**Anti-C (Anti-RH2) (monoclonal)**

**Anti-E (Anti-RH3) (monoclonal)**

**Anti-c (Anti-RH4) (monoclonal)**

**Anti-e (Anti-RH5) (monoclonal)**

For Slide, Tube, Card Test and Microplate

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

**INTENDED USE**

Monoclonal agglutinating Anti-C, -c, -E, -e – testsera are produced from cell culture supernatants of heterohybridoma-cell lines. The cells are secreting an antibody of IgM-type, that reacts specific with the corresponding antigen. The antibody is human protein. The testsera are used to determine whether red blood cells possess or lack the corresponding blood group antigens. The testsera are intended be used by qualified and

technical personnel only.

**PRINCIPLE OF PROCEDURE**

The procedures used with these reagents are based on the principle of agglutination.

Normal human erythrocytes, possessing the corresponding antigen, will agglutinate in the presence of the

specific antibody directed toward the antigen.

**REAGENTS**

The listed reagents are available in two different variations (all agglutinating, monoclonal, human IgM). The

differences depend on cell clones only:

Anti-C (clones MS-24, P3x25513G8) Anti-E (clones MS-258, 906)

Anti-C (clone MS-273) Anti-E (clones MS-12, MS-260)

Anti-c (clone MS-33) Anti-e (clones MS-16, MS-21, MS-63)

Anti-c (clone MS-35) Anti-e (clones MS-62, MS-69)

All these reagents contain <0.1% (w/v) sodium azide as preservative. Additionally the reagents are prepared

of active antibody, sodium chloride, macromolecules and bovine albumin.

**WARNING**

These reagents were prepared from supernatants of cell cultures. As biological products it should be looked

upon as potentially infectious because of never complete exclusion of danger through excitants of disease.

The reagents contain sodium azide, that may be toxic and may react with lead or copper to form highly explosive

salts. Because of these reasons reagents should be handled with proper care.

**STORAGE REQUIREMENT**

Store at 2 to 8°C. May be at room temperature (15 to 30°C) while in use. In principle, store and use the reagents

to declared expiry date only. At keeping of storage conditions after bottle opening keep performance data to a validity expiration date.

**REMARKS**

1. Strength of positive reactions also depends on age of used blood

2. With each testing positive and negative controls should be performed.

3. Inappropriate storage impairs efficacy of the reagent.

4. Centrifugation highly different from appointed relative centrifugal force may lead to false results

5. Blood samples to be tested should be used as soon as possible. If a delay in testing occurs, samples

should be stored at 2 to 8°C. Blood drawn into sodium citrate or EDTA should be tested within 14 days.

Blood obtained by finger puncture may be tested directly by the slide method but, to avoid clotting, blood

collected in this manner should be mixed quickly with the reagent.

6. The procedures identified below are for manual testing only. When using automated or semi-automated

instruments, follow the procedures that are contained in the operator’s manual provided by the device

manufacturer. Laboratories must follow approved validation procedures to demonstrate compatibility of this

product on automated systems.

7. For usage of this testsera all effective national laws, directives and guidelines have to be observed, in

Germany especially the „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von

Blutprodukten (Hämotherapie)“.

**REAGENT PREPARATION**

There is no preparation of the reagents required. Use reagents directly from the vials.

**PROCEDURE**

Not provided material, additionally needed

at Slide Method: Glass slide; Pasteur pipette; Mixing stick

at Tube Centrifugation Method: Test tubes, 10 x 75 mm or 12 x 75 mm; Pipettes designed to deliver

approximately 100 μL; Centrifuge; Isotonic saline (with 0,85 - 0,9% sodium chloride)

at Card Method: Cards (DiaMed ID-Card “NaCl, enzyme test and cold agglutinins”, BIORAD

„Scangel neutral“; Ortho Clinical Diagnostics „Biovue System Reverse Diluent” or Diagnostic Grifols

„DG Gel Neutral“);Pipettes; Card Centrifuge; card specific diluent.

at Microplate Method: microplate with 96 U wells; Pipettes designed to deliver approximately

100 μL; Centrifuge; Shaker; Isotonic saline (with 0,85 - 0,9% sodium chloride)

**Test procedure**

**Slide Method**

1. Use erythrocyte sediment or whole blood only.

2. Place one drop (approximately 50 μL) of appropriate reagent on a glass slide.

3. Using a Pasteur pipette add one drop erythrocyte sediment or whole blood (approximately

50 μL) to the glass slide.

