

DE

GEBRAUCHSINFORMATION

# BAG-Elutions-Kit

## für die Säure-Elution von Antikörpern

IN VITRO DIAGNOSTIKUM



REF 69501

### 1. Produktbeschreibung

Mit dem BAG-Elutions-Kit können Antikörper, die sich in vivo oder in vitro an Erythrozyten angelagert haben, in einem Elutionsprozess dissoziiert und dann in einem separaten Verfahren identifiziert werden. Das gewonnene Eluat kann verwendet werden, um

1. einen einzelnen Antikörper in Seren, die eine Mischung von Antikörpern verschiedener Spezifitäten enthalten, zu identifizieren,
2. schwache Antigene nachzuweisen,
3. Antikörper nachzuweisen, die für einen positiven direkten Coombstest (DAT) bei erworbener hämolytischen Anämie oder bei einem Transfusionszwischenfall verantwortlich sind,
4. Antikörper zu identifizieren, die einen Morbus haemolyticus neonatorum verursachen.

### 2. Testprinzip

Die mit Antikörpern beladenen Erythrozyten werden mit einem Waschpuffer, der die Gefahr der Ablösung der gebundenen Antikörper von den Erythrozyten vermindert, gewaschen, um nicht gebundene Antikörper aus der Probe zu entfernen. Nach dem Waschen wird zu den beladenen Erythrozyten eine Lösung mit niedrigem pH-Wert (Elutionslösung) gegeben, durch die es zu einer Dissoziation des Antikörper-Antigen-Komplexes kommt. Der pH-Wert des erhaltenen Eluats wird dann durch Zugabe eines Neutralisationspuffers eingestellt. Das Eluat ist dann gebrauchsfertig.

### 3. Inhalt des Kits

WASHBUF   10x	Waschpuffer, 10 x Konzentrat; leicht gelblich enthält Rinderalbumin und < 1% NaN <sub>3</sub> ⚠	1 x 50 ml
SOLN   ELU	Elutionslösung, gebrauchsfertig; orange-gelb Glycin-Puffer mit einem niedrigen pH-Wert, enthält einen pH-Farbindikator und keine Konservierungsmittel oder antimikrobiellen Substanzen (Tropfeinsatz und Deckel: orange)	1 x 13 ml
BUF	Neutralisationspuffer, gebrauchsfertig; hellblau Tris-Puffer, enthält < 0,1% NaN <sub>3</sub> (Tropfeinsatz und Deckel: blau)	1 x 13 ml

### 4. Lagerung und Haltbarkeit

Das Waschpufferkonzentrat, die Elutionslösung und den Neutralisationspuffer bei 15...30°C lagern. Nicht einfrieren! Die Reagenzien sind bei Einhaltung der angegebenen Lagerbedingungen nach dem ersten Öffnen bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Reagenzien nur verwenden, wenn sie keine Trübungen oder andere Anzeichen für eine Kontamination aufweisen und nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums benutzen.

Die mit Aqua dest. verdünnte Waschpuffer-Gebrauchslösung bei 2...8°C in einem gekennzeichneten verschlossenen Behälter lagern. Nicht einfrieren! Die Gebrauchslösung ist bis zu 6 Monate haltbar, wenn sie bei den angegebenen Lagerbedingungen aufbewahrt wird und keine Trübung oder andere Anzeichen für eine Kontamination aufweist.

Kontaminierte Reagenzien nicht mehr benutzen!

## 5. Proben

Keine hämolytischen oder kontaminierten Proben verwenden! Die Proben sollten, wenn möglich, ohne zeitliche Verzögerung untersucht werden. Eine längere Lagerung kann zu geringeren Ausbeuten bei der Antikörperelution und dementsprechend geringerer Reaktivität des Eluats führen. Außerdem kann es beim Gebrauch von gelagerten Erythrozyten zu hämolytisch verfärbten Eluaten kommen, was die Einstellung des optimalen pH-Wertes erschwert (s. 12. Wichtige Hinweise/Grenzen der Methode).

