lašą kiekvieno HEMATEST, naudodami buteliuką su lašintuvu,
- Paėmę 100 µL tyrimo plazmos ir užlašinkite šalia kiekvieno HEMATEST lašo taip, kad lašai nesusiliestų,
- Sumaišykite plazmą su HEMATEST atlikdami spiralinį judesį maišymo lopetėle tam, kad sukurti taisyklingą 2-3 cm diametro apskritimą,
- Laikydami lėkštelę, sukite ją 3 minutes kol makroskopiškai pamatysite galimą agliutinaciją,
- Nedelsiant nuskaitykite reakcijas.

### 2) Mėgintuvėlio technologija kambario temperatūroje (+18...+25 °C)

- Švelniai papurtykite kiekvieną HEMATEST, kad suspensija homogenizuotųsi,
- Naudodami buteliuką su lašintuvu, perneškite 1 lašą kiekvieno HEMATEST į kiekvieną mėgintuvėlį,
- Įlašinkite 100 µL plazmos į kiekvieną mėgintuvėlį,
- Pakratykite, kad suspensija homogenizuotųsi,
- Centrifuguokite prie 500g, 1 minutę,
- Makroskopiškai nuskaitykite mėgintuvėlius švelniai papurtant, kad raudonojo kraujo ląstelės atsiskirtų,
- Pažiūrėkite, ar neatsirado agliutinacijos požymių.

## INTERPRETACIJA

Jei atsiranda agliutinacija (raudonosios kraujo ląstelės suformuoja vieną ar daugiau krešulių), reakcija yra teigiama, o antikūnas, atitinkantis HEMATEST, yra aptinkamas plazmoje.

Jei agliutinacijos nėra (raudonosios kraujo ląstelės išlieka homogeninėje suspensijoje), reakcija yra neigiama, o HEMATEST atitinkančio antikūno plazmoje nėra.

Analitinė sistema gali būti patvirtinta naudojant žinomų fenotipų mėginius.

Subjekto ABO grupė turi būti nustatyta nedviprasmiškai, jei yra griežtas atitikimas tarp raudonųjų kraujo ląstelių tyrimo rezultatų ir plazmos tyrimo rezultatų.

Jei yra neatitikimas, rezultato nefiksuokite ir atlikite kraujo grupės identifikavimą laikydamiesi esamų rekomendacijų ir protokolų, arba nusiųskite mėginį į ekspertų laboratoriją.

„Auto“ kontrolė, „allo“ kontrolė ir „reagent“ kontrolė bei klinikinis kontekstas gali padėti išaiškinti anomaliją.

„Auto“ kontrolė: tomis pačiomis sąlygomis subjekto plazma yra tirama su nuosavomis raudonosiomis kraujo ląstelėmis.

„Allo“ kontrolė: tomis pačiomis sąlygomis subjekto plazma yra tirama su žinomų O raudonųjų kraujo ląstelių paneliu (anti-eritrocitinių antikūnų, kitokių nei anti-A ar anti-B, aptikimas).

„Reagent“ kontrolė: tomis pačiomis sąlygomis subjekto plazma yra tirama su neigiama kontrole.

HEMATEST A2 ir O naudojimas gali pasireikšti anomalija ABO grupės nustatymo metu plazmoje.

## METODO APRIBOJIMAI

Reagentus gali naudoti tik kvalifikuotas personalas.

Yra būtina naudoti kalibruotąlašintuvą, tiekiamą IVDMD buteliuke, reagentųlašų dozavimui.

Reakcijos turi būti nuskaitymos nedelsiant po centrifugavimo ir pakartotinio praskiedimo.

Būtina dirbti su švaria įranga ir neužterštais produktais (bakterinis ar kitoks užterštumas).

Būtina atsižvelgti į šiuos dalykus:

- laikymo sąlygos ir galiojimo datos pabaiga,
- procedūros,
- rekomenduojamos įrangos kalibravimas.

## ATLIKIMO DUOMENYS

Raudonųjų kraujo ląstelių koncentratas, naudojamas HEMATEST paruošime, yra surenkamas ir kontroliuojamas Prancūzijos Kraujo Tarnybos (French Blood Service) ir atitinka esamas šių produktų perpylimo kvalifikacijos taisykles bei Prancūzijos taikomus įstatymus, leidžiamus Prancūzijos valdžios, ypačingai:

- įsakai, susiję su Gera Praktika dėl patikimų kraujo produktų paruošimo, dėl donacijų kvalifikacijos. Šių įsakų leidimas ir koregavimas;
- esami įsakai dėl laboratorinių tyrimų ir skrinimo tyrimų dėl užkrečiamų ligų, pernešamų per kraujo mėginius ir jų sudedamąsias dalis.

Klaidingai teigiama reakcija gali atsirasti tada, kai tiriamas subjektas turi krešulių agliutinino.

Reakcijos intensyvumas gali priklausyti nuo anti-A ir/ar anti-B antikūnų lygio tiriamame subjekte.

Silpnos ar neigiamos reakcijos, įskaičiuojant ir nesutapimą tarp raudonųjų kraujo ląstelių ir plazmos tyrimų, gali būti pastebėtos naujagimiuose ir subjektuose su užslopintu imuniniu atsaku.

Redagavimo data: 2005 m. sausio mėn.



**DIAGAST** 251, AV. AVINEE - 59120 LOOS – FRANCE



[www.diagast.com](http://www.diagast.com)  
key-code : DIA00302

LIETUVIŠKAI DIA00302



|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                           | Pour obtenir les notices dans la langue de votre choix :<br>For Instructions For Use in your language :<br>Para las instrucciones de uso en su idioma :<br>Para Instruções de Uso na sua língua :<br>Per le istruzioni di uso nella sua lingua :<br>Für Gebrauchsanleitungen in Ihrer Sprache :<br>För bruksanvisningar på ditt eget språk :<br>For brugsanvisninger på dit sprog : |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
| <a href="http://">http://</a>                                                                                              | <a href="http://www.diagast.com">www.diagast.com</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
| <br><br><b>For<br/>European<br/>Union</b> | <br>Free                                                                                                                                                                                                                                                                                           | België - Belgique - България - Česká Republika - Danmark - Deutschland - Eesti - España - France - Ireland - Italia - Kypros - Latvija - Luxembourg – Magyarország - Nederland - Norge - Österreich - Polska - Portugal - Schweiz - Suisse - Suomi - Slovenija - Sverige - United Kingdom | +800 135 79 135     |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ελλάδα                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 00800 161 2205 7799 |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ísland                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 800 8996            |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Lietuva                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 8800 30728          |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | România                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0800 895 084        |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Slovensko                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0800 606 287        |
|                                                                                                                            | <br>Not free                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Liechtenstein                                                                                                                                                                                                                                                                             | +31 20 796 5692     |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Malta                                                                                                                                                                                                                                                                                     | +31 20 796 5693     |

**ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2), ANTI-A,B (ABO3)  
ANTI-D (RH1) IgM I, ANTI-D (RH1) IgM II,  
ANTI-D (RH1) TOTEM, ANTI-D (RH1) IgG,  
ANTI-DCE (RH1,2,3), NEG CONTROL, GROUPAKIT**



## **INTRODUCTION**

These reagents are in vitro diagnostic medical devices (IVDMD) for professional use.

The ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2), ANTI-A,B (ABO3) are used in the red blood cell determination of blood ABO group. They enable determination of the presence of erythrocytic antigens A and/or B on the surface of human red blood cells.

The ANTI-D (RH1) IgM I, ANTI-D (RH1) IgM II, ANTI-D (RH1) TOTEM and ANTI-D (RH1) IgG are used for blood grouping. They enable the determination of the presence of antigen D (RH1) on the surface of human red blood cells.

ANTI-DCE (RH1,2,3) enable detection of the presence of at least one of erythrocytic antigens: D (RH1), C (RH2) and E (RH3).

The NEG CONTROL is used in blood ABO grouping. It is devoid of antibody activity. Tested under the same conditions as the reagent used, the control enables interpretation of the result obtained.

## **PRINCIPLE**

The manual technique employed, on a plate or in a tube, utilizes the principle of hemagglutination. Test red blood cells bearing an antigen agglutinate in the presence of the reagent containing the corresponding antibody:

- either in the direct hemagglutination method, when they come into contact with the reagent containing the antibody (type: IgM) ;
- or in the indirect hemagglutination method: antiglobulin test in the event of use of an IgG antibody. The reaction occurs in two stages: the test red blood cells are exposed to the IgG antibody. The antibodies bind to the red blood cells carrying the corresponding antigen. After washing, addition of antiglobulin "AGH MAESTRIA IGG" induces agglutination of the sensitized red blood cells carrying the corresponding antigen.

