

GEBRAUCHSINFORMATION

Elutions-System



für die Säure-Elution von Antikörpern

IN VITRO DIAGNOSTIKUM

1. Produktbeschreibung

Mit dem Elutions-System 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 bei erworbener hämolytischen Anämie oder bei einem Transfusionszwischenfall verantwortlich sind,
4. Antikörper zu identifizieren, die einen Morbus haemolyticus neonatorum verursachen,
5. spezifische Antikörper aus Seren mit unerwünschten Antikörpern zu isolieren.

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 einer Pufferlösung eingestellt. Das Eluat ist dann gebrauchsfertig.

3. Inhalt des Kits

WASHBUF 10x	Waschpuffer, 10 x Konzentrat; enthält 1% NaN ₃	1 x 50 ml
ELU	Elutionslösung, gebrauchsfertig; Glycin-Puffer mit einem niedrigen pH-Wert, enthält einen pH-Farbindikator und keine Konservierungsmittel oder antimikrobiellen Substanzen	1 x 13 ml
BUF	Pufferlösung, gebrauchsfertig; Tris (hydroxymethylaminomethan)-Lösung, enthält Rinderalbumin und 0,1% NaN ₃	1 x 13 ml

4. Lagerung und Haltbarkeit

Das Waschpufferkonzentrat, die Elutionslösung und die Pufferlösung 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, wenn sie keine Trübungen oder andere Anzeichen für eine Kontamination aufweisen. Die Reagenzien 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 Lagerung von mehr als 72 Stunden 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.

Teströhrchen aus Glas für den Einmalgebrauch (75 x 12 mm)

Einweg-Pasteur-Pipetten

Wasserbad oder Brutschrank ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Zentrifuge

Reagenzien für die Testung des Eluats

7. Ansatz der Waschpuffer-Gebrauchslösung

Das Waschpufferkonzentrat 1:10 mit Aqua dest. verdünnen (1 Teil Waschpufferkonzentrat und 9 Teile Aqua dest.). Die Waschpuffer-Gebrauchslösung kann in einem gekennzeichneten verschlossenen Behälter bei $2...8^{\circ}\text{C}$ 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 in vivo oder in vitro mit Antikörpern beladenen Erythrozyten-Probe einen direkten Coombstest 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 isotonischer NaCl-Lösung 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 dementsprechend ein 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.
4. Die gewaschenen Erythrozyten in ein sauberes gekennzeichnetes Röhrchen überführen. Zu 1 ml gewaschenem Erythrozytenkonzentrat 20 Tropfen (ca. 1 ml) Elutionslösung geben, um die Antikörper zu eluieren. Gut mischen und sofort 45 – 60 Sekunden bei 900 – 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. 5 Tropfen der Pufferlösung gut mit dem Eluat mischen. Dann Pufferlösung tropfenweise zugeben (nach jedem Tropfen gut mischen) bis das Eluat eine deutlich blaue Färbung zeigt. Die blaue Farbe zeigt einen pH-Wert-Bereich von 6,5 bis 7,5 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 das Eluat nicht sofort getestet werden kann, ist bei einer Lagerung bei $2..8^{\circ}\text{C}$ eine Testung noch nach bis zu 7 Tagen möglich, sofern keine Trübung während der Lagerung auftritt. Den pH-Wert-Bereich von 6,5 bis 7,5 für die optimale Reaktivität des Eluats beachten!

9. Untersuchung des Eluats im modifizierten Coombstest

Für die Untersuchung können kommerziell erhältliche Testerythrozytensuspensionen, 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.

1. 1 Tropfen einer 3 – 5 %igen Testerythrozytensuspension in ein sauberes gekennzeichnetes Röhrchen geben und 5 – 10 Tropfen isotonische NaCl-Lösung zugeben. Mindestens 30 Sekunden bei 900 – 1000 x g zentrifugieren. Den Überstand vollständig dekantieren, sodass man ein „trockenes“ Erythrozytensediment erhält.
2. 2 Tropfen Eluat zu dem Erythrozytensediment geben und gut mischen.

Achtung: Wenn die mit Antikörpern beladenen Erythrozyten im direkten Coombstest nur schwach reagiert haben, sollten 3 – 4 Tropfen Eluat eingesetzt werden, um die Sensitivität des Tests zu erhöhen. Kein Rinderalbumin oder andere Verstärkermidien zusetzen!

3. 15 Minuten bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubieren.
4. Nach der Inkubation 5 – 10 Tropfen Waschpuffer-Gebrauchslösung zufügen und mindestens 30 Sekunden bei 900 – 1000 x g zentrifugieren. Den Überstand vollständig dekantieren, sodass man ein „trockenes“ Erythrozytensediment erhält.
5. 2 Tropfen Anti-Humanglobulin (entsprechend den Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation des Anti-Humanglobulins) zugeben und vorsichtig, aber gründlich mischen.
6. 15 Sekunden bei 900 – 1000 x g zentrifugieren.
7. Unter vorsichtigem Aufschütteln des Röhrchens makroskopisch auf Agglutination prüfen.

Achtung: Eine Auswertung mit dem Mikroskop oder anderen optischen Hilfsmitteln sollte nur für die Bestätigung von negativen oder schwachen Reaktionen erfolgen.

8. Negative oder nur schwach positive Ergebnisse sollten durch Zugabe von IgG-beladenen Testzellen überprüft werden.

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 kalter Waschpuffer-Gebrauchslösung 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 Elutions-System 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. 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.
8. Eine zu starke Verdünnung des Eluats durch den Einsatz zu großer Volumina Elutionslösung oder Pufferlösung bei der pH-Wert-Einstellung des Eluats, kann zu schwachen oder falsch negativen Ergebnissen führen.
9. Wenn Erythrozyten nur mit Komplementfaktoren beladen sind, ist es sehr unwahrscheinlich, dass man ein reaktives Eluat erhält.
10. Erythrozyten, die für Elutionsversuche eingesetzt wurden, sind nicht für eine Phänotypisierung geeignet.
11. Generell können Abweichungen von der vorgegebenen Testdurchführung wie falsche Zentrifugation oder Inkubation, unsaubere Röhrchen und/oder kontaminierte Materialien und Proben zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.
12. 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. 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).

Die Pufferlösung und das Waschpufferkonzentrat enthalten NaN_3 als Konservierungsmittel. NaN_3 ist in einer Konzentration von 0,1% gesundheitsschädlich und in einer Konzentration von 1% giftig. Es darf weder inhaliert noch verschluckt werden oder in Kontakt mit der Haut und Schleimhäuten kommen (R- und S. 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.













14. Literatur

Technical manual of the American Association of Blood Banks, 15th ed., 2005

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	
	Inhalt des Kits
	Pufferlösung
	Elutionslösung
	Waschpuffer, 10 x Konzentrat
	In-vitro-Diagnostikum
	Lagertemperatur
	Lot-Nr.
	Verwendbar bis
REF	Bestell-Nr.
	Gebrauchsinformation beachten
	Enthält Natriumazid
	Giftig R 25-52/53, S 45
	Gesundheitsschädlich R 22-52/53, S 02-13-22-46-56-61

- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
 R 25 Giftig beim Verschlucken.
 R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
 S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
 S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
 S 22 Staub nicht einatmen.
 S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
 S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
 S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
 S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen, Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Gebrauchsinformation	Stand: August 2007
----------------------	--------------------



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