## 6. Zusätzlich benötigte Materialien

Isotonische NaCl-Lösung, Aqua dest., Gelkarten, Teströhrchen aus Glas für den Einmalgebrauch (75 x 12 mm), Einweg-Pasteur-Pipetten, Wasserbad oder Brutschrank (37°C±1°C), Zentrifuge, Reagenzien für die Testung des Eluats.

## 7. Ansatz der Waschpuffer-Gebrauchslösung

Das Waschpufferkonzentrat **WASHBUF 10x** 1:10 mit Aqua dest. verdünnen (1 Teil Waschpufferkonzentrat und 9 Teile Aqua dest.). Das Waschpufferkonzentrat für die Verdünnung immer abmessen. Die Waschpuffer-Gebrauchslösung kann in einem gekennzeichneten verschlossenen Behälter bei 2...8°C bis zu 6 Monate aufbewahrt werden, wenn keine Trübung oder andere Anzeichen für eine Kontamination beobachtet werden.

Die Verwendung von kalter Waschpuffer-Gebrauchslösung vermindert die Gefahr einer Dissoziation der gebundenen Antikörper während des Waschvorgangs.

## 8. Durchführung der Elution

1. Mit der mit Antikörpern beladenen Erythrozyten-Probe einen direkten Coombstest (DAT) durchführen und das Ergebnis notieren.
2. Die Probe mit den beladenen Erythrozyten in einem sauberen beschrifteten Röhrchen abzentrifugieren. Das überschüssige Plasma oder Serum entfernen und die Erythrozyten einmal mit kalter Waschpuffer-Gebrauchslösung waschen.  
Die Menge an Erythrozytenkonzentrat sollte 1 ml betragen. Wenn kleinere Mengen benutzt werden, muss die eingesetzte Menge Elutionslösung proportional angepasst werden. Der Einsatz eines Erythrozytenkonzentrats von weniger als 1 ml ergibt ein entsprechend geringeres Volumen an Eluat, das für die Testungen zur Verfügung steht.
3. 1 ml Erythrozytenkonzentrat in ein sauberes gekennzeichnetes Röhrchen überführen und mindestens viermal mit kalter Waschpuffer-Gebrauchslösung waschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Ein kleines Aliquot vom Überstand des letzten Waschvorgangs aufheben, um es auf Antikörperaktivität zu testen (s. 10. Kontrollen).
4. Die gewaschenen Erythrozyten in ein sauberes gekennzeichnetes Röhrchen überführen. Zu 1 ml gewaschenem Erythrozytenkonzentrat 1 ml Elutionslösung **SOLN ELU** geben, um die Antikörper zu eluieren. Gut mischen und sofort 45 – 60 Sekunden bei 1000 x g zentrifugieren.

**Achtung: Zu starkes Mischen oder nicht sofortiges Zentrifugieren kann zu Hämolyse führen, durch die sich der pH-Wert des Eluats ändert.**

5. Den Überstand (Eluat) in ein sauberes gekennzeichnetes Röhrchen überführen und die Erythrozyten verwerfen. Dann Neutralisationspuffer **BUF** tropfenweise zugeben (nach jedem Tropfen gut mischen) bis das Eluat eine blaue Färbung zeigt. Die blaue Farbe zeigt einen neutralen bis leicht basischen pH-Wert an.
6. Das Eluat zentrifugieren, um Zellreste zu entfernen. Den Überstand (Eluat) in ein sauberes gekennzeichnetes Röhrchen überführen. Das Eluat kann dann für Testungen eingesetzt werden.

**Anmerkung:** Wenn eine sofortige Testung des Eluats nicht möglich ist, kann es bei einer Lagerung bei 2..8°C noch bis zu 7 Tagen getestet werden, sofern keine Trübung und keine Änderung der Farbe des Eluats während der Lagerung auftritt. Auf einen neutralen bis leicht basischen pH-Wert für die optimale Reaktivität des Eluats achten!

## **9. Testung des Eluats**

Für die Untersuchung können kommerziell erhältliche Testerythrozytensuspensionen (Antikörpersuchtest- / Antikörperidentifizierungspanel), Spender- oder Patientenerythrozyten eingesetzt werden. Werden Spender- oder Patientenerythrozyten benutzt, müssen die Zellen mindestens dreimal mit isotonischer NaCl-Lösung gewaschen werden, bevor eine 3–5%ige Zellsuspension eingestellt wird. Das gründliche Waschen der Testzellen ist notwendig, weil im modifizierten Coombstest ein Waschschrift wegfällt.