ABO group determination is defined by both the demonstration of antigens A and/or B on the surface of human red blood cells and by the presence or absence of anti-A and/or anti-B antibodies in the plasma. It is therefore appropriate to identify the erythrocytic antigens using known anti-A, anti-B and anti-A,B reagents (red blood cell test), then to confirm the preceding results by verifying the presence of the corresponding antibodies in the plasma from the test blood using known red blood cells A1, B and, possibly, A2 and O (plasma test).

For blood RH1 grouping, the use of ANTI-D reagent (RH1) and NEG CONTROL reagent is necessary.

## **COMPOSITION**

The reagents are prepared from monoclonal antibodies in a storage medium. The monoclonal antibodies produced by DIAGAST are derived from the supernatants of in vitro cultures of hybridomas of murine or human origin.

These reagents contain sodium azide (< 0.1 %), sodium arsenite (0.02 %) and bovine albumin.

The reagents are packaged in vials fitted with a calibrated dropper and are also included in the GROUPAKIT kit.

The **GROUPAKIT** kit (Ref. DIAGAST **70888**) consists of a vial of ANTI-A (ABO1), a vial of ANTI-B (ABO2), a vial of ANTI-A,B (ABO3), a vial of ANTI-D (RH1) IgM I and a vial of NEG CONTROL.

The **NEG CONTROL** produced by DIAGAST is devoid of antibodies.

**Refer to the last page for a description of the reagents.**

## **PRECAUTIONS**

It is advisable to wear gloves and safety spectacles and handle test samples of human origin with caution. All substrates that have come into contact with the samples are to be handled as potentially infectious products. Special protective measures, conditions for disposal and disinfection should be implemented in accordance with local regulations.

Do not use damaged or leaking reagents.

## **STORAGE**

The reagents must be stored between + 2 °C and + 8 °C. Their performance is guaranteed in the method recommended from first use to the expiry date indicated on the label. It must not be used beyond that date. It is advisable to minimize its time outside the refrigerator and to avoid leaving it at room temperature between two uses.

## REAGENTS AND MATERIAL NECESSARY

- Isotonic saline solution (0.9 % NaCl).
- Incubator or water-bath at 37°C.
- Glass test tubes, 10 or 12 x 75 mm, tube rack.
- Mechanical stirrer.
- Opaline plate.
- Precision automatic adjustable pipettes.
- Centrifuge with a relative force of 100-1200 g.
- Control blood samples of known phenotypes such as HEMA CQI (DIAGAST ref.: see the catalogue).
- 'AGH MAESTRIA IGG' antiglobulins (DIAGAST ref.: see the catalogue).
- IgG-sensitized red blood.
- Partial D identification kit for research use: D-SCREEN (DIAGAST ref.: see the catalogue).

## SAMPLES – CONTROLS

### Blood samples to be tested

Blood collected in anticoagulant: EDTA, heparin or citrate in a stoppered sterile tube, stored between 2 and 8°C, must be examined within 48 hours, insofar as no sign of hemolysis is visible.

At the time of the test, centrifuge the blood sample at 1200 g for 3 minutes.

### Blood samples with known phenotypes: HEMA CQI

The analytical system must be validated using samples with known phenotypes:

- a sample possessing the antigen corresponding to the antibody in the reagent used,
- a sample devoid of the antigen corresponding to the antibody in the reagent used.

The use of those samples or HEMA CQI enables detection of anomalies (handling, reagents, apparatus and environment) and implementation of corrective actions.

### Reagent control

For each sample, in RH1 group determination, a control reagent is tested under the same conditions by replacing ANTI-D (RH1) by **NEG CONTROL**.

In the event of an anomaly in blood ABO group determination, a control reagent is tested under the same conditions by replacing the ABO grouping reagent by **NEG CONTROL**.

## PROCEDURE

### a) Plate technique at room temperature (+ 18... + 25 °C) except for ANTI-D (RH1) IgG

- On a rigorously clean plate, using the vial dropper, apply 1 drop of reagent.
- Take 25 µL of unwashed cell pellet and apply next to each drop of reagent, taking care not to create contact between the drops.
- Mix the blood and reagent using a spiral movement with the end of the stirrer so as to create a regular lozenge of diameter 2 to 3 cm.
- Incubate the plate at room temperature and without stirring for 30 seconds.
- Hold the plate and give it a rolling movement for 3 minutes while macroscopically observing the possible appearance of agglutinates.
- Read the reaction immediately.

### b) Direct method in a tube at room temperature except for ANTI-D (RH1) IgG

- Prepare a 5 % suspension of red blood cells in isotonic saline solution.
- Using the vial dropper, transfer a drop of reagent to a tube.
- Add 50 µL of red blood cell suspension.
- Shake to homogenize the mixture, then centrifuge at 500 g for 1 minute.
- Read macroscopically while gently shaking the tubes so as to detach the red blood cell pellet.
- Note the appearance of any agglutinates.

### c) Antiglobulin indirect method for ANTI-D (RH1) TOTEM only

- After immediately centrifuging and reading as above, if the reaction is weak or negative, shake the tubes and incubate at 37 °C for 15 minutes.
- Wash the red blood cells twice with isotonic saline solution and discard the last washing liquid.
- Add 50 µL of "AGH MAESTRIA IGG" antiglobulin to the red blood cell pellet. Mix, then centrifuge at 120 g for 1 minute.
- Conduct reading as indicated in section b).

#### d) Antiglobulin indirect method for ANTI-D (RH1) IgG only

- Prepare a 5 % suspension red blood cells in isotonic saline solution.
- Using the vial dropper, transfer 1 drop of reagent to a tube.
- Add 50 µL of red blood cell suspension.
- Shake the tubes to homogenize the mixture and incubate at 37 °C for 15 minutes.
- Wash the red blood cells twice with isotonic saline solution and discard the last washing liquid.
- Add 50 µL of "AGH MAESTRIA IGG" antiglobulin to the red blood cell pellet. Mix, then centrifuge at 120 g for 1 minute.
- Conduct reading as indicated in section b).

### INTERPRETATION

- If there is agglutination (the red blood cells form one or several clumps), the reaction is positive and the antigen or at least one of the antigens corresponding to the reagent used is present on the red blood cells tested. If there is no agglutination (the red blood cells reform a homogeneous suspension), the reaction is negative and the antigen is not present on the red blood cells.
- The ABO group of a subject can only unambiguously be determined if there is strict concordance between the results of the red blood cell test and those of the plasma test.  
If there is discordance, do not report the result and pursue blood group identification in compliance with current recommendations and protocols or forward the sample to an expert laboratory.  
The "auto" control, "allo" control and "reagent" control, and the clinical context may help elucidate the anomaly.  
"Auto" control: under the same conditions, test the subject's plasma *vis-à-vis* his own red blood cells.  
"Allo" control: under the same conditions, test the subject's plasma *vis-à-vis* a panel of test known O red blood cells (detection of anti-erythrocytic antibodies other than anti-A or anti-B).  
"Reagent" control: under the same conditions, test the subject's red blood cells *vis-à-vis* the negative control.
- With the direct hemagglutination method on a plate or in a tube: if there is agglutination with ANTI-D (RH1) IgM or TOTEM, antigen D is present. If there is no agglutination, it is possible to use ANTI-D (RH1) TOTEM or ANTI-D (RH1) IgG in an indirect antiglobulin test if weak and/or partial antigens D are to be detected.
- A negative reaction obtained in an indirect antiglobulin test can be validated with IgG-sensitized red blood cells (cf. leaflet for the corresponding reagent).
- The reaction is only interpretable if:
  - the reagent control using the NEG CONTROL is negative,
  - the analytical system is validated using samples with known phenotypes.
- Furthermore, the reaction in indirect antiglobulin test is interpretable only if the direct antiglobulin test on the test red blood cells is negative.

