

GEBRAUCHSINFORMATION

Chloroquin-Diphosphat



für die Abspregung Erythrozyten-gebundener Antikörper

IN VITRO DIAGNOSTIKUM

1. Produktbeschreibung

Chloroquin-Diphosphat wird eingesetzt, um an Erythrozyten gebundene IgG-Antikörper abzusprengen, z.B. wenn bei Erythrozyten mit einem positiven direkten Coombstest mit Anti-IgG eine direkte Antigenbestimmung nicht möglich ist, weil sie in vivo IgG-Antikörper gebunden haben. Da Chloroquin-Diphosphat unter kontrollierten Bedingungen die Erythrozytenantigene nicht oder nur geringfügig schädigt, können bei den Erythrozyten dann die wieder freiliegenden Antigene nachgewiesen werden. Eine Identifizierung der abgesprengten Antikörper ist nach Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat nicht möglich.

2. Testprinzip

Die mit IgG-Antikörpern beladenen Erythrozyten werden mit Chloroquin-Diphosphat bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Chloroquin-Diphosphat kommt es zu einer Abspregung der Antikörper von den Erythrozyten. Anschließend werden die Erythrozyten mit Alsever-Lösung gewaschen, um die abgesprengten Antikörper zu entfernen. Die Erythrozyten können dann für eine Antigenbestimmung eingesetzt werden.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Chloroquin-Diphosphat bei 2...8°C lagern. Chloroquin-Diphosphat ist bei Einhaltung der angegebenen Lagerbedingungen nach dem ersten Öffnen bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar, wenn es keine Trübungen oder andere Anzeichen für eine Kontamination aufweist. Chloroquin-Diphosphat nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums benutzen. Kontaminierte Reagenzien nicht mehr benutzen!

4. Proben

Die Blutproben sollten entsprechend den üblichen medizinischen Verfahren entnommen sein. Keine hämolytischen oder kontaminierten Blutproben verwenden! Die Proben sollten, wenn möglich, ohne zeitliche Verzögerung untersucht werden. Eine zu lange Lagerung von mehr als 5 Tagen kann die Abspregung der Antikörper erschweren bzw. es kann zu starker Hämolyse der Erythrozyten und einer Schädigung der Erythrozyten durch die Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat kommen (s. 7. Wichtige Hinweise/Grenzen der Methode).

5. Zusätzlich benötigte Materialien

Alsever-Lösung
Anti-Human-Globulin (Anti-IgG)
Erythrozyten mit bekanntem Phänotyp
IgG-beladene Testzellen
Teströhrchen für den Einmalgebrauch (75 x 12 mm)
Einweg-Pasteur-Pipetten
Zentrifuge
Reagenzien für die Antigenbestimmung

6. Durchführung

Mit der mit Antikörpern beladenen Erythrozyten-Probe einen direkten Coombstest mit Anti-Human-Globulin (Anti-IgG) durchführen und das Ergebnis notieren.

6.1 Abspregung der IgG-Antikörper mit Chloroquin-Diphosphat

1. Die Probe mit den beladenen Erythrozyten in einem sauberen beschrifteten Röhrchen dreimal mit Alsever-Lösung waschen (jeweils 5 Minuten bei 400 g (1500 UpM) zentrifugieren) und den Überstand verwerfen.
2. 10 Tropfen des gewaschenen Erythrozytensediments in ein beschriftetes Röhrchen geben.
3. 40 Tropfen Chloroquin-Diphosphat zugeben und gut mischen.
4. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Die Erythrozyten dreimal mit Alsever-Lösung waschen (jeweils 5 Minuten bei 400 x g (1500 UpM) zentrifugieren) und den Überstand verwerfen.

Anmerkung: Eine dabei auftretende leichte Hämolyse kann vernachlässigt werden.

6.2 Überprüfung der Antikörper-Abspregung im direkten Coombstest

Nach dem letzten Waschschrift mit einem Teil der Erythrozyten einen direkten Coombstest mit Anti-Human-Globulin (Anti-IgG) durchführen (entsprechend den Angaben in der Gebrauchsinformation des verwendeten Anti-Humanglobulins).

Der direkte Coombstest sollte negativ ausfallen. Wenn die Erythrozyten jedoch sehr stark mit Antikörpern beladen sind, kann es vorkommen, dass sie im direkten Coombstest noch immer eine positive Reaktion zeigen. In diesem Fall kann die Abspregung der Antikörper mit Chloroquin-Diphosphat (entsprechend der Schritte 2 – 5) wiederholt werden. Danach sollte die Abspregung der Antikörper im direkten Coombstest noch einmal überprüft werden. Fällt der direkte Coombstest dann immer noch positiv aus, konnten die Antikörper nicht oder nur unvollständig abgesprengt werden. Eine Bestimmung der Erythrozytenantigene ist dann nicht möglich bzw. es kann zu einer falschen Phänotypisierung kommen.

