



ACID ELUTION KIT
GEBRAUCHSANWEISUNG

Red Cell Elute: Zur Säureelution von Antikörpern aus intakten roten Blutkörperchen.

ZUSAMMENFASSUNG

Allo-/Autoantikörper, die in rote Blutkörperchen adsorbiert wurden, ob *in vivo* oder *in vitro*, können anhand von Elution dissoziiert und wiedergewonnen werden. Das Eluat kann dann dazu verwendet werden, einen einzelnen Antikörper in multispezifischen Seren zu identifizieren, das Vorhandensein eines schwachen Antigens nachzuweisen, den für einen positiven direkten Coombs-Test verantwortlichen Antikörper bei einer erworbenen hämolytischen Anämie oder einer Transfusionsreaktion zu identifizieren, die Antikörper zu identifizieren, die eine hämolytische Krankheit beim Neugeborenen verursachen, oder einen spezifischen Antikörper aus Seren, die ungewollte Antikörper enthalten, zu präparieren.

VERWENDUNGSZWECK

Dieses Kit soll anhand eines säurehaltigen Elutionspuffers Antikörper des Typs IgG aus menschlichen roten Blutkörperchen dissoziieren (eluierten) und nachfolgend anhand eines alkalischen Puffers den Säuregrad des Eluats anpassen, sodass die IgG-Antikörper im Eluat mittels immunhämatologischer Testverfahren identifiziert werden können.

GRUNDSATZ

Nicht absorbierte Antikörper in der Probe werden durch Waschen mit der Waschlösung entfernt. Nach dem Waschen wird der Antigen-Antikörper-Komplex durch das Hinzufügen einer Lösung mit einem niedrigen pH-Wert aufgebrochen. Das wiedergewonnene Eluat wird durch Hinzufügen einer gepufferten Grundlösung auf den pH-Wert $7,0 \pm 0,5$ angeglichen (siehe **Einschränkungen**). Um sicherzustellen, dass das Eluat nur an rote Blutkörperchen gebundene Antikörper enthält, muss die überstehende Flüssigkeit von der letzten Waschung der zu eluierenden roten Blutkörperchen parallel zum Eluat untersucht werden.

KIT-BESCHREIBUNG

Lorne Red Cell Elute ist ein Säureelutionskit. Das Kit besteht aus einer konzentrierten Waschlösung, die zur Minimierung der Dissoziation von Antikörpern während des Waschens eingesetzt wird, einer Lösung zur Säureelution, die eine Glycin-Pufferlösung mit einem niedrigen pH-Wert ist und einen Farbstoff enthält (pH-Indikator), und einer gepufferten Grundlösung, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, eine Lösung, die Rinderalbumin enthält. Das Kit enthält weder CMR-Stoffe oder Stoffe mit endokriner Wirkung oder Stoffe, die beim Benutzer zu einer Sensibilisierung oder einer allergischen Reaktion führen könnten, noch besteht es aus solchen Stoffen. Alle Lösungen werden mit der optimalen Verdünnung zur Verwendung mit allen unten angegebenen empfohlenen Methoden geliefert, ohne dass sie weiter verdünnt werden müssen oder ihnen etwas hinzugefügt werden muss, mit Ausnahme der konzentrierten Waschlösung. Die Los-Referenznummer und das Ablaufdatum befinden sich auf dem **Etikett der Epruvette**.

LAGERUNG

Nicht einfrieren. Epruvetten mit Reagenzien sollten bei Erhalt bei Raumtemperatur gelagert werden. Eine längere Lagerung bei Temperaturen außerhalb dieses Bereichs kann zu einem beschleunigten Verlust der Aktivität des Reagens führen. Dieses Reagens wurde Transportstabilitätsstudien bei 37 °C und -25 °C unterzogen, wie sie im Dokument BS EN ISO 23640:2015 beschrieben werden.