4. Mix the erythrocytes with reagent well with a stick and spread to a circle (diameter 2 cm)

5. By slightly rotating the slide, check for agglutination within 1 minute (reaction starts within seconds). Unspecific

reactions might appear due to drying of the reaction-formation or if the slide is heated.

**Tube Centrifugation Method**

1. Use a 2% to 5% suspension of red blood cells in isotonic saline (cells washed one time or up to three times

with isotonic saline) only.

2. Add 100 μL (alternative: one drop = approximately 50 μL) of appropriate reagent to each tube

3. Add 100 μL (alternative: one drop = approximately 50 μL) of appropriate cell suspension to each tube

4. Mix well by slightly shaking.

5. Incubate tube at room temperature (15 to 30 °C) for 15 min.

6. Centrifugation of tube for 1 minute at 2.000 rpm (approximately 800-1.000 x g).

7. Gently resuspend the red cells and check macroscopically for agglutination within 3 minutes. Document the

result.

**Card Method**

1. Use 0,8 % suspension of red blood cells in card specific diluent.

2. Add 50 μL of appropriate cell suspension to each micro tube.

3. Add 25 μL of appropriate testserum to each micro tube (alternative one drop). If automated techniques are

used add 10 μL testserum. The use of 10 μL testserum is possible in hand method too.

4. Centrifugation of card in appropriate card centrifuge after latest 30 minutes.

5. Check macroscopically for agglutination within 30 minutes. Document the result.

**Microplate Method**

1. Use 2% suspension of red blood cells in isotonic saline (cells may be washed one time or up to three times

with isotonic saline).

2. Add 50 μL of appropriate cell suspension to each well.

3. Add 50 μL of appropriate testserum to each well.

4. To mix both 30 seconds on shaker with maximum speed.

5. Centrifugation of plate in appropriate centrifuge for 30 seconds at 400 x g.

6. For 30 seconds on shaker with medium speed, check macroscopically for agglutination. Document the

result.

**INTERPRETATION OF RESULTS**

" Slightly rotating / shaking " at Slide Method / at Tube Centrifugation Method

Positive results (+): visible agglutination of erythrocytes is a positive result and indicates the presence of the

corresponding antigen.

Negative results (-): No visible agglutination of erythrocytes is a negative result and indicates the absence of

the corresponding antigen.

Reading and interpretation of gel cards has to be done as described in inserts of the card used.

**LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

1. Inaccuracy at compliance with instructions written under section “Procedures” and “Interpretation of results”

may lead to incorrect results.

2. No valid conclusion concerning the test result can be reached, if controls with uncertain or false results

occur.

3. Enzyme treated erythrocytes may react unspecific.

4. Due to variability of antigen expression, reactivity of these reagents against certain phenotypes may give

weaker reactivity compared to control cells.

5. Red blood cells coated with alloantibodies or autoantibodies of the same or similar specificity as

the reagent (i.e., cells that are positive in the direct antiglobulin-test (DAT)) may give weak

reactions. In extreme cases, false-negative results may occur.

6. Red blood cells coated with antibodies (cells that are positive in the direct antiglobulin-test (DAT)) may give

false-positive results in card method. These cells react positive without testserum too.

7. Pay attention to all statements to limitations in inserts of used gel cards.

8. Negative test results with anti-e (clones: MS-62, MS-69) in microplate method have to be confirmed by an

other technique, as false negative results may occur.

9. With cord cells anti-c (clone: MS-33) may possess anti-I/i cold agglutinin activity and therefore show false

positive results.

## Анти-C (Анти-RH2) (моноклональный)

## Анти-E (Анти-RH3) (моноклональный)

## Анти-c (Анти-RH4) (моноклональный)

## Анти-e (Анти-RH5) (моноклональный)

Для работы: на плоскости, в пробирке, в гелевых картах, в микроплатах

Только для диагностики in vitro

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Моноклональные агглютинирующие тест-сыворотки Анти-С,-с,-Е,-е изготовлены из надосадочных жидкостей клеточных культур гетерогибридом. Клетки продуцируют антитела класса IgM, которые специфично взаимодействуют с соответствующими антигенами. Антитело является человеческим белком. Тест-сыворотка определяет наличие или отсутствие соответствующих антигенов. Тест-сыворотка может использоваться только квалифицированным персоналом.

**ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование с использованием данных реагентов основано на принципе агглютинации. Нормальные человеческие эритроциты, обладающие соответствующим антигеном, агглютинируют в присутствии специфического антитела, направленного против антигена.

**РЕАГЕНТЫ**

Перечисленные реагенты содержат антитела следующих клеточных клонов:

Анти-C (клоны MS-24, P3x25513G8) Анти-E (клоны MS-258, 906)

Анти-C (клон MS-273) Анти-E (клоны MS-12, MS-260)

Анти-c (клон MS-33) Анти-e (клоны MS-16, MS-21, MS-63)

Анти-c (клон MS-35) Анти-e (клоны MS-62, MS-69)

Все реагенты содержат <0,1 % азида натрия в качестве консерванта. Также реагенты содержат активные антитела, хлорид натрия, макромолекулы и альбумин бычьей крови.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**

Данные реагенты изготовлены из надосадочных жидкостей клеточных культур. Данный биологический продукт следует рассматривать в качестве потенциально инфицированного, не исключайте опасности заражения вследствие наличия возбудителей заболевания. Реагент содержит азид натрия, который может быть токсичным и реагировать со свинцом или медью, образуя взрывоопасные соединения. Вследствие этого эти реагенты должны использоваться с большой осторожностью.

**УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ**

Хранить при температуре 2 – 8°С. В процессе использования могут находиться при комнатной температуре (15 – 30°С). Храните и используйте реагенты до указанной даты истечения срока годности. При соблюдении условий хранения после вскрытия флакона сохраняют рабочие характеристики до даты истечения срока годности.

**ПРИМЕЧАНИЯ**

1. Сила положительной реакции зависит от возраста используемой крови
2. В каждом исследовании должен выполняться положительный и отрицательный контроль.
3. Ненадлежащее хранение способствует снижению активности реагента.
4. Сила центрифугирования, отличная от указанной, может привести к неправильным результатам.
5. Образцы крови по возможности должны быть исследованы как можно быстрее. Если исследования задерживаются, образцы должны храниться при температуре 2 – 8°С. Кровь с цитратом натрия или ЭДТА должна исследоваться в течение 14 дней. Взятая из пальца кровь может быть исследована на плоскости, но, во избежание образования сгустков, такая кровь должна быть как можно быстрее смешана с реагентом.
6. Исследования, описанные ниже, подходят только для ручного метода. При использовании автоматического и полуавтоматического оборудования следуйте предоставленному производителем Руководству по использованию инструмента. Сотрудники лабораторий должны следовать установленным системам оценки исследований, чтобы удостовериться в идентичности результатов, полученных ручным и автоматическим методом.
7. Перед использованием данной тест-сыворотки нужно ознакомиться с соответствующими национальными законами: приказами, директивами, инструкциями. (В оригинальных инструкциях дана ссылка на соответствующие немецкие законодательные акты).

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТА**

Реагенты готовы к применению. Используйте реагенты прямо из флаконов.

**ИССЛЕДОВАНИЕ**

Реагент не обеспечен материалом, дополнительно требуются:

**Для метода на плоскости:** Планшет, пипетка Пастера, Палочки для смешивания.

**Для метода центрифугирования в пробирке:** Пробирки 10 х 75 или 12 х 75 мм, пипетки с возможностью дозирования 100 мкл, центрифуга, изотонический раствор (0,85 – 0,9 % натрия хлорида).

**Для гелевого метода:** Гелевые карты (DiaMedID-Card «NaCl, ферментный тест и холодовая агглютинация», BIO-RAD «Scangel neutral», Grifols «DG Gel Neutral» или Ortho Clinical Diagnostics «Biovue System Reverse Diluent», Пипетка, позволяющая дозировать микролитры, Центрифуга для гелевых карт, раствор для гелевых карт).

**Для работы в микроплатах:** микроплата с 96 U-образными лунками, Пипетка, позволяющая дозировать микролитры, Центрифуга, Шейкер, изотонический раствор (0,85 – 0,9 % натрия хлорида).

**Алгоритм исследования**

**Метод на плоскости**

1. Используйте осадок эритроцитов или цельную кровь.
2. Поместите одну каплю (приблизительно 50 мкл) соответствующего реагента на планшет.
3. Используя пипетку Пастера, добавьте одну каплю осадка эритроцитов или цельной крови (приблизительно 50 мкл) на планшет.
4. Тщательно смешайте эритроциты с реагентом и сформируйте круг (диаметром 2 см).
5. Осторожно вращая планшет, проверьте агглютинацию в пределах 1 минуты (реакция начнется в течение нескольких секунд). Неспецифические реакции могут возникнуть при высыхании реактивной формации или нагревания.

