

DE GEBRAUCHSINFORMATION

Anti-Human-Globulin GRÜN (IgG + C3d) monoklonal

CE 0123

REF 6912 1 x 10 ml

REF 6913 10 x 10 ml

IN VITRO DIAGNOSTIKUM

1. Produktbeschreibung

Das polyspezifische Anti-Human-Globulin GRÜN besteht aus einem Gemisch von Zellkulturüberständen verschiedener muriner Hybridomzelllinien. Das fertige Produkt enthält Material aus zwei Anti-IgG-Zelllinien (5H4 und 8D2-8), einer Anti-C3c-Zelllinie (86 5A2) und einer Anti-C3d-Zelllinie (139 4B4). Das Reagenz ist so zusammengesetzt, dass es optimal mit Zellen reagiert, die mit IgG und/oder C3 (C3b und/oder C3d) beladen sind. Das für dieses Reagenz verwendete Verdünnungsmedium enthält Natriumchlorid, Rinderserumalbumin und ausgewählte Puffer. Als Konservierungsmittel ist NaN_3 in einer Endkonzentration von 0,1% zugesetzt. Das polyspezifische Anti-Human-Globulin GRÜN enthält als Farbstoffe Acid Blue #1 and Acid Yellow #23.

Anti-Human-Globulin wird im direkten Antiglobulintest (DAT) und im indirekten Antiglobulintest (ICT) eingesetzt. Im direkten Antiglobulintest werden in vivo an Erythrozyten gebundene Antikörper und/oder Komplementfaktoren nachgewiesen. Direkte Antiglobulinteste können die Diagnose bei autoimmunhämolytischen Anämien (AIHA), hämolytischen Anämien bei Föten und Neugeborenen und bei verzögerten hämolytischen Transfusionsreaktionen unterstützen.

Im indirekten Antiglobulintest werden in vitro an Erythrozyten gebundene Antikörper und/oder Komplementfaktoren nachgewiesen. Der indirekte Antiglobulintest wird bei Tests auf D weak, bei Kreuzproben, beim Nachweis und der Identifizierung von irregulären Blutgruppen-Antikörpern und bei der Phänotypisierung von Erythrozyten eingesetzt.

Antiglobulinteste werden auch bei Verdacht auf eine Medikamenten-induzierte Erythrozytensensibilisierung angewandt.

Die Reaktivität von Anti-IgG, Anti-C3b und Anti-C3d wird in serologischen Tests mit IgG oder C3 beladenen Erythrozyten entsprechend anerkannter Testverfahren bewertet. Die Spezifität wird durch Tests gegen eine Vielzahl von mit verschiedenen humanen Proteinen beladenen Zellen überprüft. Die Abwesenheit kontaminierender Heteroagglutinine wird durch serologische Tests gegen unsensibilisierte Zellen aller AB0-Gruppen getestet. Die Abwesenheit von nachweisbarem Anti-C4 wird in serologischen Tests gegen mit C4b und C4d beladenen Zellen bestätigt. Dieses Reagenz reagiert speziell mit humanem IgG bzw. C3 (C3b und C3d) beladenen Erythrozyten, wenn es gemäß der empfohlenen Gebrauchsinformation verwendet wird.

2. Testprinzip

Mit einem Antiglobulintest wird in vivo oder in vitro an Erythrozyten gebundenes humanes IgG oder gebundene humane Komplementfaktoren mit Hilfe von Anti-Humanglobulinen nachgewiesen. Die in diesem Reagenz vorliegenden Anti-Humanglobuline sind monoklonale Antikörper, die mittels Hybridomazellen von mit humanen Immunglobulinen oder humanen Komplementfaktoren immunisierten Mäusen gewonnen werden. Diese Anti-Humanglobuline reagieren sowohl mit humanen Immunglobulinen bzw. Komplementfaktoren, die an die Erythrozytenmembran gebunden sind, als auch mit denjenigen, die in der flüssigen Phase vorhanden sind. Zum spezifischen Nachweis von nur an Erythrozyten gebundenen Immun-

globulinen bzw. Komplementfaktoren müssen zunächst die freien Immunglobuline/ Komplementfaktoren durch eine Reihe aufeinanderfolgender Waschprozesse entfernt werden, damit gewährleistet ist, dass nur noch an Erythrozyten gebundene Immunglobuline/Komplementfaktoren vorhanden sind und mit dem Anti-Humanglobulin reagieren können. Wenn die Erythrozyten mit Immunglobulinen/Komplementfaktoren beladen sind, binden die Anti-Humanglobuline spezifisch an diese Proteine und bilden Brücken zwischen den Erythrozyten. Diese Reaktion ist optisch durch die Agglutination der Erythrozyten erkennbar. Sind die Erythrozyten nicht beladen, kann keine Reaktion mit dem Anti-Humanglobulin und somit auch keine Agglutination stattfinden.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Anti-Human-Globulin GRÜN (IgG + C3d) monoklonal bei 2...8°C lagern. Nicht einfrieren! Das Reagenz vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18...25°C) erwärmen lassen und unmittelbar nach dem Gebrauch wieder bei 2...8°C lagern.

Das Reagenz ist bei Einhaltung der angegebenen Lagerbedingungen nach dem ersten Öffnen bis zum auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar, wenn es keine Trübungen oder andere Anzeichen für eine Kontamination aufweist. Das Reagenz nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums benutzen.