### LIMITATIONS OF THE METHOD

- Only qualified personnel should use the reagent.
- It is imperative to use the calibrated dropper provided in the IVDMD vial to dispense a reagent drop.
- The reactions must be read immediately after centrifuging and resuspending.
- It is imperative to work with clean equipment and non-contaminated products (bacterial or other contamination).
- The following points must be scrupulously observed:
  - storage conditions and expiry date,
  - procedures,
  - calibration of the recommended equipment.
- Weak phenotypes A and/or B may not be detected by the plate method since it is less sensitive than the tube method. In consequence, in the event of discordance between the red blood cell test and plasma test and since a weak phenotype may be present, the test should be repeated with the more sensitive method.
- It is imperative to use AGH MAESTRIA IGG for the indirect antiglobulin test.
- It is imperative to use NEG CONTROL as the negative control.
- ANTI-D (RH1) must not be used in methods involving enzymatic treatment of the red blood cells.
- ANTI-D (RH1) IgM cannot be used in the indirect antiglobulin test.
- Certain discordances (negative reaction for the direct hemagglutination method and positive reaction for the indirect antiglobulin method) may occur with ANTI-D (RH1) TOTEM. A weak and/or partial antigen D may be present.
- A false-positive reaction may occur:
  - when the reagent is used for the direct hemagglutination method with a subject who has cold agglutinins,
  - when the reagent is used in the indirect antiglobulin test with the red blood cells which present a positive reaction in the direct antiglobulin test.

These possibilities constitute the rationale for concomitant use of NEG CONTROL.

## PERFORMANCE DATA

- In the recommended methods, these reagents comply with the Common Technical Specifications of IVDMD.
- A performance assessment of ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2) and ANTI-A,B (ABO3) was conducted on over 15,000 all-comer samples (blood donors, patients and neonates) drawn on each of the recommended anticoagulants (EDTA, heparin, citrate). The assessment demonstrated 100 % specificity of each of the reagents versus the expected results vis-à-vis common known phenotypes A1, A2, A1B, A2B, B and O.  
The tests conducted on particular red blood cells of weak phenotype ABO showed good specificity vis-à-vis phenotypes A3 and B3.
- ANTI-A,B (ABO3) recognizes red blood cells Ax.
- ANTI-B (ABO2) does not agglutinate the "acquired B" red blood cells tested.
- In certain cases (transfusion recipients, certain weak phenotypes A or B (A3, B3...), certain hemopathological modifications, mosaics or chimeras, etc.), an image of a double population may be observed.
- Antibody ANTI-A and, accessorially, antibody ANTI-A,B yield a cross-reaction with antigen Tn which gives rise to an image of a double population (exceptional phenomenon).
- A performance assessment of ANTI-D (RH1) IgM I, IgM II, IgG, TOTEM and ANTI-DCE (RH1,2,3) was conducted on a panel of 1,000 to 200,000 all-comer samples (blood donors, patients and neonates). The samples were collected on each of the recommended anticoagulants (EDTA, heparin, citrate). The assessment demonstrated 100 % specificity of each of the reagents versus the expected results vis-à-vis known common Rhesus phenotypes.
- The intensity of the reactions obtained with ANTI-D (RH1) IgM may depend on the number of antigen sites present on the red blood cells.
- ANTI-D (RH1) TOTEM and ANTI-D (RH1) IgG enable screening for weak red blood cells D (RH1) in the indirect hemagglutination method with antiglobulin.
- The tests conducted on particular phenotypes, while satisfactory, cannot ensure recognition of all weak or variant subjects, due to the variability of antigen motifs.
- ANTI-D (RH1) IgM I and TOTEM have the special feature of recognizing certain rare antigen motives of type RH33 (DHar) and may thus yield discordant reactions with polyclonal reagents that recognize them little or not at all.
- Only ANTI-D (RH1) TOTEM may enable detection of D partial DVI in the tube direct hemagglutination method.
- In addition, the clones of ANTI-D may specifically recognize certain epitopes of antigen D (cf. table on the last page).
- In general, for the identification of partial D, the use of the D-SCREEN kit is recommended.

## BIBLIOGRAPHY

- BETREMIEUX C., BEOLET M., KEYSER L.  
A new strategy for D phenotyping with TOTEM<sup>®</sup> multimonoclonal ANTI-D reagent, XXIII rd I.S.B.T. Congress, July 1994.
- ARAMBURU E., RABASA P., ESQUIROZ R., GALARRETA T., OLCOS B.  
Valoracion de un antisuero anti-D IgM-IgG monoclonal (DIAGAST) en donantes de sangre con expresividad debil del antigeno D. Hematology Congress, Madrid, October 1990.
- MANNESSIER L. Blood Transfusion Centre, Lille, France. The use of monoclonal antibodies as blood grouping reagents: applications, advantages and problems. Congress of the Italian society for blood transfusion, Rome, June 1992.

| REAGENT             |             | REFERENCE | CLONE                                         | TYPE                     | ORIGIN |
|---------------------|-------------|-----------|-----------------------------------------------|--------------------------|--------|
| ANTI-A (ABO1)       | 5 x 10 ml   | 70501     | 9113D10                                       | IgM                      | Murine |
|                     | 100 x 10 ml | 70540     |                                               |                          |        |
| ANTI-B (ABO2)       | 5 x 10 ml   | 70502     | 9621A8                                        | IgM                      | Murine |
|                     | 100 x 10 ml | 70541     |                                               |                          |        |
| ANTI-A,B (ABO3)     | 5 x 10 ml   | 70503     | 9113D10 + 152D12                              | IgM                      | Murine |
|                     | 100 x 10 ml | 70542     |                                               |                          |        |
| ANTI-D (RH1) IgM I  | 5 x 10 ml   | 71000     | P3X61                                         | IgM                      | Human  |
|                     | 100 x 10 ml | 70543     |                                               |                          |        |
| ANTI-D (RH1) IgM II | 5 x 10 ml   | 71005     | HM10                                          | IgM                      | Human  |
| ANTI-D (RH1) TOTEM  | 5 x 10 ml   | 71010     | P3X61 +<br>P3X21223B10 +<br>P3X290 +<br>P3X35 | IgM<br>IgM<br>IgG<br>IgG | Human  |
|                     | 100 x 10 ml | 70544     |                                               |                          |        |
| ANTI-D (RH1) IgG    | 5 x 10 ml   | 71020     | HM16                                          | IgG                      | Human  |
| ANTI-DCE (RH1,2,3)  | 5 x 5 ml    | 74111     | P3X61 +<br>P3X25513G8 +<br>P3X234             | IgM                      | Human  |
| NEG CONTROL         | 5 x 10 ml   | 79000     |                                               |                          |        |
|                     | 100 x 10 ml | 70545     |                                               |                          |        |

| Clones      | Type | DII | DIIIa<br>DIIIb<br>DIIIc | DIVa | DIVb | DVa | DVI | DVII | DFR | DBT | DHAR | DHMi |
|-------------|------|-----|-------------------------|------|------|-----|-----|------|-----|-----|------|------|
| P3X61       | IgM  | +   | +                       | +    | +    | +   | —   | +    | +/- | +   | +    | +    |
| HM10        | IgM  | +   | +                       | +    | +    | +   | —   | +    | —   | +   | —    | +    |
| HM16        | IgG  | +   | +                       | +    | +    | +   | —   | +    | —   | +   | +    | +    |
| P3X21223B10 | IgM  | —   | +                       | —    | —    | +   | +   | +    | +   | —   | —    | +    |
| P3X290      | IgG  | +   | +                       | +/-  | —    | +   | +/- | +    | +   | —   | —    | +    |
| P3X35       | IgG  | +   | +                       | +    | +    | —   | —   | +    | —   | —   | —    | +    |

+

 indicates a positive result whose intensity may vary as a function of the number of antigen sites present on the test red blood cells.

+/-

 indicates that a positive or negative result may be obtained. The result depends on the antigenicity.