Bei Verdacht auf einen Medikamenten-induzierten positiven direkten Coombstest, kann eine zusätzliche Testung des Eluats mit Zellen, die mit dem Medikament sensibilisiert wurden, erforderlich sein, um die Antikörperausbeute abzuschätzen.

### **9.1 Testung des Eluats im modifizierten Coombstest (Röhrchentest)**

1. 1 Tropfen von jeder 3–5 %igen Testerythrozytensuspension in saubere gekennzeichnete Röhrchen geben und jeweils 10 Tropfen (ca. 500 µl) isotonische NaCl-Lösung zugeben. Mindestens 45 - 60 Sekunden bei 1000 x g zentrifugieren. Den Überstand vollständig dekantieren oder absaugen, sodass man „trockene“ Erythrozytensedimente erhält.
2. 2 Tropfen Eluat (ca. 100 µl) zu jedem Erythrozytensediment geben und gut mischen.

**Achtung:** Wenn die mit Antikörpern beladenen Erythrozyten bereits im direkten Coombstest (DAT) nur schwach reagiert haben, sollten 3 – 4 Tropfen (150 – 200 µl) Eluat eingesetzt werden, um die Sensitivität des Tests zu erhöhen. Kein Rinderalbumin oder andere Verstärkermedien zusetzen!

3. 15 Minuten bei 37°C ± 1°C inkubieren.
4. Nach der Inkubation jedem Ansatz 10 Tropfen (ca. 500 µl) Waschpuffer-Gebrauchslösung zufügen und mindestens 45 - 60 Sekunden bei 1000 x g zentrifugieren. Den Überstand vollständig dekantieren oder absaugen, sodass man „trockene“ Erythrozytensedimente erhält.
5. 2 Tropfen Anti-Humanglobulin (entsprechend den Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation des Anti-Humanglobulins) zu jedem Ansatz geben und vorsichtig, aber gründlich mischen.
6. 15 Sekunden bei 1000 x g zentrifugieren.
7. Unter vorsichtigem Aufschütteln die Röhrchen makroskopisch auf Agglutination prüfen.
8. Negative oder nur schwach positive Ergebnisse sollten durch Zugabe von IgG-beladenen Testzellen überprüft werden.

### **9.2 Testung des Eluats in Gelkarten**

Für die Testung des Eluats in Gelkarten ist die entsprechende Gebrauchsinformation des Herstellers zu beachten.

## **10. Kontrollen**

1. Die Testung des Überstands vom letzten Waschvorgang (s. 8. Durchführung der Elution, Punkt 3) ist notwendig, um sicherzustellen, dass der im Eluat nachgewiesene Antikörper auch wirklich an den Erythrozyten gebunden war und kein freier Antikörper ist, der durch ungenügendes Waschen zurückgeblieben ist. Wenn das Ergebnis dieser Kontrolle positiv ist, muss die Elution mit gekühlten Reagenzien wiederholt werden. Dabei darauf achten, dass der Waschvorgang schnell und gründlich erfolgt.
2. Der Einsatz von IgG-beladenen Testzellen zur Überprüfung der Validität von negativen Ergebnissen im Coombstest ist eine wichtige Kontrolle für Verfahren, die einen Antiglobulin-Schritt beinhalten (s. entsprechende Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation für die IgG-beladenen Testzellen).

## **11. Interpretation der Ergebnisse**

Eine Agglutination der Testerythrozyten mit dem Eluat und keine Agglutination mit dem Überstand des letzten Waschvorgangs zeigt, dass serologisch nachweisbare Antikörper von den Erythrozyten eluiert wurden. Tritt keine Agglutination mit dem Eluat auf, sind entweder keine serologisch nachweisbaren Antikörper eluiert worden oder der eluierte Antikörper weist keine Blutgruppenspezifität auf.

Tritt mit dem Überstand des letzten Waschvorgangs eine Agglutination auf oder findet nach Zugabe von IgG-beladenen Testzellen zu einem negativen Coombstestansatz keine Agglutination statt, kann das Testergebnis mit dem Eluat nicht gewertet werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen die Grenzen der Methode (s. 12. Wichtige Hinweise/Grenzen der Methode) beachtet werden.