PROBENNAHME UND VORBEREITUNG

Es können Proben anhand einer aseptischen Phlebotomie-Technik genommen werden. Es werden antikoagulierte Proben mit EDTA bevorzugt. Bei einer Verzögerung der Untersuchung die Proben bei 2-8 °C lagern. Die Verwendung von Zellen, die älter als 72 Stunden sind, kann weniger Antikörper ergeben und den pH-Wert des letzten Eluats verändern.

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Das Reagens ist nur zur Verwendung bei der *In-vitro*-Diagnostik vorgesehen.
2. Weist eine Epruvette Risse auf oder leckt sie, sind die Inhalte unverzüglich zu entsorgen.
3. Das Reagens nicht nach dem Ablaufdatum verwenden (siehe **Etikett der Epruvette**).
4. Das Reagens nicht verwenden, wenn ein Niederschlag vorhanden ist.
5. Bei der Handhabung des Reagens ist Schutzkleidung wie Einmalhandschuhe und ein Laborkittel zu tragen.
6. Die Reagenzien wurden zur Reduzierung der Keimbelastung durch eine 0,2 µm-Kapsel gefiltert, werden jedoch nicht steril geliefert. Nach erfolgter Öffnung einer Epruvette sollten die Inhalte bis zum Ablaufdatum brauchbar sein, solange keine ausgeprägte Trübung vorliegt, die auf eine Verschlechterung oder Kontamination des Reagens hinweisen kann.

7. Die Waschlösung enthält 0,1 % Natriumazid. Natriumazid kann bei Verschlucken giftig sein und kann mit Abflussrohren aus Blei und Kupfer reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit großen Mengen Wasser wegspülen.
8. Bei der Verwendung und Entsorgung einer jeden Epruvette und ihrer Inhalte ist mit Vorsicht vorzugehen.

ENTSORGUNG DES REAGENS UND UMGANG MIT VERSCHÜTTUNGEN

Für Informationen zur Entsorgung der Kit-Reagenzien und der Dekontaminierung bei Verschüttungen siehe die **Sicherheitsdatenblätter**, die auf Anfrage verfügbar sind.

KONTROLLEN UND RAT

1. Der Test der zurückgehaltenen Lösung von der letzten Waschung wird bestätigen, dass der im Eluat erkannte Antikörper aus einem gebundenen Zustand herausgelöst wurde und nicht von einem freien Antikörper stammt, der nach unzureichendem Waschen zurückgeblieben ist. Wenn die Kontrollröhrchen positiv sind, sollte die Elution wiederholt und darauf geachtet werden, dass eine gründliche Waschung erfolgt.
2. Die Coombs-Röhrchenmethode kann nur dann als gültig betrachtet werden, wenn alle negativen Tests positiv mit den IgG-sensibilisierten roten Blutkörperchen reagieren (Coombs-Kontrollzelle).
3. Bei den **empfohlenen Methoden** beträgt ein Volumen ungefähr 50 µl, wenn der mitgelieferte Tropfer verwendet wird.
4. Die Verwendung des Kits und die Interpretation der Ergebnisse muss von ordnungsgemäß geschultem und qualifiziertem Personal in Übereinstimmung mit den Anforderungen des Landes, in dem das Kit verwendet wird, durchgeführt werden. Der Benutzer muss bestimmen, ob sich das Kit zur Verwendung bei anderen Methoden eignet.

MITGELIEFERTE KIT-KOMPONENTEN

- Lösung zur Säureelution 1 x 10 ml (Lösung I).
- Gepufferte Grundlösung 1 x 10 ml (Lösung II).
- Konzentrierte Waschlösung 2 x 25 ml.
- Waschflasche.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Röhrchenmethode

- Antihumanglobulin, d. h. Lorne AHG Elite (Katalognr. 435010 oder 415010) oder Anti-Human-IgG, d. h. Lorne Anti-Human IgG (Katalognr. 402010 oder 401010).
- Coombs-Zellwaschzentrifuge.
- Glas-Teströhrchen (10 x 75 mm oder 12 x 75 mm).
- PBS-Lösung (pH 6,8–7,2) oder isotonische Kochsalzlösung (pH 6,5–7,5).
- IgG-sensibilisierte rote Blutkörperchen, d. h. Lorne Coombs Control Cells (Katalognr. 970010).
- Wasserbad oder Trockeninkubator, äquilibriert auf 37 °C ± 2 °C.