 **DIAGAST** 251, AV. AVINEE - 59120 LOOS – FRANCE



www.diagast.com  
key-code : DIA00104

Revision date: June 2013

ENGLISH DIA00104

|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                           | Pour obtenir les notices dans la langue de votre choix :<br>For Instructions For Use in your language :<br>Para las instrucciones de uso en su idioma :<br>Para Instruções de Uso na sua língua :<br>Per le istruzioni di uso nella sua lingua :<br>Für Gebrauchsanleitungen in Ihrer Sprache :<br>För bruksanvisningar på ditt eget språk :<br>For brugsanvisninger på dit sprog : |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
| <b>http://</b>                                                                                                             | <a href="http://www.diagast.com">www.diagast.com</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
| <br><br><b>For<br/>European<br/>Union</b> | <br>Free                                                                                                                                                                                                                                                                                           | België - Belgique - България - Česká Republika - Danmark - Deutschland - Eesti - España - France - Ireland - Italia - Kypros - Latvija - Luxembourg - Magyarország - Nederland - Norge - Österreich - Polska - Portugal - Schweiz - Suisse - Suomi - Slovenija - Sverige - United Kingdom | +800 135 79 135     |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ελλάδα                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 00800 161 2205 7799 |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ísland                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 800 8996            |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Lietuva                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 8800 30728          |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | România                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0800 895 084        |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Slovensko                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0800 606 287        |
|                                                                                                                            | <br>Not free                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Liechtenstein                                                                                                                                                                                                                                                                             | +31 20 796 5692     |
|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Malta                                                                                                                                                                                                                                                                                     | +31 20 796 5693     |



**ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2), ANTI-A,B (ABO3)  
ANTI-D (RH1) IgM I, ANTI-D (RH1) IgM II,  
ANTI-D (RH1) TOTEM, ANTI-D (RH1) IgG,  
ANTI-DCE (RH1,2,3), NEG CONTROL, GROUPAKIT**



## **IVADAS**

Šie reagentai yra in vitro diagnostinės medicinos priemonės (IVDMD), skirtos profesionaliam naudojimui. ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2), ANTI-A,B (ABO3) yra naudojami eritrocitų nustatymui ABO kraujo grupei. Šie reagentai leidžia nustatyti eritrocitinių A ir/ar B antigenų buvimą ant žmogaus eritrocitų paviršiaus. ANTI-D (RH1) IgM I, ANTI-D (RH1) IgM II, ANTI-D (RH1) TOTEM ir ANTI-D (RH1) IgG yra naudojami kraujo grupių nustatymui. Šie reagentai leidžia nustatyti D (RH1) antigeno buvimą ant žmogaus eritrocitų paviršiaus. ANTI-DCE (RH1,2,3) leidžia aptikti bent vieno iš šių eritrocitinių antigenų buvimą: D (RH1), C (RH2) ir E (RH3). NEG CONTROL yra naudojama atliekant ABO kraujo grupių nustatymą. Šiame reagente nėra antikūnų aktyvumo. Tiriant tomis pačiomis sąlygomis kaip ir naudojamas reagentas, kontrolė leidžia gauti rezultato interpretaciją.

## **PRINCIPAS**

Naudojant manualinę technologiją ant lėkštelės arba mėgintuvėlyje, yra naudojamas hemagliutinacijos principas. Tiriami eritrocitai su antigenais agliutinuojami esant reagentui su atitinkamais antikūnais:

- Tiesioginės hemagliutinacijos metode, susidūrus su reagentu, turinčiu antikūną (tipas: IgM) ;
- Netiesioginės hemagliutinacijos metodas: antiglobulino tyrimas naudojant IgG antikūną. Reakcija vyksta dviem etapais: eritrocitai yra paveikiami IgG antikūnų. Antikūnai susiriša su eritrocitais, pernešančiais atitinkamą antigeną. Po praplovimo, įdėjus antiglobulino "AGH MAESTRIA IGG" įvyksta sensitizuotų eritrocitų su atitinkamais antigenais agliutinacija.

ABO grupių nustatymas remiasi abiem veiksniais: A ir/ar B antigenų buvimu ant žmogaus eritrocitų paviršiaus bei anti-A ir/ar anti-B antikūnų buvimu arba nebuvimu plazmoje. Štai kodėl reikia identifikuoti eritrocitinius antigenus naudojant žinomus anti-A, anti-B ir anti-A,B reagentus (eritrocitų tyrimas), o tada patvirtinti pirminius rezultatus atsižvelgiant į atitinkamų antikūnų buvimą plazmoje, kurie buvo tirti naudojant žinomus eritrocitus A1, B ir, galbūt, A2 ir O (plazmos tyrimas).

Atliekant RH1 grupės nustatymą, būtina naudoti ANTI-D reagentą (RH1) ir NEG CONTROL reagentą.

## **SUDĖTIS**

Reagentai yra paruošti iš monokloninių antikūnų laikymo terpėje. DIAGAST pateikiami monokloniniai antikūnai yra gauti iš pelės ar žmogaus kilmės hibridomos in vitro kultūrų supernatantų.

Šių reagentų sudėtyje yra natrio azido (< 0.1 %), natrio arsenito (0.02 %) ir jaučio albumino.

Reagentai yra pateikiami buteliukuose su kalibruotais lašintuvais ir taipogi yra GROUPAKIT rinkinio dalis.

**GROUPAKIT** rinkinyje (Kat.Nr. DIAGAST **70888**) yra ANTI-A (ABO1) buteliukas, ANTI-B (ABO2) buteliukas, ANTI-A,B (ABO3) buteliukas, ANTI-D (RH1) IgM I buteliukas ir NEG CONTROL buteliukas.

DIAGAST tiekiamo **NEG CONTROL** sudėtyje nėra antikūnų.

**Reagentų aprašymą rasite paskutiniame lape.**

## **ATSARGUMO PRIEMONĖS**

Rekomenduojama dėvėti apsaugines pirštines bei akinius ir su žmogaus kilmės mėginiais dirbti laikantis visų atsargumo priemonių. Visi substratai, turėję kontaktą su mėginiais, turi būti laikomi potencialiai infekciniais produktais. Pagal vietinius reikalavimus turi būti laikomasi specialių saugos priemonių, išmetimo ir dezinfekcijos sąlygų.

Nenaudokite pažeistų ar tekančių reagentų.

## **LAIKYMAS**

Reagentai turi būti laikomi prie + 2 °C - + 8 °C. Tinkami naudoti nuo pirmojo atidarymo iki galiojimo datos pabaigos. Nenaudokite pasibaigus galiojimo datai. Kiek galima mažiau laikykite išėmę iš šaldytuvo ir venkite palikti kambario temperatūroje kai nenaudojate.



## REIKALINGOS MEDŽIAGOS IR REAGENTAI

- Izotoninis tirpalas (0.9 % NaCl).
- Inkubatorius arba vandens vonelė su 37°C.
- Stikliniai tyrimo mėgintuvėliai, 10 ar 12 x 75 mm, mėgintuvėlių stovas.
- Mechaninis maišytuvas.
- Permatoma lėkštelė.
- Tikslūs automatiškai nustatomi dozatoriai.
- Centrifuga su 100-1200 g santykine jėga.
- Kontrolinio kraujo mėginiai su žinomais fenotipais, tokiais kaip HEMA CQI (DIAGAST: žr. katalogą).
- 'AGH MAESTRIA IGG' antiglobulinai (DIAGAST: žr. katalogą).
- IgG-sensitizuoti eritrocitai.
- Dalinės D identifikacijos rinkinys moksliniams tyrimams: D-SCREEN (DIAGAST: žr. katalogą).

## MĖGINIAI – KONTROLĖS

### Tiriami kraujo mėginiai

Kraujas surinktas su antikoagulantu: EDTA, heparinas ar citratas užkimštame steriliame mėgintuvėlyje, laikomame prie 2 - 8°C, turi būti tiriamas per 48 valandas, su sąlyga, kad nesimato hemolizės ženklų.

Tyrimo metu centrifuguokite kraujo mėginį 3 minutes prie 1200 g.

### Kraujo mėginiai su žinomais fenotipais: HEMA CQI

Analitinė sistema turi būti patvirtinta naudojant mėginius su žinomais fenotipais:

- mėginys su antigenu, atitinkančiu naudojamą reagento antikūną,
- mėginys be antigeno, atitinkančio naudojamą reagento antikūną.

Šių mėginių arba HEMA CQI naudojimas leidžia aptikti anomalijas (naudojimo, reagentų, aparato ir aplinkos) ir parinkti tinkamus korekcinis veiksmus.

### Reagentų kontrolė

Kiekvienam mėginiui atliekant RH1 grupių nustatymą, tomis pačiomis sąlygomis yra tiriamas kontrolės reagentas ANTI-D (RH1) pakeičiant j **NEG CONTROL**.

ABO grupių nustatymo anomalijos atveju, kontrolės reagentas yra tiriamas tomis pačiomis sąlygomis ABO grupių nustatymo reagentą pakeičiant j **NEG CONTROL**.

