

DE

GEBRAUCHSINFORMATION

# BAG-Elutions-Kit



für die Säure-Elution von Antikörpern

Elektronische Gebrauchsinformation siehe [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

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 hämolytischer 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**

Für die Antikörperelution wird 1 ml Erythrozytenkonzentrat benötigt. 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.

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.
3. Von dem 1x gewaschenen Erythrozytenkonzentrat ca. 1,5 ml 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. 1 ml des 4x gewaschenen Erythrozytenkonzentrats in ein sauberes gekennzeichnetes Röhrchen überführen. Zu dem 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) **sofort** 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 (ca. pH 7,5 bis 8,1).
6. Das Eluat 1 Minute bei 1000 x g 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 resuspendieren 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 (ca. pH 7,5 bis 8,1) 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

Gebrauchsinformation	<b>Version 4/2018 / Stand 2018-01</b>
----------------------	---------------------------------------



**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](http://www.bag-healthcare.com)  
[info@bag-healthcare.com](mailto:info@bag-healthcare.com)

**Auftragsannahme/Ordering:**

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

**Customer Service:**

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

EN

INSTRUCTIONS FOR USE

# BAG-Elutions-Kit

## for acid elution of antibodies

CE

Electronic instructions for use see [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

REF 69501

### 1. Description of product


With the BAG-Elutions-Kit antibodies adsorbed onto red blood cells, either in vivo or in vitro, can be dissociated in an elution process and can be identified in a separate procedure. The recovered eluate may be used:

1. to identify a single antibody in sera containing multiple antibody specificities
2. to demonstrate the presence of a weak antigen
3. to identify the antibody responsible for a positive direct antiglobulin test in acquired hemolytic anemia or transfusion reaction
4. to identify antibodies causing hemolytic disease of the newborn

### 2. Principle of the test

Unadsorbed antibodies surrounding the sensitized red cells are removed by washing with a wash buffer that minimizes the loss of adsorbed antibodies from the red cells. After washing, the antibody-antigen complex is dissociated by addition of a low pH solution (elution solution). The pH of the recovered eluate is then adjusted by the addition of a neutralisation buffer. The eluate is then ready for use.

### 3. Contents of the kit

WASHBUF   10x	Wash buffer, 10 x concentrate, slightly yellow, containing bovine albumine and < 1% NaN <sub>3</sub> 	1 x 50 ml
SOLN   ELU	Elution solution, ready for use, orange-yellow, low pH glycine buffer containing a pH colour indicator and no preservatives or antimicrobial agents (Dropper and cap: orange)	1 x 13 ml
BUF	Neutralisation buffer, ready for use, light blue, Tris buffer, containing < 0,1% NaN <sub>3</sub> (Dropper and cap: blue)	1 x 13 ml

### 4. Storage and stability

Store the wash buffer concentrate, the elution solution and the neutralisation buffer at 15...30°C. Do not freeze! Once they have been opened the first time, the reagents may be used up to the expiration date indicated on the label if the specified storage conditions are observed. Do not use the reagents if turbidity or other signs of contamination are observed and after the expiration date indicated on the label.

Store the diluted wash buffer working solution at 2...8°C in a closed labeled container. Do not freeze! The diluted wash buffer working solution may be used for up to six months if the specified storage conditions are observed and no turbidity or other signs of contamination are observed. Do not use contaminated reagents!

## **5. Samples**

Do not use hemolytic or contaminated samples! Examine samples without delay whenever possible. A longer storage may result in lower levels of recovered antibodies and resultant weaker eluate reactivity. Additionally, the use of stored samples may result in hemoglobin stained eluates and results in difficulty adjusting the final pH of the eluate (see 12. Important Notes/Limitations of the Method).

## **6. Additional materials required**

Isotonic NaCl solution, aqua dest., gel cards, disposable glass test tubes (75x12 mm), transfer pipettes, waterbath or incubator (37°C ± 1°C), centrifuge, reagents for testing the eluate.

## **7. Wash buffer dilution**

Dilute the concentrated wash buffer **WASCHBUF 10x** 1:10 with aqua dest. (one volume of the concentrated wash buffer and nine volumes of aqua dest.). For the dilution measure the wash buffer concentrate always. The wash buffer working solution should be stored at 2...8°C in a closed container. The solution may be used for up to six months if no turbidity or other signs of contamination are observed during storage.

The use of **cold** wash buffer working solution may minimize antibody dissociation during the wash phase of the procedure.

## **8. Elution procedure**

For the elution of antibodies 1 ml packed red cells are required. If smaller volumes are used, the used volume of elution solution must be adapted proportionally. Use of a packed cell volume less than 1 ml will result in a smaller final volume of eluate available for testing.