Kontaminierte Reagenzien nicht mehr benutzen!

4. Probenvorbereitung

Für die Probenahme ist keine besondere Vorbereitung des Patienten bzw. des Spenders notwendig. Die Blutproben sollten entsprechend den üblichen medizinischen Verfahren entnommen werden.

Direkter Antiglobulintest: Um eine signifikante in vitro Komplement-Bindung zu vermeiden, sollte antikoaguliertes Blut in EDTA gesammelt werden, wodurch der spezifische Nachweis einer in vivo Komplement-Sensibilisierung von Erythrozyten möglich wird. Andere Antikoagulanzen wie ACD und CPD sind zwar weniger wirksam als EDTA, können jedoch ebenfalls verwendet werden. Blutproben sollten so bald wie möglich nach der Entnahme untersucht werden. Wenn nur geronnenes Blut zur Verfügung steht, sollte dieses vor dem Einsatz im direkten Antiglobulintest nicht gekühlt werden (siehe Wichtige Hinweise / Grenzen der Methode).

Indirekter Antiglobulintest: Serumproben sollten von frisch entnommenem geronnenem Blut gewonnen werden. Plasma sollte nicht verwendet werden, wenn ein optimaler Nachweis komplementbindender Erythrozyten-Antikörper gewünscht wird, da die Komplementaktivierung durch Blutgruppen-Antikörper durch die Wirkung mancher Antikoagulanzen, die als Chelatbildner Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen binden, gehemmt werden kann. Die aktive Serumkomplement-Konzentration nimmt während der Aufbewahrung ab, daher kann ein optimaler Nachweis von komplementbindenden Antikörpern nur mit Serum von frisch entnommenen Blutproben erzielt werden. Wenn eine Testung nicht ohne zeitliche Verzögerung möglich ist, sollte das Serum von den Erythrozyten getrennt werden und bei 2...8°C für maximal 48 Stunden gelagert werden. Alternativ kann das Serum auch eingefroren werden.

Plasma kann verwendet werden, wenn kein Serum zur Verfügung steht bzw. der Test nur zum Nachweis einer IgG-Sensibilisierung durchgeführt wird.

5. Zusätzlich benötigte Materialien

Isotonische NaCl-Lösung, pH 6,5 – 7,5

Reagenzgläser (75 x 12 mm)

Einweg-Pasteur-Pipetten

Wasserbad/Brutschrank (37°C ± 1°C)

Zentrifuge (900-1000 x g)

Testerythrozyten für den Nachweis bzw. die Identifikation von Antikörpern

IgG-beladene Testerythrozyten (Coombs Control)

6. Testdurchführung

Direkter Antiglobulintest

1. Die zu untersuchenden Erythrozyten mindestens einmal in isotonischer NaCl-Lösung waschen und eine ca. 2 - 5%ige Erythrozytensuspension in isotonischer NaCl-Lösung herstellen.
2. 1 - 2 Tropfen (ca. 40 – 100 µl) der gewaschenen 2 - 5%igen Erythrozytensuspension in ein gekennzeichnetes Röhrchen geben.
3. Die Erythrozyten mindestens 3 x mit reichlich isotonischer NaCl-Lösung waschen. Den Überstand nach jedem Waschvorgang vollständig dekantieren und bei jedem Waschschrift auf eine gründliche Resuspendierung und gutes Vermischen der Erythrozyten mit der neu zugefügten NaCl-Lösung achten.
4. Nach dem letzten Waschschrift den Überstand vollständig dekantieren, sodass man ein „trockenes“ Erythrozytensediment erhält.
5. 2 Tropfen (ca. 80 – 100 µl) Anti-Human-Globulin GRÜN (IgG + C3d) monoklonal zu dem Erythrozytensediment geben und vorsichtig, aber gründlich mischen, um die Erythrozyten zu resuspendieren.
6. 15 Sekunden bei 900 – 1000 x g oder bei alternativer Drehzahl mit angepasster Zeit zentrifugieren.
7. Unter vorsichtigem Aufschütteln des Röhrchens auf Agglutination prüfen.
8. Negative oder nur schwach positive Ergebnisse durch Zugabe von IgG-beladenen Testzellen überprüfen (entsprechend den Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation der IgG-beladenen Testzellen).

Bitte beachten:

Ein Mikroskop oder ein anderes optisches Hilfsmittel kann zur Bestätigung schwacher oder negativer Hämagglutinationsreaktionen verwendet werden.

Die Anti-Komplement-Reaktionen können durch 5 – 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (~ 18...25°C) verstärkt werden. Anschließend erneut zentrifugieren und prüfen (entsprechend Punkt 6 und 7). Der erste Zentrifugationsschrift sollte jedoch niemals übersprungen werden, da Anti-IgG-Reaktionen durch die Inkubation bzw. erneute Zentrifugation beeinträchtigt werden können.

Zur Kontrolle sollte das Anti-Human-Globulin routinemäßig mit schwach IgG-sensibilisierten Erythrozyten und mit Erythrozyten, die mit C3b oder C3d beladen sind, überprüft werden. Nicht beladene Erythrozyten sollten als negative Kontrolle parallel mitgeführt werden.