## PROCEDŪRA

### a) Lėkštelės technologija kambario temperatūroje (+ 18... + 25 °C) išskyrus ANTI-D (RH1) IgG

- Naudodamiesi buteliuku su lašintuvu, ant griežtai švarios lėkštelės užlašinkite 1 lašą reagento.
- Paėmę 25 µL praplautų ląstelių suspensijos užlašinkite po vieną lašą šalia reagento taip, kad lašai nesusiliestų.
- Sumaišykite kraują ir reagentą atlikdami spiralinį judesį maišymo lopetėle tam, kad sukurti taisyklingą 2-3 cm diametro apskritimą,
- Lėkštelę inkubuokite kambario temperatūroje nemaišant 30 sekundžių.
- Laikydami lėkštelę, atlikite sukamuosius judesius 3 minutes kol makroskopiškai pamatysite galimą agliutinaciją.
- Nedelsiant nuskaitykite reakciją.

### b) Tiesioginis metodas mėgintuvėlyje kambario temperatūroje, išskyrus ANTI-D (RH1) IgG

- Paruoškite 5 % eritrocitų suspensiją izotoniniame tirpale.
- Naudodamiesi buteliuku su lašintuvu, perneškite lašą reagento į mėgintuvėlį.
- Pridėkite 50 µL eritrocitų suspensijos.
- Papurtykite, kad mišinys homogenizuotųsi ir centrifuguokite 1 minutę prie 500 g.
- Švelniai purtydami mėgintuvėlį, kad atskirtumėte eritrocitų suspensiją, makroskopiškai nuskaitykite reakciją.
- Stebėkite, ar nėra agliutinatų.

### c) Antiglobulino netiesioginis metodas, skirtas tik ANTI-D (RH1) TOTEM

- Jei po aukščiau aprašyto centrifugavimo ir nuskaitymo reakcija yra silpna arba neigiama, papurtykite mėgintuvėlį ir 15 minučių inkubuokite prie 37 °C.
- Du kartus praplaukite ląsteles izotoniniu tirpalu ir išpilkite paskutinio praplovimo skystį.
- Įdėkite 50 µL "AGH MAESTRIA IGG" antiglobulino į eritrocitų suspensiją. Išmaišykite ir centrifuguokite 1 minutę prie 120 g.
- Nuskaitymą atlikite kaip aprašyta skyriuje b).

#### d) Antiglobulino netiesioginis metodas, skirtas tik ANTI-D (RH1) IgG

- Paruoškite 5 % eritrocitų suspensiją izotoniniame tirpale.
- Naudodamiesi buteliuku su lašintuvu, perneškite 1 lašą reagento į mėgintuvėlį.
- Pridėkite 50 µL eritrocitų suspensijos.
- Papurtykite, kad mišinys homogenizuotųsi ir inkubuokite 15 minučių prie 37 °C.
- Du kartus praplaukite ląsteles izotoniniu tirpalu ir išpilkite paskutinio praplovimo skystį.
- Įdėkite 50 µL "AGH MAESTRIA IGG" antiglobulino į eritrocitų suspensiją. Išmaišykite ir centrifuguokite 1 minutę prie 120 g.
- Nuskaitymą atlikite kaip aprašyta skyriuje b).

### INTERPRETACIJA

- Jei yra agliutinacija (eritrocitai suformuoja vieną ar daugiau krešulių), reakcija yra teigiama ir antigenas ar mažiausiai vienas iš antigenų, atitinkamai reaguojančių su naudojamu reagentu, yra ant tiriamųjų eritrocitų. Jei agliutinacijos nėra (eritrocitai suformuoja homogeninę suspensiją), reakcija yra neigiama ir antigeno nėra ant eritrocitų.
- ABO grupių nustatymas subjektui turi būti nustatomas vienareikšmiškai ir tik tada, kai eritrocitų tyrimo rezultatai ir plazmos tyrimo rezultatai griežtai sutampa.  
Jei tarp šių tyrimų yra neatitikimas, nefiksuokite rezultato, o atlikite kraujo grupės identifikaciją pagal esamas rekomendacijas ir protokolus arba siųskite mėginį į ekspertų laboratoriją.  
"Auto" kontrolė, "allo" kontrolė ir "reagent" kontrolė bei klinikinis kontekstas gali padėti aptikti ir paaiškinti anomalijas.  
"Auto" kontrolė: esant toms pačioms sąlygoms, tirkite subjekto plazmą *vis-à-vis* jo paties eritrocitus.  
"Allo" kontrolė: esant toms pačioms sąlygoms, tirkite subjekto plazmą *vis-à-vis* žinomo O panelio eritrocitus (anti-eritrocitinių antikūnų, kitų nei anti-A ar anti-B, aptikimas).  
"Reagent" kontrolė: esant toms pačioms sąlygoms, tirkite subjekto eritrocitus *vis-à-vis* neigiamą kontrolę.
- Naudojant tiesioginį hemagliutinacijos metodą ant lėkštelės ar mėgintuvėlyje: jei atsiranda agliutinacija su ANTI-D (RH1) IgM ar TOTEM, mėginyje yra antigenas D. Jei agliutinacijos nėra, galima naudoti ANTI-D (RH1) TOTEM ar ANTI-D (RH1) IgG netiesioginiame antiglobulino tyrime, jei yra tikimasi aptikti silpnus ir/ar dalinius antigenus D.
- Neigiama reakcija, gauta netiesioginiame antiglobulino tyrime, gali būti patvirtinama su IgG-sensitizuotais eritrocitais (žr. Atitinkamo reagento informacinis lapelis).
- Reakcija yra interpretuojama tik tada, jei:
  - Naudojama reagento kontrolė NEG CONTROL yra neigiama,
  - Analitinė sistema yra patvirtinta naudojant mėginius su žinomais fenotipais.
- Be to, reakcija netiesioginiame antiglobulino tyrime yra interpretuojama tik tada, jei tiesioginio antiglobulino tyrimas eritrocitams yra neigiamas.

### METODO APRIBOJIMAI

- Reagentus gali naudoti tik kvalifikuotas personalas.
  - Privaloma naudoti kalibruotus lašintuvus, tiekiamus IVDMD buteliuke, skirtus reagentų pilstymui.
  - Reakcijos turi būti nuskaitymos nedelsiant po centrifugavimo ir suspendavimo.
  - Būtina naudoti tik švarią įrangą ir neužterštus produktus (be bakterinio ar kitokio užterštumo).
  - Turi būti skrupulingai laikomasi ir atsižvelgiama į:
    - laikymo sąlygas galiojimo datą,
    - procedūras,
    - rekomenduojamos įrangos kalibravimą.
  - Silpni A ir/ar B fenotipai gali būti neaptinkami lėkštelės metodu, kadangi šis metodas yra mažiau jautrus nei mėgintuvėlio metodas. Rezultatų tarp eritrocitų ir plazmos tyrimų neatitikimo atveju, tyrimas turi būti kartojamas naudojant jautresnį metodą.
  - Privaloma naudoti AGH MAESTRIA IGG netiesioginiame antiglobulino tyrime.
  - Privaloma naudoti NEG CONTROL kaip neigiamą kontrolę.
  - ANTI-D (RH1) negali būti naudojamas metoduose, kuriuose yra atliekamas fermentinis eritrocitų apdorojimas.
  - ANTI-D (RH1) IgM negali būti naudojamas netiesioginiame antiglobulino tyrime.
  - Tam tikri neatitikimai (neigiama reakcija tiesioginiame hemagliutinacijos metode ir teigiama reakcija netiesioginiame antiglobulino tyrime) gali atsirasti su ANTI-D (RH1) TOTEM. Mėginyje gali būti silpnas ir/ar dalinis antigenas D.
  - Klaidingai teigiama reakcija gali atsirasti kai:
    - reagentas yra naudojamas tiesioginiame hemagliutinacijos tyrime subjektui, kuris turi silpnus agliutininus,
    - reagentas yra naudojamas netiesioginiame antiglobulino tyrime su eritrocitais, kurie sukelia teigiamą reakciją tiesioginio antiglobulino tyrime.
- Šie atvejai yra priežastys, dėl kurių būtina naudoti NEG CONTROL.