## **12. Wichtige Hinweise/Grenzen der Methode**

Das BAG-Elutions-Kit ist nur für den in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und darf nur von geschultem Fachpersonal eingesetzt werden.

Die für die Zentrifugationen angegebene g-Zahl ist immer das Minimum, das benötigt wird, um einen klaren Überstand und ein abgegrenztes Erythrozytensediment, das sich leicht re-suspendieren lässt, zu erhalten. 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 für die gewünschten Ergebnisse zu ermitteln.

Die Aktivität des Eluats ist von folgenden Faktoren abhängig:

1. Die Menge an Antikörpern, die an den Erythrozyten gebunden sind.
2. Der Grad der Dissoziation der Antikörper beim Waschvorgang. In seltenen Fällen wurde eine unspezifische Beladung mit hochtitrigen Antikörpern beobachtet. Über dieses Phänomen wurde im Zusammenhang mit Waschpuffern niedriger Ionenstärke bei Anwesenheit stark reaktiver Serumantikörper berichtet. In diesen Fällen kann es zu einem falsch positiven Ergebnis mit dem Eluat kommen.
3. Bei einer Lagerung der Zellen von mehr als 72 Stunden kann es zu geringeren Ausbeuten bei der Antikörperelution und dementsprechend geringerer Reaktivität des Eluats kommen. Außerdem kann es beim Gebrauch von gelagerten Erythrozyten zu hämolytisch verfärbten Eluaten kommen, was die Einstellung des optimalen pH-Wertes erschwert.
4. Das Ausmaß in dem die Immunglobuline durch den niedrigen pH-Wert bei der Dissoziation denaturiert werden (bei Einhaltung der vorgegebenen Verfahrensweise ist dieses erwartungsgemäß niedrig).
5. Falsch positive Ergebnisse können auch durch eine Kontamination des Eluats mit ungebundenen Antikörpern bedingt durch ungenügendes Waschen der Erythrozyten vor der Elution verursacht werden.
6. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn die Testzellen vor der Inkubation mit dem Eluat nicht ausreichend gewaschen werden oder das Testsystem in irgendeiner Weise mit anderen humanen Proteinen als den während der Elution dissoziierten Antikörpern verunreinigt wird.
7. Nach Zugabe des Neutralisationspuffers können verschiedene Blautöne auftreten (taubenblau bis blau-lila), die sich nicht auf das Testergebnis auswirken. Wenn die Farbe des Eluats nicht im Blaubereich liegt, muss der pH-Wert mit einem Indikatorstreifen kontrolliert werden. Der pH-Wert muss neutral bis leicht basisch sein.
8. Wird der pH-Wert nicht im richtigen Bereich eingestellt, kann dies zur Hämolyse der Erythrozyten führen. Außerdem wird die Aktivität der eluierten Antikörper bei einem pH-Wert unter oder oberhalb des optimalen Bereichs negativ beeinflusst.
9. Eine zu starke Verdünnung des Eluats durch den Einsatz zu großer Volumina Elutionslösung oder Neutralisationspuffer bei der pH-Wert-Einstellung des Eluats, kann zu schwachen oder falsch negativen Ergebnissen führen.
10. Wenn Erythrozyten nur mit Komplementfaktoren beladen sind, ist es sehr unwahrscheinlich, dass man ein reaktives Eluat erhält.
11. Erythrozyten, die für Elutionsversuche eingesetzt wurden, sind nicht für eine Phänotypisierung geeignet.
12. Generell können Abweichungen von der vorgegebenen Testdurchführung wie der Einsatz zu großer Mengen Erythrozytenkonzentrat, falsche Zentrifugation oder Inkubation, unsaubere Röhrchen und/oder kontaminierte Materialien und Proben zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.

13. Eine Trübung der Reagenzien kann auf eine bakterielle Kontamination oder Qualitätsminderung der Reagenzien hinweisen. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien unbedingt vermeiden, weil dies die Haltbarkeit des Produktes verkürzt und zu falschen Ergebnissen führen kann. Kontaminierte Reagenzien nicht mehr benutzen!