Indirekter Antiglobulintest

Für Antikörpernachweis, Antikörperidentifizierung und Kreuzprobe

Bitte beachten:

Die folgende Testmethode ist nur eine Empfehlung. Änderungen der Testmethode nach anerkannten und gut dokumentierten immunhämatologischen Verfahren (wie z.B. eine Erhöhung des Verhältnisses von Serum zu Zellen und/oder der Inkubationszeit) können erforderlich sein, um den Anforderungen individueller Labors zu entsprechen. Bei der Verwendung von Supplementen (Reaktionsverstärkern mit geringer Ionenstärke oder anderen Reaktionsverstärkern) muss die Gebrauchsanweisung des jeweiligen Herstellers strikt befolgt werden. Die Phänotypisierung von Erythrozyten mit spezifischen Blutgruppen-Testreagenzien sollte gemäß den Gebrauchsanweisungen des jeweiligen Herstellers durchgeführt werden. Vom Benutzer vorgenommene Änderungen beim Testverfahren müssen validiert werden.

Im Folgenden ist als Beispiel ein häufig angewandtes Testprotokoll für den Nachweis bzw. die Identifikation von Antikörpern oder für die Kreuzprobe angegeben:

1. Für jede zu testende Spenderzelle, Screening-Zelle oder Panelzelle ein Röhrchen beschriften.
2. Mindestens 2 Tropfen (ca. 80 - 100 µl) Serum und 1 Tropfen einer 2 - 5%igen Suspension von Spenderzellen oder Testerythrozyten (Screening-Zellen oder Panelzellen) in die gekennzeichneten Röhrchen geben und gründlich mischen.
3. 15 Sekunden bei 900 – 1000 x g oder bei alternativer Drehzahl mit angepasster Zeit zentrifugieren.
4. Den Überstand auf sichtbare Hämolyse prüfen.
5. Unter vorsichtigem Aufschütteln des Röhrchens makroskopisch auf Agglutination prüfen.
6. Den Inhalt der Röhrchen erneut mischen und 15 - 60 Minuten bei 37°C ± 1°C inkubieren.
7. 15 Sekunden bei 900 – 1000 x g oder bei alternativer Drehzahl mit angepasster Zeit zentrifugieren.
8. Den Überstand auf sichtbare Hämolyse prüfen.
9. Unter vorsichtigem Aufschütteln des Röhrchens makroskopisch auf Agglutination prüfen.
10. Den Inhalt der Röhrchen erneut vorsichtig, aber gründlich mischen und die Erythrozyten 3 – 4 x mit isotonischer NaCl-Lösung waschen. Den Überstand nach jedem Waschvorgang vollständig dekantieren und bei jedem Waschschrift auf eine gründliche Resuspendierung und gutes Vermischen der Erythrozyten mit der neu zugefügten NaCl-Lösung achten.
11. Nach dem letzten Waschschrift den Überstand vollständig dekantieren, sodass man ein „trockenes“ Erythrozytensediment erhält.
12. 2 Tropfen (ca. 80 – 100 µl) Anti-Human-Globulin GRÜN (IgG + C3d) monoklonal zu jedem Erythrozytensediment geben und vorsichtig, aber gründlich mischen, um die Erythrozyten zu resuspendieren.
13. 15 Sekunden bei 900 – 1000 x g oder bei alternativer Drehzahl mit angepasster Zeit zentrifugieren.
14. Unter vorsichtigem Aufschütteln des Röhrchens auf Agglutination prüfen.
15. Negative oder nur schwach positive Ergebnisse durch Zugabe von IgG-beladenen Testzellen überprüfen (entsprechend den Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation der IgG-beladenen Testzellen).

Bitte beachten:

Ein Mikroskop oder ein anderes optisches Hilfsmittel kann zur Bestätigung schwacher oder negativer Hämagglutinationsreaktionen verwendet werden.

Zur Kontrolle sollte das Anti-Human-Globulin routinemäßig mit schwach mit IgG-sensibilisierten Erythrozyten und mit Erythrozyten, die mit C3b oder C3d beladen sind, überprüft werden. Nicht beladene Erythrozyten sollten als negative Kontrolle parallel mitgeführt werden.

Bei Testungen, die nicht in einem Milieu mit geringer Ionenstärke durchgeführt werden, ist es ein übliches und gut dokumentiertes Verfahren, die Serummenge zu erhöhen (Erhöhung des Verhältnisses von Serum zu Zellen) und/oder eine längere Inkubation (mehr als 15 Minuten) durchzuführen, um die Sensitivität des Testverfahrens zu erhöhen. Bei der Verwendung von Reaktionsverstärkern mit geringer Ionenstärke muss die Gebrauchsanweisung des jeweiligen Herstellers strikt befolgt werden.

7. Interpretation der Ergebnisse

Eine Agglutination der Erythrozyten in der Antiglobulintestphase des direkten oder indirekten Antiglobulintests zeigt ein **positives Testergebnis** an und weist innerhalb der Grenzen der Testmethode auf das Vorhandensein von IgG und/oder Komplement (C3) auf den Erythrozyten hin.

Findet keine Agglutination der Erythrozyten in der Antiglobulintestphase des direkten oder indirekten Antiglobulintests statt, zeigt dies ein **negatives Testergebnis** an und weist innerhalb der Grenzen der Testmethode auf die Abwesenheit von serologisch nachweisbarem IgG und/oder Komplement (C3) auf den Erythrozyten hin.