## CHARAKTERISTIKA

- Rekomenduojamuose metoduose šie reagentai atitinka IVDMD bendrąsias technines specifikacijas.
- ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2) ir ANTI-A,B (ABO3) atlikimo įvertinimas buvo atliekamas su daugiau nei 15,000 mėginių (kraujo donorai, pacientai ir naujagimiai), kurie buvo surinkti su rekomenduojamais antikoagulantais (EDTA, heparinas, citratas). Vertinimas parodė 100 % reagentų specifiškumą prieš tikėtinus rezultatus vis-à-vis bendrai žinomus fenotipus A1, A2, A1B, A2B, B ir O.  
Tyrimai, atlikti su silpno fenotipo ABO eritrocitais, parodė gerą specifiškumą vis-à-vis fenotipus A3 ir B3.
- ANTI-A,B (ABO3) atpažįsta eritrocitus Ax.
- ANTI-B (ABO2) neagliutinoja tiriamų "įgytų B" eritrocitų.
- Tam tikrais atvejais (transfuzijos recipientai, tam tikri silpni fenotipai A ar B (A3, B3...), tam tikros hemopatologinės modifikacijos, *mosaics* ar *chimeras*, ir t.t.), gali būti pastebimas dvigubos populiacijos vaizdas.
- Antikūnas ANTI-A ir, papildomai, antikūnas ANTI-A,B sukelia kryžminę reakciją su antigenu Tn, kuris sustiprina dvigubo populiacijos vaizdą (išskirtinis fenomenas).
- ANTI-D (RH1) IgM I, IgM II, IgG, TOTEM ir ANTI-DCE (RH1,2,3) atlikimo vertinimas buvo atliekamas naudojant 1,000 - 200,000 mėginių panelį (kraujo donorai, pacientai ir naujagimiai). Mėginiai buvo surinkti su rekomenduojamais antikoagulantais (EDTA, heparinas, citratas). Vertinimas parodė 100 % reagentų specifiškumą prieš vis-à-vis žinomus Rhesus fenotipus.
- Reakcijų, gautų su ANTI-D (RH1) IgM, intensyvumas gali priklausyti nuo esamų antigenų vietų skaičiaus ant eritrocitų.
- ANTI-D (RH1) TOTEM ir ANTI-D (RH1) IgG leidžia atlikti silpnų eritrocitų D (RH1) skyriną netiesioginiame hemagliutinacijos metode su antiglobulinu.
- Tyrimai, atlikti su tam tikrais fenotipais, negali užtikrinti visų silpnų ar kintančių fenotipų atpažinimo dėl antigenų motyvų variabiliškumo.
- ANTI-D (RH1) IgM I ir TOTEM turi ypatingą savybę atpažinti tam tikrus retus RH33 (DHar) tipo antigenų motyvus ir todėl gali sukelti prieštaringas reakcijas su polikloniniais reagentais, kurie jų neatpažįsta.
- Tik ANTI-D (RH1) TOTEM gali aptikti D dalinį DVI mėgintuvėlio tiesioginiame hemagliutinacijos metode.
- Be to, ANTI-D klonai gali specifiškai atpažinti tam tikrus antigeno D epitopus (žr. lentelę paskutiniame lape).
- Dalinio D identifikavimui yra rekomenduojama naudoti D-SCREEN rinkinį.

## LITERATŪRA

- BETREMIEUX C., BEOLET M., KEYSER L.  
A new strategy for D phenotyping with TOTEM® multimonoclonal ANTI-D reagent, XXIII rd I.S.B.T. Congress, July 1994.
- ARAMBURU E., RABASA P., ESQUIROZ R., GALARRETA T., OLCOZ B.  
Valoracion de un antisuero anti-D IgM-IgG monoclonal (DIAGAST) en donantes de sangre con expresividad debil del antigeno D. Hematology Congress, Madrid, October 1990.
- MANNESSIER L. Blood Transfusion Centre, Lille, France. The use of monoclonal antibodies as blood grouping reagents: applications, advantages and problems. Congress of the Italian society for blood transfusion, Rome, June 1992.

| REAGENTAS           |             | KAT.NR. | KLONAS                                        | TIPAS                    | KILMĖ  |
|---------------------|-------------|---------|-----------------------------------------------|--------------------------|--------|
| ANTI-A (ABO1)       | 5 x 10 ml   | 70501   | 9113D10                                       | IgM                      | Pelė   |
|                     | 100 x 10 ml | 70540   |                                               |                          |        |
| ANTI-B (ABO2)       | 5 x 10 ml   | 70502   | 9621A8                                        | IgM                      | Pelė   |
|                     | 100 x 10 ml | 70541   |                                               |                          |        |
| ANTI-A,B (ABO3)     | 5 x 10 ml   | 70503   | 9113D10 + 152D12                              | IgM                      | Pelė   |
|                     | 100 x 10 ml | 70542   |                                               |                          |        |
| ANTI-D (RH1) IgM I  | 5 x 10 ml   | 71000   | P3X61                                         | IgM                      | Žmogus |
|                     | 100 x 10 ml | 70543   |                                               |                          |        |
| ANTI-D (RH1) IgM II | 5 x 10 ml   | 71005   | HM10                                          | IgM                      | Žmogus |
| ANTI-D (RH1) TOTEM  | 5 x 10 ml   | 71010   | P3X61 +<br>P3X21223B10 +<br>P3X290 +<br>P3X35 | IgM<br>IgM<br>IgG<br>IgG | Žmogus |
|                     | 100 x 10 ml | 70544   |                                               |                          |        |
| ANTI-D (RH1) IgG    | 5 x 10 ml   | 71020   | HM16                                          | IgG                      | Žmogus |
| ANTI-DCE (RH1,2,3)  | 5 x 5 ml    | 74111   | P3X61 +<br>P3X25513G8 +<br>P3X234             | IgM                      | Žmogus |
| NEG CONTROL         | 5 x 10 ml   | 79000   |                                               |                          |        |
|                     | 100 x 10 ml | 70545   |                                               |                          |        |

| Klonai      | Tipai | DII | DIIIa<br>DIIIb<br>DIIIc | DIVa | DIVb | DVa | DVI | DVII | DFR | DBT | DHAR | DHMI |
|-------------|-------|-----|-------------------------|------|------|-----|-----|------|-----|-----|------|------|
| P3X61       | IgM   | +   | +                       | +    | +    | +   | -   | +    | +/- | +   | +    | +    |
| HM10        | IgM   | +   | +                       | +    | +    | +   | -   | +    | -   | +   | -    | +    |
| HM16        | IgG   | +   | +                       | +    | +    | +   | -   | +    | -   | +   | +    | +    |
| P3X21223B10 | IgM   | -   | +                       | -    | -    | +   | +   | +    | +   | -   | -    | +    |
| P3X290      | IgG   | +   | +                       | +/-  | -    | +   | +/- | +    | +   | -   | -    | +    |
| P3X35       | IgG   | +   | +                       | +    | +    | -   | -   | +    | -   | -   | -    | +    |

+: Teigiamas rezultatas, kurio intensyvumas gali kisti priklausomai nuo antigenų vietų skaičiaus ant eritrocitų.

+/-: Gali būti gaunamas teigiamas arba neigiamas rezultatas. Rezultatas priklauso nuo antigeniškumo.

Peržiūros data: 2013 sausio mėn.



**DIAGAST** BP 9 - 59374 LOOS CEDEX – PRANCŪZIJA



www.diagast.com  
key-code : DIA00104

|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                       | Pour obtenir les notices dans la langue de votre choix :<br>For Instructions For Use in your language :<br>Para las instrucciones de uso en su idioma :<br>Para Instruções de Uso na sua língua :<br>Per le istruzioni di uso nella sua lingua :<br>Für Gebrauchsanleitungen in Ihrer Sprache :<br>Föör bruksanviningar pa ditt eget språk :<br>For brugsanvisninger pa dit sprog : |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
| <b>http://</b>                                                                                                         | <a href="http://www.diagast.com">www.diagast.com</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |
| <br><b>For<br/>European<br/>Union</b> | <br><b>Free</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                    | België - Belgique - България - Česká Republika - Danmark - Deutschland - Eesti - España - France - Ireland - Italia - Kypros - Latvija - Luxembourg – Magyarország - Nederland - Norge - Österreich - Polska - Portugal - Schweiz - Suisse - Suomi - Slovenija - Sverige - United Kingdom | +800 135 79 135     |
|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ελλάδα                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 00800 161 2205 7799 |
|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ísland                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 800 8996            |
|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Lietuva                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 8800 30728          |
|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | România                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0800 895 084        |
|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Slovensko                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0800 606 287        |
|                                                                                                                        | <br><b>Not<br/>free</b>                                                                                                                                                                                                                                                                           | Liechtenstein                                                                                                                                                                                                                                                                             | +31 20 796 5692     |
|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Malta                                                                                                                                                                                                                                                                                     | +31 20 796 5693     |

|               | REFERENCE | CLONE             |
|---------------|-----------|-------------------|
| PHENOKIT      | 74911     |                   |
| ANTI-C (RH2)  | 74221     | P3X25513G8 + MS24 |
| ANTI-E (RH3)  | 74311     | 906               |
| ANTI-c (RH4)  | 74011     | 951               |
| ANTI-e (RH5)  | 74611     | P3GD512 + MS63    |
| ANTI-K (KEL1) | 74711     | MS56              |

## INTRODUCTION

These reagents are in vitro diagnostic medical devices (IVDMD) for professional use. They are designed for analyses of human biological samples. They are used for RH-K phenotyping of human red blood cells. They make it possible to determine the presence of the antigens C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5) and K (KEL1) on the red blood cell surface.