Bio-Rad-ID Micro-Typisierungsmethode

- Bio-Rad-ID-Karten (LISS/Coombs oder Coombs-Anti-IgG).
- Bio-Rad-ID-Zentrifuge.
- Bio-Rad ID-CellStab oder ID-Diluent 2.
- Bio-Rad-ID-Inkubator, äquilibriert auf 37 °C ± 2 °C.

Ortho BioVue-Typisierungsmethode

- Ortho BioVue-Systemkassetten (AHG polyspezifisch oder AHG Anti-IgG).
- Ortho BioVue-System-Zentrifuge.
- Ortho BioVue-System-Heizblock, äquilibriert auf 37 °C ± 2 °C.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent.

Alle Methoden

- Vollpipetten.

PRÄPARIEREN DER WASCHLÖSUNG

1. Den Inhalt von 1 Flasche mit konzentrierter Waschlösung in die mitgelieferte Waschflasche gießen.
2. Genug qualitativ hochwertiges destilliertes oder deionisiertes Wasser hinzufügen, um die Waschflasche bis zur Markierung (250 ml) zu füllen, und gut mischen.
3. Die Waschlösung ist gebrauchsfertig und kann bei 2-8 °C bis zu sechs Monate lang gelagert und verwendet werden, wenn keine Trübung vorliegt.

- Die Verwendung von kalter Waschlösung minimiert während der Waschphase des Verfahrens die Dissoziation von Antikörpern.

TESTEN DER PROBE DER ROTEN BLUTKÖRPERCHEN VOR DER ELUTION

- Einen direkten Coombs-Test an der zu untersuchenden Probe der roten Blutkörperchen durchführen und die Ergebnisse aufzeichnen.
- Ergibt die Probe einen positiven direkten Coombs-Test, liegen auf den roten Blutkörperchen gebundene Antikörper vor, entweder aufgrund von *In-vivo*- oder von *In-vitro*-Sensibilisierung.
- Zur Bestimmung dessen, ob die Sensibilisierung durch das Immunglobulin oder das Komplement bewirkt wurde, die Probe auf Anti-IgG und Anti-C3d testen.
- Ergibt sich bei der Probe ein positives Ergebnis für Anti-IgG, ergab sich der positive direkte Coombs-Test durch das Immunglobulin und es kann eine Elution durchgeführt werden, um vorhandene Antikörper zu entfernen und zu identifizieren.
- Ergibt sich bei der Probe ein positives Ergebnis für Anti-C3d, wurde der positive direkte Coombs-Test durch das Komplement bewirkt und es sollte keine Elution durchgeführt werden, weil sie keine Antikörperaktivität anzeigen können wird.
- Je stärker das Ergebnis des direkten Coombs-Test ausfallen wird, desto mehr Antikörper werden sich bereitwillig von der Fläche der roten Blutkörperchen eluieren lassen.