Das Testergebnis kann nicht gewertet werden, wenn die Kontrollen wie folgt reagieren:

- keine Agglutination nach Zugabe von IgG-beladenen Testzellen zu einem negativen Antiglobulintest
- keine Agglutination der Kontrollerythrozyten, die schwach mit IgG beladen sind
- keine Agglutination der Kontrollerythrozyten, die mit C3b oder C3d beladen sind
- Agglutination der Kontrollerythrozyten, die nicht mit IgG/Komplement beladen sind

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen die Grenzen der Methode (s. 9. Wichtige Hinweise/Grenzen der Methode) beachtet werden.

8. Stabilität der Reaktionen

Alle Testergebnisse müssen unmittelbar nach Beendigung der Testdurchführung beurteilt werden.

9. Wichtige Hinweise / Grenzen der Methode

1. Anti-Human-Globulin GRÜN (IgG + C3d) monoklonal ist nur für den in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und darf nur von geschultem Fachpersonal eingesetzt werden.
2. Positive Ergebnisse im direkten Antiglobulintest (DAT) in Verbindung mit einer Komplementsensibilisierung sind nicht unbedingt auf eine in vivo Komplementbindung zurückzuführen, wenn die Testzellen von einer gekühlten geronnenen Blutprobe stammen.
3. Das Auslassen der Inkubationsphase von 5 – 10 Minuten mit darauffolgender erneuter Zentrifugation für den optimalen Nachweis einer schwachen Komplementsensibilisierung im direkten Antiglobulintest (DAT), kann zu schwachen oder falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Ein negatives Ergebnis im direkten Antiglobulintest schließt nicht unbedingt eine klinische Diagnose auf eine hämolytische Anämie bei Föten und Neugeborenen durch ABO-Inkompatibilität oder eine autoimmunhämolytische Anämie aus.
5. Erythrozyten, die im direkten Antiglobulintest (DAT) positiv reagieren, können nicht im indirekten Antiglobulintest eingesetzt werden.
6. Bestimmte Krankheitsstadien und medikamentöse Therapien können einen positiven direkten bzw. indirekten Antiglobulintests verursachen.
7. Eine Inaktivierung durch humane Serumproteinreste bedingt durch nicht sorgfältig durchgeführte Waschschriffe oder eine Verdünnung des Anti-Human-Globulins aufgrund zu hoher Restmengen an NaCl-Lösung nach dem Waschen können zu schwachen oder falsch negativen Ergebnissen im Antiglobulintest führen.
8. Verzögerungen während der Durchführung des Antiglobulintests können zu schwachen oder falsch negativen Ergebnissen führen. Insbesondere Anti-IgG Reaktionen können nachteilig durch Inkubation oder erneute Zentrifugation beeinflusst werden.
9. Ein zu starkes oder unangemessenes Aufschütteln des Erythrozytensediments im Antiglobulintest kann zu schwächeren oder falsch negativen Ergebnissen führen.
10. Um falsche Ergebnisse zu vermeiden, sollte das Reagenz auch nicht zu kalt sein, wenn es für Testungen benutzt wird. Das Reagenz und die zu untersuchenden Proben sowie die Kontrollmaterialien sollten vor der Testdurchführung Raumtemperatur (18...25°C) erreicht haben.
11. Falsche Ergebnisse können auch durch eine zu lange Lagerung der zu untersuchenden Proben und/oder ungeeignete Lagerbedingungen bzw. durch ungeeignetes Probenmaterial verursacht werden.
12. Ungeeignete Techniken, falsche Zentrifugation oder Inkubation, unsaubere Röhren, falscher pH-Wert der isotonischen NaCl-Lösung und/oder kontaminierte Materialien können zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.
13. Es ist nicht möglich, für alle verfügbaren Zentrifugentypen eine allgemein verbindliche Zentrifugationsgeschwindigkeit oder –zeit anzugeben. Zentrifugen müssen individuell kalibriert werden, um die optimale Zeit und Geschwindigkeit zu ermitteln, die benötigt

- wird, um eine starke Agglutination mit positiven Zellen zu erhalten und die eine vollständige und leichte Resuspendierung bei negativen Reaktionen ermöglicht.
14. Eine Kontamination des Anti-Humanglobulins mit menschlichem Serum kann das Reagenz neutralisieren. Eine mikrobielle Kontamination des Reagenzes sollte ebenfalls unbedingt vermieden werden, weil dies die Haltbarkeit des Produkts verkürzen und zu falschen Ergebnissen führen kann. Das Testreagenz deshalb nicht mehr benutzen, wenn eine Trübung oder andere sichtbare Veränderungen festgestellt werden. Dies kann auf eine mikrobielle Kontamination hinweisen.
 15. Die Verwendung von Anti-Human-Globulin Grün schließt nicht die Notwendigkeit aus, die Reaktivität des Anti-Human-Globulins angemessen zu kontrollieren und zu bestätigen. Das Färbemittel zeigt optisch an, dass das Anti-Human-Globulin hinzugefügt wurde, bietet aber keine Garantie für die Reaktionsfähigkeit des Reagenzes.
 16. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte immer berücksichtigt werden, ob Transfusionen oder Transplantationen stattgefunden haben. Die Transfusions- und/oder Transplantationsanamnese, aber auch die Medikamentenanamnese, sollte zur Interpretation herangezogen werden.
 17. Anti-Human-Globulin GRÜN (IgG + C3d) monoklonal nicht verdünnen und nur wie in dieser Gebrauchsinformation angegeben einsetzen.
 18. Abweichungen von der vorliegenden Gebrauchsinformation können zu einer nicht optimalen Produktleistung führen. Vom Benutzer vorgenommene Änderungen der Testverfahren müssen validiert werden.