## PRINCIPLE

The manual technique employed, on plate or in tube, utilises the principle of haemagglutination. Red blood cells to be tested bearing an antigen agglutinate in the presence of a reagent containing the corresponding antibody.

## COMPOSITION

The reagents are prepared by DIAGAST from anti-erythrocyte monoclonal antibodies in a preservation medium. The monoclonal antibodies of IgM type are derived from supernatants of in vitro hybridoma cultures of human origin.

All the reagents contain sodium azide (< 0.1 %). The ANTI-C (RH2), ANTI-c (RH4) and ANTI-e (RH5) contain sodium arsenite (0.02 %).

All reagents except ANTI-K (KEL1) contain bovine albumin. ANTI-K (KEL1) contains fetal calf serum.

These reagents are packed in boxes of 4 bottles of 5 ml provided with calibrated droppers.

PHENOKIT kit is composed of 1 bottle of ANTI-C (RH2), 1 bottle of ANTI-E (RH3), 1 bottle of ANTI-c (RH4), 1 bottle of ANTI-e (RH5) and 1 bottle of ANTI-K (KEL1).

## PRECAUTIONS

It is advisable to wear gloves and safety spectacles and handle samples of human origin with caution. All materials that have come into contact with the samples are to be handled as potentially infectious products. Special protective measures and conditions for disposal and disinfection should be implemented in accordance with local regulations. Do not use damaged or leaking reagents.

## STORAGE

The reagent must be stored between +2 °C and +8 °C. Its performance is guaranteed for the method recommended from first use to the expiry date indicated on the label. It must not be used beyond that date. It is advisable to minimize its time outside the refrigerator and to avoid leaving it at room temperature between 2 uses.

## REAGENTS AND MATERIAL NECESSARY

- Isotonic saline solution (0.9 % NaCl)
- 10 or 12 x 75 mm glass test tubes, test tube rack
- Stirrer
- Opaline plate
- Precision automatic adjustable pipettes
- Centrifuge with a relative force of 100 – 1200 g
- Blood samples with known phenotypes such as HEMA CQI (DIAGAST Ref. : see the catalogue)
- Negative control: NEG CONTROL (DIAGAST Ref.: see the catalogue)

## SAMPLES – CONTROLS

### Blood sample to be tested

Blood collected in anticoagulant : EDTA, heparin or citrate, in a stoppered sterile tube, stored between +2 °C and +8 °C, must be examined within 48 hours, insofar as no sign of haemolysis is visible.

At the time of the test, centrifuge the blood sample 3 minutes at 1200 g.

### Blood samples with known phenotypes : HEMA CQI

The use of HEMA CQI enables detection of anomalies (handling, reagents, apparatus and environment) and implementation of corrective actions.

The analytic system must be validated by using samples with known phenotypes:

- a sample possessing the antigen corresponding to the antibody of the reagent used
- a sample which doesn't possess the antigen corresponding to the antibody of the reagent used

For each blood sample to be tested, it is necessary to study a reagent control performed under the same conditions wherein the reagent is replaced by the NEG CONTROL.

## PROCEDURE

### Plate technique at room temperature (+18 °C ... +25 °C)

- On a thoroughly clean opaline plate, using the dropper in the vial, deposit 1 drop of reagent.
- Deposit 25 µl of unwashed cell clot next to each drop of reagent, taking care to not create contact between the drops.
- Mix the blood and the reagent using a spiral movement with the end of a stirrer, in such a way as to create a mixture that is 2 to 3 cm in diameter.
- Incubate for 30 seconds at room temperature without agitating.
- Hold the plate and roll **slowly** for 3 minutes while observing macroscopically the possible appearance of agglutinates.

Note: agglutinations observed with ANTI-K (KEL1) can be smaller or weaker as compared to other reagents. It is very important to roll the plate very slowly.

- Read the reactions immediately.

### Tube technique at room temperature

- Prepare a 5 % unwashed red blood cell suspension in isotonic saline solution.
- In a tube, using the dropper in the vial, deposit 1 drop of reagent.
- Add 50 µl of cell suspension.
- Agitate in order to homogenize and then centrifuge for 1 minute at 500 g.
- Gently agitate the tube in such a way as to detach the cell pellet while macroscopically observing the possible appearance of agglutinates.
- Read the reactions immediately.

## INTERPRETATION

If there is agglutination (the red blood cells gather into 1 or several blocks), the reaction is positive and the antigen corresponding to the reagent used is present on the red blood cells tested.

If there is no agglutination (the red blood cells go back into homogeneous suspension), the reaction is negative and the antigen is absent from these red blood cells.

The reaction is interpretable only if:

- the reagent control using the NEG CONTROL and the red blood cells of the subject is negative
- the analytic system is validated using samples with known phenotypes

## LIMITATIONS OF THE METHOD

Only qualified personnel should use the reagent.

It is imperative to use the calibrated dropper provided in the IVDMD bottle to dispense a reagent drop.

The reactions must be read immediately after the centrifugation and resuspension.

It is imperative to work with clean equipment and non-contaminated products (bacterial contamination or others).

The following points must be scrupulously observed:

- storage conditions and expiry date
- procedure as listed above
- standardisation of recommended equipment

## PERFORMANCE DATA

In the recommended techniques, these reagents comply with the common technical specifications of the IVDMD. A performance assessment was conducted on a panel of 500 to 1400 specimens from known common Rhesus phenotypes (blood donors, patients and neonates). The samples were collected on each of the recommended anticoagulants (EDTA, heparin, and citrate). The assessment demonstrated 100% specificity of each of the reagents versus the expected results.

The tests conducted on particular phenotypes, although satisfactory; do not allow the recognition of all weak or variant subjects to be guaranteed, due to the variability of the antigenic motifs.

In certain cases, a double population image may be observed in transfused subjects.

A false positive reaction may appear if the subject tested possesses cold agglutinins.

## BIBLIOGRAPHY

- MANNESSIER L., HORBEZ C., BROLY H.  
Caractérisation et validation d'un anticorps monoclonal humain anti-C.  
Rev. Fr. Transfus. Hémodiol., 1991, 34, 403-408.
- Common Technical Specifications (CTS) for the in vitro diagnostic medical devices of annex II, list A, of directive 98/79/EC are notified in the Official Journal of the European Communities under document No. C (2002) 1344, text with EEA relevance (2002/364/EC).



DIAGAST



**DIAGAST** BP 9 - 59374 LOOS CEDEX – FRANCE

Revision date: 2008, March





|                      | KAT.NR. | KLONAS            |
|----------------------|---------|-------------------|
| <b>PHENOKIT</b>      | 74911   |                   |
| <b>ANTI-C (RH2)</b>  | 74221   | P3X25513G8 + MS24 |
| <b>ANTI-E (RH3)</b>  | 74311   | 906               |
| <b>ANTI-c (RH4)</b>  | 74011   | 951               |
| <b>ANTI-e (RH5)</b>  | 74611   | P3GD512 + MS63    |
| <b>ANTI-K (KEL1)</b> | 74711   | MS56              |

## IVADAS

Šie reagentai yra in vitro diagnostinės medicinos priemonės (IVDMD), skirtos profesionaliam naudojimui. Reagentai yra skirti atlikti žmogaus biologinių mėginių tyrimams. Jie yra naudojami eritrocitų RH-K fenotipo nustatymui. Naudojant šiuos reagentus taip pat galima nustatyti antigenų C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5) ir K (KEL1) buvimą ant eritrocitų paviršiaus.

## PRINCIPAS

Naudojant manualinę technologiją ant lėkštelės arba mėgintuvėlyje, yra naudojamas hemagliutinacijos principas. Tiriami eritrocitai su antigenais agliutinuojama esant reagentui su atitinkamais antikūnais.

## SUDĖTIS

The reagents are prepared by DIAGAST reagentai yra paruošti iš anti-eritrocitinių monokloninių antikūnų ir tiekiami laikymo terpėje.