Eine dritte Behandlung der Erythrozyten mit Chloroquin-Diphosphat wird nicht empfohlen, weil es dann zu starker Hämolyse und einer Schädigung der Erythrozytenantigene kommen kann.

6.3 Bestimmung der Erythrozytenantigene

Nach erfolgreicher Abspregung der Antikörper können die Erythrozyten für eine Antigenbestimmung mit monoklonalen und/oder humanen Antikörpern eingesetzt werden. Die Testdurchführung sollte entsprechend den Angaben in den Gebrauchsinformationen der eingesetzten Testreagenzien erfolgen.

6.4 Kontrollen

Zur Kontrolle wird empfohlen, Erythrozyten, die bekannt positiv für die Antigene sind, die bei der zu untersuchenden Probe bestimmt werden sollen, ebenfalls mit Chloroquin-Diphosphat zu behandeln und dann bei ihnen eine Antigenbestimmung durchzuführen. Zeigen diese Erythrozyten nicht die zu erwartenden Reaktionen bei der Antigenbestimmung, kann das Ergebnis der Antigenbestimmung mit der Chloroquin-Diphosphat behandelten Patientenprobe nicht gewertet werden (für mögliche Fehlerquellen s. 7. Wichtige Hinweise/Grenzen der Methode).

Ein negativer direkter Coombstest sollte immer durch Zugabe von IgG-beladenen Testzellen überprüft werden (für die Durchführung s. Angaben in der Gebrauchsinformation des Herstellers der eingesetzten IgG-beladenen Testzellen). Findet nach Zugabe von IgG-beladenen Testzellen zu einem negativen Coombstestansatz keine Agglutination statt, kann das Testergebnis nicht gewertet werden.

7. Wichtige Hinweise/Grenzen der Methode

1. Chloroquin-Diphosphat ist nur für den in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und darf nur von geschultem Fachpersonal eingesetzt werden.
2. Chloroquin-Diphosphat entfernt keine Komplement-Komponenten von den Erythrozyten. Wenn die Erythrozyten in vivo mit IgG-Antikörpern und Komplementfaktoren beladen sind, sollte für die Testungen nach der Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat nur Anti-IgG-spezifisches Anti-Human-Globulin eingesetzt werden.

3. Antikörper, die durch Chloroquin-Diphosphat von Erythrozyten abgesprengt wurden, sind nicht für eine Antikörperidentifizierung geeignet.
4. 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.
5. Eine zu lange Lagerung der Erythrozyten von mehr als 5 Tagen kann die Absprengung der Antikörper erschweren bzw. es kann zu starker Hämolyse und einer Schädigung der Erythrozytenantigene durch die Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat kommen
6. Bei Einhaltung der vorgegebenen Verfahrensweise werden die Erythrozytenantigene durch die Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat nicht oder nur geringfügig geschädigt. Abweichungen von der vorgegebenen Verfahrensweise, wie zu lange Inkubationszeiten, zu hohe Inkubationstemperaturen oder mehr als zwei Behandlungen mit Chloroquin-Diphosphat oder der Einsatz von vorgeschädigten Erythrozyten können zu einer starken Hämolyse und Zerstörung der Erythrozytenantigene führen, sodass eine zuverlässige Antigenbestimmung bei den Erythrozyten nicht mehr möglich ist.
7. Keine hämolytischen oder kontaminierten Blutproben verwenden!
8. Ungenügendes Waschen der Erythrozyten kann zu falschen und/oder unbefriedigenden Testergebnissen führen.
9. Generell können Abweichungen von der vorgegebenen Testdurchführung wie falsche Zentrifugation oder Inkubation, unsaubere Röhrchen und/oder kontaminierte Materialien und Proben das Ergebnis negativ beeinflussen.
10. Fällt der direkte Coombstest auch nach der zweiten Behandlung der Erythrozyten mit Chloroquin-Diphosphat positiv aus, konnten die Antikörper nicht oder nur unvollständig abgesprengt werden. Eine Bestimmung der Erythrozytenantigene ist dann nicht möglich bzw. es kann zu einer falschen Phänotypisierung kommen.
11. Chloroquin-Diphosphat enthält keine Konservierungsstoffe. Eine Trübung der Reagenzien kann auf eine mikrobielle Kontamination oder Qualitätsminderung der Reagenzien hinweisen. Eine mikrobielle Kontamination von Chloroquin-Diphosphat unbedingt vermeiden, weil dies die Haltbarkeit des Produktes verkürzt und zu falschen Ergebnissen führen kann. Kontaminierte Reagenzien nicht mehr benutzen!