10. Warn- und Entsorgungshinweise

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, insbesondere die zu testenden humanen Proben, sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Die Abwesenheit von murinen Viren wurde nicht untersucht. Für die Herstellung dieses Produkts verwendetes Material bovinen Ursprungs stammt von Tieren aus den USA, die von Veterinärinspektoren kontrolliert und als krankheitsfrei deklariert wurden. Das TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy)-Risiko dieses von Rindern stammenden Produkts wird als gering betrachtet.

Beim Umgang mit biologischen Materialien werden angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen. Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Die Tropfsaughütchen der Fläschchen enthalten Latex. Latex kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Das Testreagenz enthält 0,1% NaN₃ als Konservierungsmittel. Natriumazid ist toxisch. Nicht schlucken und Kontakt mit der Haut und Schleimhäuten vermeiden. Kupfer und Blei, die in einigen Rohrsystemen eingesetzt werden, können mit Azid explosive Salze bilden, deshalb sollte bei der Beseitigung von Azid-haltigem Material mit reichlich Wasser nachgespült werden.

Die Entsorgung aller Proben und Testmaterialien sollte entsprechend der gesetzlichen Richtlinien erfolgen.

11. Literatur

Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. Detection of weak and incomplete Rh agglutinins; A new test. Lancet 1945; ii:15

Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete antibodies. Brit J Exp Pathol 1945; 26:255.

Garratty G, Petz LD. The significance of red cell bound complement components in the development of standards and quality assurance for the anti-complement components of antiglobulin sera. *Transfusion* 1976; 19:688-694.

Howell P, Giles CM. A detailed serological study of five anti-Jk^a sera reacting by the antiglobulin technique. *Vox Sang* 1983; 45:129-138.

ISBT/ICSH Working Party. International reference polyspecific anti-human globulin reagents. *Vox Sang* 1987; 53:241-247.

Issitt PD. *Applied Blood Group Serology*. 4th edition. Montgomery Scientific, Durham, SC. 1998.

Lachmann PJ, Pangburn MK, Oldroyd RG. Breakdown of C3 after complement activation. *J Exp Med* 1982; 156:205-216.

Moore BPL. *Serological and Immunological Methods of the Canadian Red Cross Blood Transfusion Service*. 8th Edition. Toronto: Hunter Rose, 1980.

Voak D, Downie DM, Moore BPL et al. Quality control of anti-human globulin tests: use of replicate tests to improve performance. *Bio Bull*. 1986; 1:41-52.

Wright MS, Issitt PD. Anticomplement and the indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1979; 19:688-694.

Walker RH, ed. *Technical Manual*. 13th Edition. American Association of Blood Banks. Bethesda, MD. 2000.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495.

FDA Docket No. 84S-0182 Recommended methods for evaluating potency, specificity and reactivity of Anti-Human Globulin. Draft March 1992.

Gebrauchsinformation	Version: 1/2015 / Stand: 2015-07
----------------------	----------------------------------



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404/925-0
Fax: +49 (0) 6404/925-250

www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:

Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com

EN INSTRUCTIONS FOR USE**Anti-Human-Globulin GREEN
(IgG + C3d) monoclonal****CE 0123****REF 6912** 1 x 10 ml**REF 6913** 10 x 10 ml

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

1. Description of product

The polyspecific Anti-Human-Globulin GREEN is prepared by blending cell culture supernatants produced by individual murine hybridoma cell lines. The final product contains material from two Anti-IgG cell lines (5H4 und 8D2-8), one Anti-C3c cell line (86 5A2) and one Anti-C3d cell line (139 4B4). This reagent is blended to react optimally with cells coated with IgG and/or C3 (C3b and/or C3d). The diluent used for this reagent contains sodium chloride, bovine serum albumin and selected buffers. Sodium azide, at a final concentration of 0.1%, is added as an antimicrobial agent. The polyspecific Anti-Human-Globulin GREEN contains Acid Blue #1 and Acid Yellow #23 as colouring agents.

Anti-Human-Globulin is used in a Direct Antiglobulin Test (DAT) and in an Indirect Antiglobulin Test (IAT). A Direct Antiglobulin Test is used to detect antibodies and/or complement bound to red cells in vivo. Direct antiglobulin test results may support the diagnosis of Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA), Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN) and Delayed Hemolytic Transfusion Reactions (DHTR).

An Indirect Antiglobulin Test detects antibodies and/or complement bound to red cells in vitro. This technique is used in tests for weak D, crossmatch tests, detection and identification of unexpected blood group antibodies and red cell phenotyping.

Antiglobulin tests are also used by suspicion on drug induced red cell sensitization.

Anti-IgG, Anti-C3b and Anti-C3d potencies are assessed in serological tests with red cells coated specifically with IgG or C3 according to approved test procedures. Defined specificity is verified by tests against a variety of cells coated with different human proteins. The absence of contaminating heteroagglutinins is confirmed in serological tests against unsensitized cells of all ABO groups. The absence of detectable Anti-C4 is verified in serological tests against cells coated with C4b and C4d. This reagent reacts specifically with red cells coated with human IgG and/or C3 (C3b and C3d) when used in accordance with the recommended Instructions for Use.

2. Principle of the test

Antiglobulin tests detect human complement or human IgG bound in vivo or in vitro to red cells with the aid of anti-human globulins. The anti-human globulins contained in this reagent are monoclonal antibodies produced by hybridoma cells. The hybridoma cells derive from mice immunized with human complement or human immunoglobulins.