1. Perform a direct antiglobulin test on the red cell sample that has been sensitized with antibody either in vivo or in vitro. Record result.
2. Centrifuge the sensitized red cell sample in a clean, labeled test tube. Remove the excess plasma or serum and wash the red cells once with cold wash buffer working solution.
3. Transfer approx. 1.5 ml of the 1x washed packed red cells to a clean, labeled test tube. Wash the packed red cells with cold wash buffer working solution a minimum of four times to remove unbound antibodies. Reserve a small aliquot of the supernatant from the last wash to test for antibody activity (see 10. Controls). Inadequate washing could lead to serum antibody contamination.
4. Transfer 1 ml of the 4x washed packed red cells to a clean, labeled test tube and add 1 ml of the elution solution **SOLN ELU** to elute the antibodies. Mix gently. Centrifuge **immediately** for 45 - 60 seconds at 1000 rcf.

**Note:** Excess mixing or failure to centrifuge immediately may cause hemolysis which alters the pH of the eluate.

5. Transfer the supernatant (eluate) **immediately** to a clean test tube. Discard red cells. Then add the neutralisation buffer **BUF** drop by drop (after each drop, mix well) until a distinct blue colour appears. The blue colour indicates a neutral to weak alkaline pH value (approx. pH 7.5 till 8.1).
6. Centrifuge the eluate for 1 minute at 1000 rcf to remove cellular debris. Transfer the clarified eluate to a clean, labeled test tube. The eluate is now ready for testing.

**Note:** If not tested immediately the eluate may be stored refrigerated at 2...8°C for up to seven days and tested if no turbidity or colour deviations are observed during storage. Ensure a neutral to weak alkaline pH value for optimal reactivity of the eluate.

## **9. Testing the eluate**

Commercial reagent red blood cells, patient or donor samples may be used as test cells. If patient or donor samples are used, wash the cells at least three times in isotonic saline prior to preparing a 3 – 5 % cell suspension. Thorough washing of the test cells is necessary since



the modified antiglobulin test eliminates one wash step. If drug induced positive direct antiglobulin test is suspected, additional testing of the eluate against cells sensitized with the drug may be required to assess antibody recovery.

### **9.1 Testing the eluate by a modified antiglobulin test (tube test)**

1. Add one drop of a 3 - 5% red cell suspension to a clean labeled tube. Add 10 drops (ca. 500 µl) of isotonic saline. Centrifuge at 1000 rcf for at least 45 - 60 seconds. Completely decant or aspirate the supernatant to ensure removal of all residual saline, resulting in a "dry" red cell button.
2. Add two drops (ca. 100 µl) of the eluate to the "dry" red cell button and mix well.

**Note:** If a weak direct antiglobulin test was demonstrated with the sensitized red cells, 3 - 4 drops (150 – 200 µl) of eluate may be used to increase the sensitivity of the test. Do not add bovine albumin or other potentiators.

3. Incubate at 37°C (±1°C) for 15 minutes.
4. After incubation, add 10 drops (ca. 500 µl) of the wash buffer working solution and centrifuge at 1000 rcf for at least 45 - 60 seconds. Completely decant the supernatant wash solution to ensure removal of all residual wash solution, resulting in "dry" red cell button.
5. Add two drops of anti-human globulin (refer to appropriate manufacturer's Instructions for Use for Anti-Human-Globulin) and mix gently, but thoroughly, to resuspend red cell button.
6. Centrifuge for 15 seconds at 1000 rcf.
7. Gently resuspend red cell button and examine for agglutination. Grade and record results.
8. Negative or weak positive antiglobulin test results should be appropriately controlled by the addition of IgG sensitized reagent control cells.

### **9.2 Testing the eluate by gel cards**

For testing the eluate by gel cards the appropriate Instructions for Use from the manufacturer of the gel cards must be observed.

## **10. Controls**

1. Testing of the reserved wash solution (see 8. Elution Procedure, step 3) is necessary to provide verification that the antibody detected in the eluate was released from a bound state and is not residual "free" antibody remaining after inadequate washing. If a "last wash" control test is positive, the elution should be repeated using cold reagents, taking care to wash quickly and thoroughly.
2. The application of IgG sensitized reagent control cells to aid in the confirmation of the validity of negative antiglobulin test results is an essential control test for procedures that include an antiglobulin test phase (refer to the relevant manufacturer's Instructions for Use for IgG sensitized control cells).

## **11. Interpretation of the results**

Agglutination of red cells tested against the eluate and no agglutination of the reserved „last wash“ control test indicate that serologically detectable antibodies has been recovered from the sensitized cells. Absence of agglutination indicates that no serologically detectable antibodies were recovered or perhaps that the recovered antibodies does not demonstrate blood group specificity.

If agglutination occurs with the reserved „last wash“ supernatant or if no agglutination occurs with the IgG sensitized control cells when added to negative antiglobulin test, the test results with the eluate should not be interpreted.

The limitations of the method must be considered when interpreting the results (see 12. Important Notes/Limitations of the Method).