**Метод центрифугирования в пробирке**

1. Используйте 2 % или 5 % суспензию эритроцитов в изотоническом растворе (эритроциты, однократно или многократно промытые изотоническим раствором).
2. Добавьте 100 мкл (одна капля = примерно 50 мкл) соответствующего реагента в каждую пробирку.
3. Добавьте 100 мкл (одна капля = примерно 50 мкл) соответствующей суспензии эритроцитов в каждую пробирку.
4. Хорошо перемешайте путем легкого встряхивания.
5. Инкубируйте пробирку при комнатной температуре (15 – 30°С) в течение 1 – 15 мин.
6. Центрифугируйте пробирки 1 мин при 2000 об./мин (примерно 800 – 1000 г).
7. Осторожно ресуспензируйте эритроциты и наблюдайте агглютинацию в пределах 3 мин. Запишите результат.

**Гелевый метод**

1. Используйте 0,8 % суспензию эритроцитов в растворе для гелевых карт.
2. Добавьте 50 мкл соответствующей суспензии эритроцитов в каждую микропробирку.
3. Добавьте 25 мкл соответствующей тест-сыворотки в каждую микропробирку. Если используется автоматический метод, добавляется 10 мкл тест-сыворотки. Вообще, 10 мкл может быть использоваться и в ручном методе.
4. Центрифугируйте карты в соответствующей центрифуге не позднее 30 минут.
5. Наблюдайте агглютинацию в пределах 30 мин. Запишите результат.

**Работа в микроплатах**

1. Используйте 2 % суспензию эритроцитов в изотоническом растворе (эритроциты могут быть однократно или до 3-х раз промытые изотоническим раствором).
2. Добавьте 50 мкл соответствующей суспензии эритроцитов в каждую лунку.
3. Добавьте 50 мкл соответствующей тест-сыворотки в каждую лунку.
4. Смешивайте в течение 30 сек на шейкере с максимальной скоростью.
5. Центрифугируйте микроплату в соответствующей центрифуге в течение 30 сек при 400 х г.
6. Шейкируйте 30 мин со средней скоростью, наблюдайте агглютинацию. Запишите результат.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Легкое вращение/встряхивание в **методе на плоскости/центрифугировании в пробирке:**

Положительный результат (+): видимая алллютинация эритроцитов является положительным результатом и показывает наличие соответствующего антигена.

Отрицательный результат (-): отсутствие видимой алллютинации эритроцитов является отрицательным результатом и показывает отсутствие соответствующего антигена.

Считывание и интерпретация результатов, полученных на гелевых картах, проводится согласно инструкциям по использованию карт.

**ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА**

1. Неточное выполнение разделов «Исследование» и «Интерпретация результатов» может привести к неправильным результатам.
2. Неправильного заключения по результатам исследования можно избежать, если ставить одновременно контроль.
3. Обработанные ферментом эритроциты могут давать неспецифическую реакцию.
4. Из-за разной экспрессии эритроцитов действенность этих реагентов против определенных фенотипов может дать более слабую реакцию по сравнению с контрольными клетками.
5. Эритроциты, покрытые алло- или аутоантителами такой-же как реагент или подобной специфичности (т.е. клетки, дающие положительную реакцию в прямом антиглобулиновом тесте) могут дать ослабленную реакцию. В исключительных случаях могут наблюдаться ложно-положительные реакции.
6. Эритроциты, покрытые антителами (клетки, дающие положительную реакцию в прямом антиглобулиновом тесте), могут давать ложноположительные результаты в гелевой методике. Данные эритроциты дают положительную реакцию и без добавления тест-сыворотки.
7. Обращайте внимание на ограничения, указанные в инструкциях к гелевым картам.
8. Отрицательные результаты с Тест-сывороткой Анти-е (клоны MS-62, MS-69), полученные при работе в микроплатах, должны быть подтверждены другими методами, т.к. могут быть получены ложно-отрицательные результаты.
9. С пуповинной кровью Тест-сыворотка Анти-с (клон: MS 33) может дать anti-I/i холодовую агглютинацию и поэтому показать ложно-положительные результаты.

ANTITOXIN GmbH

Industriestrasse 88,

69245 Bammental, Deutschland

730-13-0511 Версия 011 / Июль 2007