IgM tipo monokloniniai antikūnai yra išgauti iš žmogaus kilmės hibridomos in vitro kultūrų supernatantų.

Visų reagentų sudėtyje yra natrio azido (< 0.1 %). ANTI-C (RH2), ANTI-c (RH4) ir ANTI-e (RH5) sudėtyje yra natrio arsenito (0.02 %).

Visų reagentų, išskyrus ANTI-K (KEL1), sudėtyje yra jaučio albumino. ANTI-K (KEL1) sudėtyje yra naujagimio veršiuo serumo.

Reagentai yra supakuoti po 5ml buteliukus, po 4 dėžutėje. Buteliukai yra su kalibruotais lašintuvais.

PHENOKIT rinkinys susideda iš 1 buteliuko ANTI-C (RH2), 1 buteliuko ANTI-E (RH3), 1 buteliuko ANTI-c (RH4), 1 buteliuko ANTI-e (RH5) ir 1 buteliuko ANTI-K (KEL1).

## ATSARGUMO PRIEMONĖS

Rekomenduojama dėvėti apsaugines pirštines bei akinius ir su žmogaus kilmės mėginiais dirbti laikantis visų atsargumo priemonių. Visi substratai, turėję kontaktą su mėginiais, turi būti laikomi potencialiai infekciniais produktais. Pagal vietinius reikalavimus turi būti laikomasi specialių saugos priemonių, išmetimo ir dezinfekcijos sąlygų.

Nenaudokite pažeistų ar tekančių reagentų.

## LAIKYMAS

Reagentai turi būti laikomi prie + 2 °C - + 8 °C. Tinkami naudoti nuo pirmojo atidarymo iki galiojimo datos pabaigos. Nenaudokite pasibaigus galiojimo datai. Kiek galima mažiau laikykite išėmę iš šaldytuvo ir venkite palikti kambario temperatūroje kai nenaudojate.

## REIKALINGOS MEDŽIAGOS IR REAGENTAI

- Izotoninis tirpalas (0.9 % NaCl)
- 10 ar 12 x 75 mm stikliniai tyrimo mėgintuvėliai, tyrimo mėgintuvėlių stovas
- Maišytuvas
- Permatoma lėkštelė
- Tikslūs automatiškai nustatomi dozatoriai
- Centrifuga su 100-1200 g santykinė jėga
- kraujo mėginiai su žinomais fenotipais, tokiais kaip HEMA CQI (DIAGAST Kat.Nr. : žr.katalogą)
- Neigiamą kontrolę: NEG CONTROL (DIAGAST Kat.Nr. : žr.katalogą)

## MĖGINIAI – KONTROLĖS

### Tiriami kraujo mėginiai

Kraujas surinktas su antikoagulantu: EDTA, heparinas ar citratas užkimštame steriliame mėgintuvėlyje, laikomame prie 2 - 8°C, turi būti tiriamas per 48 valandas, su sąlyga, kad nesimato hemolizės ženklų.

Tyrimo metu centrifuguokite kraujo mėginį 3 minutes prie 1200 g.

### Kraujo mėginiai su žinomais fenotipais: HEMA CQI

HEMA CQI naudojimas leidžia aptikti anomalijas (naudojimo, reagentų, aparato ir aplinkos) ir parinkti tinkamus korekcinius veiksmus.

Analitinė sistema turi būti patvirtinta naudojant mėginius su žinomais fenotipais:

- mėginys su antigenu, atitinkančiu naudojamą reagento antikūną,
- mėginys be antigeno, atitinkančio naudojamą reagento antikūną.

Kiekvienam tiriamam kraujo mėginiui yra būtina naudoti reagento kontrolę, kuri yra atliekama tomis pačiomis sąlygomis kaip kai reagentas yra pakeičiamas į NEG CONTROL.

## PROCEDŪRA

### Lėkštelės technologija kambario temperatūroje (+18 °C ... +25 °C)

- Naudodamiesi buteliuku sulašintuvu, ant griežtai švarios lėkštelės užlašinkite 1 lašą reagento.
- Paėmę 25 µL praplautų ląstelių suspensijos užlašinkite po vieną lašą šalia reagento taip, kad lašai nesusiliestų.
- Sumaišykite kraują ir reagentą atlikdami spiralinį judesį maišymo lopetėle tam, kad sukurti taisyklingą 2-3 cm diametro apskritimą,
- Lėkštelę inkubuokite kambario temperatūroje nemaišant 30 sekundžių.
- Laikydami lėkštelę, **lėtai** atlikite sukamuosius judesius 3 minutes kol makroskopiškai pamatysite galimą agliutinaciją.  
Pastaba: agliutinatą, pastebėti su ANTI-K (KEL1) gali būti mažesni ar silpnesni nei su kitais reagentais. Labai svarbu ypač lėtai sukurti lėkštelę.
- Nedelsiant nuskaitykite reakcijas.

### Mėgintuvėlio technologija kambario temperatūroje

- Paruoškite 5 % eritrocitų suspensiją izotoniniame tirpale.
- Naudodamiesi buteliuku sulašintuvu, perneškite lašą reagento į mėgintuvėlį.
- Pridėkite 50 µL eritrocitų suspensijos.
- Papurtykite, kad mišinys homogenizuotųsi ir centrifuguokite 1 minutę prie 500 g.
- Švelniai purtydami mėgintuvėlį, kad atskirtumėte eritrocitų suspensiją, mikroskopiškai įvertinkite, ar nėra agliutinatų.
- Nedelsiant nuskaitykite reakcijas.

## INTERPRETACIJA

Jei yra agliutinacija (eritrocitai suformuoja vieną ar daugiau blokų), reakcija yra teigiama ir antigenas, atitinkamai reaguojančių su naudojamu reagentu, yra ant tiriamųjų eritrocitų.

Jei agliutinacijos nėra (eritrocitai suformuoja homogeninę suspensiją), reakcija yra neigiama ir antigeno nėra ant eritrocitų..

Reakcija yra interpretuojama tik tada, jei:

- naudojama reagento kontrolė NEG CONTROL yra neigiama,
- analitinė sistema yra patvirtinta naudojant mėginius su žinomais fenotipais

## METODO APRIBOJIMAI

Reagentus gali naudoti tik kvalifikuotas personalas.

Privaloma naudoti kalibruotuslašintuvus, tiekiamus IVDMD buteliuke, skirtus reagentų pilstymui.

Reakcijos turi būti nuskaitytos nedelsiant po centrifugavimo ir suspendavimo.

Būtina naudoti tik švarią įrangą ir neužterštus produktus (be bakterinio ar kitokio užterštumo).

Turi būti skrupulingai laikomasi ir atsižvelgiamą į:

- laikymo sąlygas galiojimo datą,
- Aukščiau aprašytas procedūras
- rekomenduojamos įrangos standartizavimą

## ATLIKIMO DUOMENYS

Rekomenduojamuose metoduose šie reagentai atitinka IVDMD bendrąsias technines specifikacijas.

Atlikimo įvertinimas buvo atliekamas naudojant 500-1400 mėginių panelį su žinomais Rhesus fenotipais (kraujo donorai, pacientai ir naujagimiai). Mėginiai buvo surinkti su rekomenduojamais antikoagulantais (EDTA, heparinas, citratas). Vertinimas parodė 100 % reagentų specifiškumą prieš tikėtinus rezultatus.

Nors ir tyrimai, atlikti su tam tikrais fenotipais, buvo patenkinami, tai dar negarantuoja, kad bus atpažinti visi silpni ar kintantys subjektai dėl antigenų motyvų variabiliškumo.

Tam tikrais atvejais, gali būti pastebimas dvigubos populiacijos vaizdas, ypač subjektams, kuriems buvo perpiltas kraujas.

Jei subjektas turi krešulių agliutinino, gali atsirasti klaidingai teigiama reakcija.

## LITERATŪRA

- MANNESSIER L., HORBEZ C., BROLY H.  
Caractérisation et validation d'un anticorps monoclonal humain anti-C.  
Rev. Fr. Transfus. Hémobiol., 1991, 34, 403-408.
- Common Technical Specifications (CTS) for the in vitro diagnostic medical devices of annex II, list A, of directive 98/79/EC are notified in the Official Journal of the European Communities under document No. C (2002) 1344, text with EEA relevance (2002/364/EC).



DIAGAST



**DIAGAST** BP 9 - 59374 LOOS CEDEX – PRANCŪZIJA

Revision date: 2008m. kovas