8. Leistungsdaten

Für die Leistungsstudie wurden insgesamt 100 Erythrozytensuspensionen mit Chloroquin-Diphosphat behandelt. 10 Erythrozytensuspensionen hatten im direkten Coombstest eine positive Reaktion gezeigt, die anderen 90 Erythrozytensuspensionen wurden in vitro mit verschiedenen IgG-Antikörpern beladen (Anti-D, -C, -c, -C^w, -E, -e, -K, -k, -Jk^a, -Jk^b, -Fy^a, -Fy^b, -S, -s). Bei allen 100 Proben konnten die Antikörper vollständig abgesprengt werden. Bei sechs Proben war dafür eine zweite Absprengung mit Chloroquin-Diphosphat notwendig. Durch eine anschließende umfangreiche Blutgruppenbestimmung bei den Erythrozyten konnte gezeigt werden, dass die Antigene des AB0-, Rhesus-, Kell-, Duffy-, Kidd- und MNSs-Systems nach Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat noch nachweisbar sind und nicht zerstört wurden.

9. 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).

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

10. Literatur

Edwards, JM, Moulds, JJ, and Judd, WJ: Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes: A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. Transfusion 22:59, 1982

Modern Blood Banking and Transfusion Practices, Denise M. Harmening, F. A. Davis Company Philadelphia, 3. Auflage, 1994

Gebrauchsinformation	Version: 1/2014 Stand: 2014-02
----------------------	-----------------------------------



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

INSTRUCTIONS FOR USE

Chloroquin-Diphosphat



for removing antibodies from the surface of sensitized red blood cells

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

1. Description of product

Chloroquin-Diphosphat is used to remove IgG antibodies from the surface of sensitized red blood cells, e. g. if red blood cells with an positive direct antiglobulin test cannot be used directly for blood group typing, because the cells has been sensitized with IgG in vivo. Under controlled conditions, Chloroquin-Diphosphat dissociates IgG from red blood cells without or only a little damage to the red blood cell antigens and so permits a complete phenotyping of the red blood cells after treatment with Chloroquin Diphosphat. After treatment with Chloroquin-Diphosphat an identification of the removed antibodies is not possible.

2. Principle of the test

Red blood cells sensitized with IgG antibodies are incubated with Chloroquin-Diphosphat at room temperature. Chloroquin-Diphosphat dissociates IgG from the red blood cells. The detached antibodies are removed by washing with Alsever solution. The red blood cells are now ready for use for antigen determination.

3. Storage and stability

Store Chloroquin-Diphosphat at 2...8°C. Do not freeze! Once Chloroquin-Diphosphat 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 noticed. Do not use the reagent after the expiration date indicated on the label. Do not use contaminated reagents!

4. Samples

Blood samples should be collected by approved medical procedure. Do not use hemolytic or contaminated samples! Examine samples without delay whenever possible. Cells stored longer than 5 days may render more difficulties in removing antibodies respectively may result in strong hemolysis and damage to or loss of red blood cell antigens if cells are incubated with Chloroquin-Diphosphat (see 7. Important Notes/Limitations of the Method).

5. Additional materials required

Alsever solution
Anti-Human-Globulin (Anti-IgG)
Red blood cells of known phenotype
IgG sensitized reagent control cells
Disposable test tubes (75 x 12 mm)
Disposable Pasteur Pipettes
Centrifuge
Reagents for determination of red blood cell antigens

6. Performance

Perform a direct antiglobulin test with Anti-Human-Globulin (Anti-IgG) of the red cell sample that has been sensitized with antibody in vivo. Record result.

6.1 Removing IgG antibodies with Chloroquin-Diphosphat

1. Wash the sensitized red cell sample three times with Alsever solution in a clean, labeled test tube (in each case centrifuge 5 minutes at 400 x g (1500 rpm)). Discard supernatant.
2. Pipete 10 drops of the washed test red cell button into a labelled test tube.
3. Add 40 drops Chloroquin-Diphosphat and mix thoroughly.
4. Incubate 30 minutes at room temperature.
5. Wash the red cells three times with Alsever solution (in each case centrifuge 5 minutes at 400 x g (1500 rpm)). Discard supernatant.

Note: A mild hemolysis can be neglected.