The anti-human globulins will react with human complement and/or human immunoglobulins whether bound to the red cell membrane or present in the fluid phase. For the specific detection of red cell bound complement and/or immunoglobulins only, free serum immunoglobulins/complement must first be removed by a series of sequential wash procedures to ensure that only cell bound immunoglobulins/complement is present to react with the anti-human globulins. If red cells are coated with immunoglobulins/complement, anti-human globulins will bind specific to these proteins and forming bridges between the red cells. This

reaction is optically recognizable by the agglutination of the red cells. If the red cells are not coated, no reaction can occur with the anti-human globulins and therefore no agglutination take place.

3. Storage and Shelf Life

Store Anti-Human-Globulin GREEN (IgG + C3d) monoclonal at 2...8°C. Do not freeze! Allow the reagent to equilibrate to ambient room temperature (18...25°C) prior to use. Return reagent to 2...8°C for storage as appropriate, immediately after use.

Once Anti-Human-Globulin GREEN (IgG + C3d) monoclonal has been opened the first time, the reagent may be used up to the expiration date indicated on the label if the specified storage conditions are observed and no turbidity or other signs of contamination are observed. Do not use the reagent after the expiry date printed on the label.

Do not use contaminated reagents!

4. Specimen Preparation

No special preparation of the patient/donor is required prior to specimen collection. Blood samples should be collected by approved medical procedures.

Direct Antiglobulin Test: To prevent significant in vitro fixation of complement, anticoagulated blood should be collected into EDTA, thereby allowing the specific detection of in vivo red cell complement sensitization. Other anticoagulants such as ACD or CPD may be less effective than EDTA, but remain acceptable for use. Blood samples should be tested as soon as possible following collection. If only clotted blood is available, it should not be refrigerated prior to direct antiglobulin testing (refer to Important Directions/Limitations of Procedure).

Indirect Antiglobulin Test: Serum samples should be prepared from freshly drawn clotted blood. Plasma should not be used if optimal detection of complement-binding red cell antibodies is desired, since complement activation by blood group antibodies may be inhibited by the action of some anticoagulants that chelate Ca^{++} - and Mg^{++} ions. Active serum complement levels are depleted during storage, therefore optimal detection of complement-binding antibodies is achieved by testing serum from freshly drawn blood samples. If unavoidable delays in testing occur, the serum should be separated from the red cells and stored at 2...8°C for no more than 48 hours. Alternatively, the serum may be frozen. Plasma may be used if serum is unavailable and/or the test is performed solely to detect IgG sensitization.

5. Additional materials required

Isotonic saline, pH 6.5 – 7.5

Test tubes (75 x 12 mm), glass

Single-use Pasteur pipettes

Waterbath/Incubator (37°C ± 1°C)

Centrifuge (900 – 1000 rcf)

Reagent red blood cells with known phenotype for antibody detection and identification

Control cells sensitized with IgG (Coombs Control)

6. Test procedure

Direct Antiglobulin Test

1. Wash the test red cells at least once in isotonic saline and prepare a 2 - 5% red cell suspension in isotonic saline.
2. Add 1 - 2 drops (~ 40 – 100 µl) of the washed, 2 - 5% red cell suspension to an appropriately labeled test tube.
3. Wash the red cells at least three times with large volumes of isotonic saline. Decant supernatant saline completely following each wash and ensure thorough resuspension and mixing of red cells with each new addition of saline for subsequent washes.

4. Following the final wash, completely decant the supernatant saline to ensure removal of all residual saline and a resultant „dry“ red cell button.
5. Add 2 drops (~ 80 – 100 µl) of Anti-Human-Globulin GREEN (IgG + C3d) monoclonal to each tube containing a “dry“ button of washed red cells and mix gently, but thoroughly, to resuspend the red cells.
6. Centrifuge for 15 seconds at 900 – 1000 rcf or of equivalent force with adapted time.
7. Gently resuspend the red cell button and examine for agglutination.
8. Negative or weak positive antiglobulin test results should be appropriately controlled by the addition of IgG sensitized reagent control cells (refer to the relevant manufacturer's Instructions for Use for IgG sensitized control cells).

Please note:

A microscope or other optical aid, may be used to confirm weak or negative hemagglutination reactions.

The strength of anti-complement reactions may be enhanced following a 5 – 10 minute incubation at room temperature (~ 18...25°C) with subsequent re-centrifugation, as outlined above (steps 6 and 7). However, the immediate spin phase should never be omitted since anti-IgG reactions may be adversely affected by incubation and/or re-centrifugation.

As routine control the Anti-Human-Globulin should be tested against red cells weakly sensitized with IgG and against red cells coated with either C3b or C3d. Unsensitized red cells should be tested in parallel as a negative control.

Indirect Antiglobulin Test

For Antibody Detection, Identification or Compatibility Testing

Please note:

The following test method is recommended only as a guide. Modifications to the test procedure following accepted and well documented immunohematology practices (such as an increase in serum:cell ratio and/or incubation time) may be desirable to comply with the requirements of individual laboratories. However, the application of low ionic strength antibody enhancement or potentiating reagents requires strict adherence to the respective manufacturer's recommended Instructions for Use. Red cell phenotyping with specific Blood Grouping Reagents should be performed in accordance with the manufacturer's Instructions for Use. User-defined modifications to test procedure may require validation.