## **12. Important notes/limitations of the method**

The BAG-Elutions-Kit is suitable for in vitro diagnostic use only and may only be used by trained, qualified personnel.

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. Centrifuges should be calibrated individually to determine the optimal time and speed required to achieve the desired results.

The activity of the eluate is limited by the following:

1. The initial amount of antibody bound to the sensitized red cells.
2. The degree of antibody dissociation that occurs during the wash procedure. On rare occasion, the non-specific uptake of high potency antibodies has been reported to occur; this phenomenon has been reported to be associated with the combined use of low-ionic strength wash solution in the presence of strongly reactive serum antibody. In this instance, a potential false positive eluate result may occur.
3. Cells stored longer than 72 hours may result in lower levels of recovered antibody and resultant weaker eluate reactivity. Additionally, the use of stored samples may result in hemoglobin stained eluates and results in difficulty adjusting the final pH of the eluate.
4. The degree to which immunoglobulin is denatured by the low pH during dissociation (this is expected to be minimal if the procedure is carried out as recommended).
5. False positive results may occur from contamination of the eluate with unbound antibody due to inadequate washing of the red blood cells before starting the elution procedure.
6. False negative tests may occur if the test red cell suspensions are not washed sufficiently before incubation with the eluate, or if the test system becomes contaminated in any way with human protein other than antibody recovered during the elution phase.
7. After addition of neutralisation buffer different blue colour variations (pigeon blue to blue-lilac) have been observed, which do not affect the test results. In the case of a large colour deviation the pH value must be checked via indicator strips. The pH value range must be neutral to weak alkaline (approx. pH 7.5 till 8.1).
8. Failure to adjust pH to proper range may result in hemolysis of the test cells. Additionally, the activity of recovered antibody may be adversely affected by pH variation above or below the optimal range.
9. Excess dilution of the eluate from incorrect volume addition of the elution solution or by addition of excessive amounts of neutralisation buffer during adjustment of the pH range of the eluate could result in weakened or false negative results.
10. Elution procedures performed on red cells that are sensitized only with complement are unlikely to yield reactive eluates.
11. Red blood cells used for elution studies cannot be used for phenotyping.
12. Other tests variables such as the use of too large volumes of packed red cells, improper technique, inappropriate centrifugation or incubation, improperly cleaned glassware and/or contaminated materials and samples may cause false negative or false positive results.
13. Turbidity may indicate bacterial contamination or reagent deterioration. Microbiological contamination of the reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results. Do not use contaminated reagents!

## **13. Performance characteristics**

For the performance evaluation clinical samples from blood donor services (sensitized with antibodies in-vivo) and samples, which were sensitized in vitro with different human antibodies, were tested (EDTA- and citrate blood). The antibody elution was performed with the BAG-Elutions-Kit and with two established C€-marked products for antibody elution. The eluates obtained were tested in an antibody screening and identification test with test cell panels.

In all cases the antibodies could be eluted with the BAG-Elutions-Kit. The eluted antibodies could be detected and identified with test cell panels in tube test and gel cards. There was an agreement of 100% with the results of the established CE-marked products for antibody elution.

#### **14. Warnings and instructions for disposal**

All materials of biological origin used for the test, especially the specimens to be tested, should be regarded as potentially infectious. Therefore, appropriate safety precautions are recommended when handling biological materials (do not pipette using the mouth; wear protective gloves when performing the test; disinfect hands after testing).

Any bovine albumin used in the manufacture of this product is sourced from donor animals of United States origin 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.

Biological materials must be deactivated before disposal (e.g., by autoclaving). Single-use materials must be autoclaved or incinerated after use.

Spills of potentially infectious material should be removed without delay with an absorbent paper towel and the contaminated area disinfected with an appropriate disinfectant or 70% ethanol. Materials used for the removal of spills must be deactivated before disposal (e.g., by autoclaving).

The neutralisation buffer and the wash buffer concentrate contain  $\text{NaN}_3$  as preservative. Do not swallow and avoid contact with the skin and mucous membranes (H- and P-phrases, see Explanation of symbols used in labelling). Copper and lead, which are used in some piping systems, can form explosive salts with sodium azide. Therefore disposal of azide-containing material should be followed by rinsing with copious water.

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

Material Safety Data Sheets (MSDS) are available to download at [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com).

#### **15. References**

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

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

Erklärung der Symbole auf den Etiketten / <i>Explanation of symbols used on Labelling</i>	
	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 / Temperaturbegrenzung <i>Storage temperature / Temperature limitation</i>
	Lot-Nr. / <i>Batch code</i>
	Verwendbar bis / <i>Use by</i>
	Bestell-Nr. / <i>Catalogue number</i>
	Hersteller / <i>Manufacturer</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.*

**Instructions for use in other languages see:**

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

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



BAG Health Care GmbH  
Amtsgerichtsstraße 1-5  
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404/925-0      www.bag-healthcare.com  
Fax: +49 (0) 6404/925-250      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