### **13. Leistungsdaten**

Für die Leistungsbewertung wurden klinische Proben aus Blutspendediensten (in-vivo mit Antikörpern beladen) und Erythrozyten, die in-vitro mit verschiedenen humanen Antikörpern beladen wurden, getestet. Es wurden sowohl EDTA- als auch Citratblute eingesetzt.

Die Antikörperelutionen wurden mit dem BAG-Elutions-Kit und mit zwei etablierten C€-gekennzeichneten Produkten für die Antikörperelution durchgeführt. Die erhaltenen Eluate wurden in einem Antikörpersuch- und Identifizierungstest mit Testerythrozytenpanels eingesetzt.

In allen Fällen konnten die Antikörper mit dem BAG-Elutions-Kit eluiert werden und mit den Testerythrozytenpanels sowohl in der Gelkarte als auch im Röhrchentest nachgewiesen und identifiziert werden. Bei allen Proben gab es eine 100%ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der etablierten Vergleichselutionssysteme.

### **14. Warn- und Entsorgungshinweise**

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, insbesondere die zu testenden Proben, sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Für die Herstellung dieses Produkts verwendetes Rinderalbumin 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.

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).

Der Neutralisationspuffer und das Waschpufferkonzentrat enthalten  $\text{NaN}_3$  als Konservierungsmittel. Nicht verschlucken und Kontakt mit der Haut und den Schleimhäuten vermeiden (H- und P-Sätze s. Erläuterung der Symbole auf den Etiketten). Kupfer und Blei, die in einigen Rohrsystemen eingesetzt werden, können mit Azid explosive Salze bilden. Bei der Beseitigung von Azid-haltigem Material sollte deshalb mit reichlich Wasser nachgespült werden. Die Entsorgung aller Proben und Testmaterialien sollte entsprechend der gesetzlichen Richtlinien erfolgen.

Sicherheitsdatenblätter können unter [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com) heruntergeladen werden.

### **15. Literatur**

Technical manual of the American Association of Blood Banks, 17<sup>th</sup> ed., 2011

Transfusionsmedizin, 3. Auflage, Müller-Eckhardt C, Kiefel V, 2004

Rekvig OP, Hannestad K. Acid Elution of Blood Group Antibodies From Intact Erythrocytes. Vox Sang 1977: 33:280

Judd WJ. Elution of Antibodies From Red Cells. In: Seminar On Antigen-Antibody Reactions Revisited. Bell CA, ed. Arlington, VA: American Association of Blood Banks 1982: 175

Leger RM, Arndt PA, Ciesielski DJ, Garratty G. False-positive eluate reactivity due to the low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. Transfusion 1998: 38:565-572

<b>Erklärung der Symbole auf den Etiketten / Explanation of symbols used on Labelling</b>	
	Zweckbestimmung: Säure-Elution von Erythrozyten-Antikörpern <i>Intended purpose: Acid elution of red blood cell antibodies</i>
	Inhalt des Kits / <i>Contents of the kit</i>
	Neutralisationspuffer / <i>Neutralisation buffer</i>
	Elutionslösung / <i>Elution solution</i>
	Waschpuffer, 10 x Konzentrat / <i>Wash buffer, 10 x concentrate</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>
	Enthält Natriumazid / <i>Contains Sodium Azide</i>
	Achtung / <i>Warning</i> H302, H412, P264, P270, P273, P301+P312, P330, P501

- H302      Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. / *Harmful if swallowed.*
- H412      Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.  
*Harmful to aquatic life with long lasting effects.*
- P264:      Nach Gebrauch Hände gründlich waschen. / *Wash hands thoroughly after handling.*
- P270:      Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.  
*Do not eat, drink or smoke when using the product.*
- P273:      Freisetzung in die Umwelt vermeiden. / *Avoid release to the environment*
- P301+P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM / *Arzt anrufen.*  
*IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/doctor if you feel unwell.*
- P330:      Mund ausspülen. / *Rinse mouth.*
- P501:      Inhalt/Behälter dem Sondermüll mit besonderer Kennzeichnung zuführen.  
*Dispose of contents/container to the hazardous waste with special marking.*



**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