The following is one example of a commonly used test protocol that may be used for antibody detection, antibody identification or compatibility testing:

1. Appropriately label one test tube for each donor cell, Screening Cell or Panel Cell to be tested.
2. Dispense at least 2 drops (~ 80 - 100 µl) of serum and 1 drop of a 2 - 5% donor cell or reagent red cell (Screening Cell or Panel Cell) suspension to the appropriate test tube and mix thoroughly.
3. Centrifuge for 15 seconds at 900 – 1000 rcf or of equivalent force with adapted time.
4. Examine supernatant for visible hemolysis.
5. Gently resuspend the red cell button and examine macroscopically for agglutination.
6. Mix tube contents again and incubate test tubes at 37°C ± 1°C for 15 – 60 minutes.
7. Centrifuge for 15 seconds at 900 – 1000 rcf or of equivalent force with adapted time.
8. Examine supernatant for visible hemolysis.
9. Gently resuspend the red cell button and examine macroscopically for agglutination.
10. Mix tube contents gently, but thoroughly, and wash red cells 3 – 4 times with isotonic saline. Decant supernatant saline completely following each wash and ensure thorough resuspension and mixing of red cells with each new addition of saline for subsequent washes.
11. Following the final wash, completely decant the supernatant saline to ensure removal of all residual saline and a resultant “dry“ red cell button.

12. Add 2 (~ 80 – 100 µl) drops Anti-Human-Globulin GREEN (IgG + C3d) monoclonal to each tube containing a “dry” button of washed red cells and mix gently, but thoroughly, to resuspend red cells.
13. Centrifuge for 15 seconds at 900 – 1000 rcf or of equivalent force with adapted time.
14. Gently resuspend the red cell button and examine macroscopically for agglutination.
15. Negative or weak positive antiglobulin test results should be appropriately controlled by the addition of IgG sensitized reagent control cells (refer to the relevant manufacturer's Instructions for Use for IgG sensitized control cells).

Please note:

A microscope or other optical aid, may be used to confirm weak or negative hem-agglutination reactions.

As routine control the Anti-Human-Globulin should be tested against red cells weakly sensitized with IgG and against red cells coated with either C3b or C3d. Unsensitized red cells should be tested in parallel as a negative control.

In other than low ionic test systems, it is a common and well-documented practice to increase the quantity of serum used in the test system (increase in serum:cell ratio) and/or to increase the incubation time beyond 15 minutes in order to increase the sensitivity of antibody detection/identification test procedures. When using low ionic enhancement techniques, however, the low ionic reagents must be used exactly as outlined in the respective Instructions for Use.

7. Interpretation Of Test Results

Agglutination of test red cells in the antiglobulin test phase of the direct or indirect antiglobulin test procedure constitutes a **positive test result** and, within the accepted limitations of the test procedure, indicates the presence of IgG and/or complement (C3) on the red cells.

No agglutination of test red cells in the antiglobulin test phase of the direct or indirect antiglobulin test procedure constitutes a **negative test result** and, within the accepted limitations of the test procedure, indicates the absence of serological detectable IgG or complement (C3) on the red cells.

When the controls react as followed, the test results cannot be interpreted:

- no agglutination with IgG sensitized cells added to a negative antiglobulin test
- no agglutination with control red cells weakly sensitized with IgG
- no agglutination with control red cells coated with C3b or C3d
- agglutination with unsensitized red cells

The limitations of the procedure must be considered when interpreting the results (see 9. Important directions/limitations of procedure).

8. Stability of the reactions

All test results should be interpreted immediately upon completion of the test.

9. Important Directions/Limitations of Procedure

1. Anti-Human-Globulin GREEN (IgG + C3d) monoclonal is designed for in vitro diagnostic use only and should be used by properly trained staff.
2. Positive direct antiglobulin test (DAT) results associated with complement sensitization may not reflect in vivo complement fixation if the test cells are from a previously refrigerated clotted blood sample.
3. Omission of the 5 – 10 minute incubation phase with subsequent re-centrifugation (for optimal detection of weak complement sensitization in the direct antiglobulin test (DAT) procedure) may result in weak or false negative results.
4. A negative direct antiglobulin (DAT) test result does not necessarily preclude clinical diagnosis of ABO Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN) or Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA).