6.2 Check of antibody removing in a direct antiglobulin test

After the last washing step perform a direct antiglobulin test with Anti-Human-Globulin (Anti-IgG) with a part of the red cells (see Directions for Use for Anti-Human-Globulin).

The direct antiglobulin test should be negative. If the initial amount of antibody bound to the sensitized red cells was strong, a positive result can occur. In this case the treatment with Chloroquin-Diphosphat can be repeated (according to steps 2 - 5). Check again the antibody removing in a direct antiglobulin test.

If the direct antiglobulin test result is still positive, the antibodies could not or only incomplete removed. In this case a determination of red blood cell antigens is not possible respectively a false phenotyping can occur.

A third treatment with Chloroquin-Diphosphat is not recommended, since strong hemolysis and damage to or loss of red blood cell antigens can occur.

6.3 Determination of red blood cell antigens

If the antibodies are removed from the surface of the red blood cells, the antigens can be determined with monoclonal and/or human antibodies. The phenotyping of the red blood cells should be done according to manufacturer's Directions for Use for the test reagents.

6.4 Controls

As control it is recommended to use red blood cells positive for the antigen for which the test sample is to be phenotyped. Treat the cells with Chloroquin-Diphosphat in the same manner as the test sample and determine the red cell antigens.

If the control red cells not react as expected, the test results of the phenotyping with the Chloroquin-Diphosphat treated test sample should not be interpreted (see 7. Important Notes/Limitations of the Method).

A negative antiglobulin test results should be appropriately controlled by the addition of IgG sensitized reagent control cells (see Directions for Use for IgG sensitized control cells). If no agglutination occurs with the IgG sensitized control cells when added to negative antiglobulin test, the test results should not be interpreted.

7. Important notes/Limitations of the method

1. Chloroquin-Diphosphat is suitable for in vitro diagnostic use only and may only be used by trained, qualified personnel.
2. Chloroquin-Diphosphat does not dissociate complement components from red blood cells. If the red blood cells are coated with IgG antibodies and complement components in vivo, tests should be done after Chloroquin-Diphosphat treatment using only Anti-IgG specific Anti-Human-Globulin.
3. After treatment with Chloroquin-Diphosphat an identification of the removed antibodies is not possible.
4. 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.

5. Cells stored longer than 5 days may render more difficulties in removing antibodies respectively may result in strong hemolysis and damage to or loss of red blood cell antigens through treatment with Chloroquin-Diphosphate.
6. If the procedure is carried out as recommended, Chloroquin-Diphosphat dissociates IgG from red blood cells without or only a little damage to the red blood cell antigens. Test variables such as prolonged incubation time, too high incubation temperature or more than two treatments with Chloroquin-Diphosphat, using of hemolytic or contaminated red blood cells may result in strong hemolysis and damage to or loss of red blood cell antigens and an accurate phenotyping is not possible.
7. Do not use hemolytic or contaminated samples!
8. Inadequate washing of the red blood cells may result in false or unsatisfied test results.
9. Other test variables such as improper technique, inappropriate centrifugation or incubation, improperly cleaned glassware and/or contaminated materials and samples may cause false results.
10. If the direct antiglobulin test result is still positive after the second treatment with Chloroquin-Diphosphat, the antibodies could not or only incomplete removed. In this case a determination of red blood cell antigens is not possible respectively a false phenotyping can occur.
11. Chloroquin-Diphosphat does not contain preservatives. Turbidity may indicate bacterial contamination or reagent deterioration. Microbiological contamination of Chloroquin-Diphosphat must be avoided as this may reduce the shelf life of the product and cause false results. Do not use contaminated reagents!

8. Performance characteristics

100 red blood cell suspensions were treated with Chloroquin-Diphosphat. 10 samples were coated with antibodies in vivo and 90 samples were coated with several antibodies in vitro (Anti-D, -C, -c, -C^w, -E, -e, -K, -k, -Jk^a, -Jk^b, -Fy^a, -Fy^b, -S, -s). Chloroquin-Diphosphat removed the antibodies from all 100 samples completely. In 6 cases it was necessary to repeat the treatment with Chloroquin-Diphosphat. Extensive phenotyping of the samples showed that antigens of the ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd and MNSs systems could be determined and were not destroyed after treatment with Chloroquin-Diphosphat.

9. 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).

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

10. References

Edwards, JM, Moulds, JJ, and Judd, WJ: Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes: A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. Transfusion 22:59, 1982







Modern Blood Banking and Transfusion Practices, Denise M. Harmening, F. A. Davis Company Philadelphia, 3. Auflage, 1994

Instructions for use	Version: 1/2014 Issue: 2014-02
----------------------	-----------------------------------

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>



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