5. Red cells with a positive direct antiglobulin test (DAT) result cannot be used in indirect antiglobulin test procedures.
6. Certain disease states and medication therapy may be associated with positive direct and/or indirect antiglobulin tests.
7. Weak or false negative antiglobulin test results may occur due to inactivation by residual human serum protein following inadequate wash procedures or dilution of the Anti-Human-Globulin reagent associated with excess residual saline following wash procedures.
8. Procedural delays in antiglobulin test performance may result in weak or false negative results. Anti-IgG reactions, in particular, may be adversely affected by incubation and/or re-centrifugation.
9. Overly vigorous or inappropriate resuspension of red cells in antiglobulin test procedures may result in weak or false negative results.
10. To minimize risks for false results, this reagent must not be used when cold. Ensure that this reagent, specimen to be tested and control reagents are allowed to equilibrate to ambient room temperature (18...25°C) prior to testing.
11. False results may occur with specimen that have been subjected to prolonged and/or inappropriate storage conditions or if improper specimens are used.
12. Other variables such as improper technique, inappropriate centrifugation or incubation, improperly cleaned glassware, incorrect saline pH and/or contaminated materials may cause false negative or false positive results.
13. The centrifugal force applied should be the minimum required to produce a clear supernatant and a clearly delineated red cell button that can be easily resuspended. No single centrifugation speed or time can be recommended for all types of available centrifuges or test applications. Centrifuges should be calibrated individually to determine the optimal time and speed required to achieve the desired results.
14. Contamination of Anti-Human-Globulin with human serum may cause reagent neutralisation. Microbial contamination of Anti-Human-Globulin must be avoided as this may reduce the shelf life of the product and cause erroneous results. Do not use the reagent if marked turbidity or other observable indications of product alteration occur. These signs may indicate microbial contamination and/or product deterioration.
15. The use of green Anti-Human-Globulin does not preclude the necessity for adequate control and confirmation of antiglobulin reactivity. This dye provides a visual indication that the antiglobulin reagent has been added, but does not assure the reactivity of the reagent.
16. For interpretation of the test results, consider if transfusion or transplantation had happened. Take the case history of the transfusion or transplantation and also medicaments into consideration.
17. Do not dilute Anti-Human-Globulin GREEN (IgG + C3d) monoclonal. Use as supplied and as described in this Instructions for Use.
18. Deviation from the recommended Instructions for Use may result in less than optimal product performance. User-defined modifications to test procedures may require validation.

10. Warnings and instructions for disposal

All materials of biological origin used for the test, especially the human specimen to be tested, should be regarded as potentially infectious. The absence of murine virus has not been determined. Any bovine source material used in the manufacture of this product is sourced from donor animals that have been inspected and certified by US veterinary service inspectors to be disease-free. This ruminant-based product is deemed to have low TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) risk.

When handling biological material appropriate safety precautions are recommended (do not pipette by mouth; wear disposable gloves while handling biological material and performing the test; disinfect hands when finished the test).

Biological material should be inactivated before disposal (e.g. in an autoclave). Disposables should be autoclaved or incinerated after use. Spillage of potentially infectious materials

should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated areas swabbed with a suitable standard disinfectant or 70% alcohol. Material used to clean spills, including gloves, should be inactivated before disposal (e.g. in an autoclave).

The dropper bulbs of these product contain natural rubber latex, which is known to cause allergic reactions in some individuals.

The reagent contains 0.1% NaN₃ as preservative. Sodium azide is toxic. Do not ingest, avoid contact with the skin and mucous membranes. The copper and lead used in some plumbing systems can react with azides to form explosive salts. Therefore, when disposing of azide-containing materials, they should be flushed away with a large volume of water.

The disposal of all samples and test materials should be carried out according to legal directives.

11. References

Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. Detection of weak and incomplete Rh agglutinins; A new test. *Lancet* 1945; ii:15

Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete antibodies. *Brit J Exp Pathol* 1945; 26:255

Garratty G, Petz LD. The significance of red cell bound complement components in the development of standards and quality assurance for the anti-complement components of antiglobulin sera. *Transfusion* 1976; 19:688-694

Howell P, Giles CM. A detailed serological study of five anti-Jk^a sera reacting by the antiglobulin technique. *Vox Sang* 1983; 45:129-138

ISBT/ICSH Working Party. International reference polyspecific anti-human globulin reagents. *Vox Sang* 1987; 53:241-247

Issitt PD. *Applied Blood Group Serology*. 4th edition. Montgomery Scientific, Durham, SC. 1998

Lachmann PJ, Pangburn MK, Oldroyd RG. Breakdown of C3 after complement activation. *J Exp Med* 1982; 156:205-216

Moore BPL. *Serological and Immunological Methods of the Canadian Red Cross Blood Transfusion Service*. 8th Edition. Toronto: Hunter Rose, 1980

Voak D, Downie DM, Moore BPL et al. Quality control of anti-human globulin tests: use of replicate tests to improve performance. *Bio Bull*. 1986; 1:41-52

Wright MS, Issitt PD. Anticomplement and the indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1979; 19:688-694

Walker RH, ed. *Technical Manual*. 13th Edition. American Association of Blood Banks. Bethesda, MD. 2000

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495













FDA Docket No. 84S-0182 Recommended methods for evaluating potency, specificity and reactivity of Anti-Human Globulin. Draft March 1992

Instructions for Use	Version 1/2015 / Issue: 2015-07
----------------------	---------------------------------

Instructions for use in other languages see:

<http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/>

or phone +49 (0) 6404-925-125

Erklärung der Symbole auf den Etiketten / <i>Explanation of symbols used on Labelling</i>	
	In-vitro-Diagnostikum / <i>For in vitro diagnostic use</i>
	Lagertemperatur / <i>Storage temperature</i>
	Lot-Nr. / <i>Batch code</i>
	Verwendbar bis / <i>Use by</i>
	Bestell-Nr. / <i>Catalogue number</i>
	Gebrauchsinformation beachten / <i>Consult instructions for use</i>
	Monoklonal / <i>Monoclonal</i>
	Klon / <i>Clone</i>
	Ursprung: Maus / <i>Origin: mouse</i>
	Enthält Natriumazid / <i>Contains Natriumazide</i>
	Titer / <i>Titer</i>
	Achtung / <i>Warning</i> R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. / <i>Harmful if swallowed.</i>



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 0

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 250

www.bag-healthcare.com

info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 450

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 460

verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 125

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 421

service@bag-healthcare.com