EMPFOHLENE ELUTIONSMETHODE

- Eine 2 ml-Probe der zu testenden Probe der roten Blutkörperchen nehmen und die roten Blutkörperchen einmal in isotonischer Kochsalzlösung waschen. Darauf achten, die Kochsalzlösung nach dem Waschen vollständig zu dekantieren.
- Die roten Zellen viermal mit der Waschlösung waschen, um alle nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.
- Einen kleinen aliquoten Teil der überstehenden Flüssigkeit des letzten Waschvorgangs zurückbehalten; dieser wird später verwendet, um ihn auf Antikörperaktivität hin zu untersuchen.
- Sicherstellen, dass die Waschlösung nach jedem Waschvorgang vollständig dekantiert wird.
- In ein gekennzeichnetes Teströhrchen geben: 1 ml der gewaschenen, sensibilisierten, komprimierten roten Blutkörperchen, und 1 ml von Lösung I dazugeben, um den Antikörper zu eluieren.
- Gründlich mischen und das Röhrchen 60 Sekunden lang bei 1000 rcf oder für einen geeigneten alternativen Zeitraum und mit geeigneter Kraft zentrifugieren.
- Die überstehende Flüssigkeit (das Eluat) in ein sauberes Röhrchen übertragen und die Zellen entsorgen.
- Dem Eluat tropfenweise Lösung II hinzugeben und nach jedem Tropfen gut mischen, bis eine blaue Farbe erscheint. Die blaue Farbe weist auf einen pH-Wert im Bereich von 6,5-7,5 hin und bedeutet, dass das Eluat auf den korrekten pH-Wert gepuffert wurde.
- Bei Auftreten von Niederschlag 60 Sekunden lang bei 1000 rcf oder für einen geeigneten alternativen Zeitraum und mit geeigneter Kraft zentrifugieren.
- Zum Untersuchen des Eluats siehe unten. Das Eluat kann bis zu 7 Tage lang bei 2-8 °C gelagert werden.

AUSWAHL DER ROTEN BLUTKÖRPERCHEN FÜR DAS ELUAT / ÜBERSTEHENDE FLÜSSIGKEIT AUS DEM LETZTEN WASCHVORGANG

- Die Auswahl der roten Blutkörperchen für die Untersuchung in Verbindung mit dem Eluat hängt vom jeweiligen Labor ab.
- Es können kommerzielle rote Blutkörperchen mit 3-5 % oder 0,8 % Reagens verwendet werden.
- Proben roter Blutkörperchen von Patienten und Spendern können unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Zellen vor der Verwendung mindestens dreimal in isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und dann auf 3 % oder 0,8 % suspendiert werden.
- Wird eine medikamenteninduzierte hämolytische Anämie angenommen, sollte das Eluat auf Zellen, die mit dem fraglichen Medikament sensibilisiert wurden, untersucht werden.

UNTERSUCHUNG DES ELUATS/ DER ÜBERSTEHENDEN FLÜSSIGKEIT AUS DEM LETZTEN WASCHVORGANG

A. Röhrchentest-Methode

- In ein gekennzeichnetes Teströhrchen geben: 2 Volumen* des Eluats oder der überstehenden Flüssigkeit aus dem letzten Waschvorgang und 1 Volumen rote Zellen.
- Gut mischen und 15 Minuten lang bei 37 °C inkubieren.
- Nach der Inkubation 10 Tropfen der Waschlösung hinzugeben.
- Gründlich mischen und alle Röhrchen 30 Sekunden lang bei 1000 rcf oder für einen geeigneten alternativen Zeitraum und mit geeigneter Kraft zentrifugieren.
- Die Lösung dekantieren und dann zwei Tropfen Antihumanglobulin hinzufügen.
- Gründlich mischen und 20 Sekunden lang bei 900-1000 rcf zentrifugieren.

- Die Zellen resuspendieren und auf die Agglutination hin ablesen. Die Ergebnisse aufzeichnen.
- Anhand von IgG-sensibilisierten roten Blutkörperchen die Gültigkeit aller negativen Reaktionen bestätigen (siehe **Kontrollen und Rat**).

* Wurde bei den sensibilisierten Zellen ein schwacher direkter Coombs-Test (2+ oder weniger) beobachtet, können 3-4 Tropfen des Eluats verwendet werden, um die Sensibilität des Tests zu steigern.

B. Bio-Rad-ID Micro-Typisierungsmethode

- Eine 0,8%-ige Suspension gewaschener roter Blutkörperchen in Bio-Rad-ID-Diluent 2 erstellen.
- Aluminiumfolie von so vielen Bio-Rad-LISS/Coombs oder Coombs-Anti-IgG-Gelkarten-Mikroröhrchen wie notwendig entfernen.
- In ein geeignetes Mikroröhrchen geben: 50 µl rote Blutkörperchen-Suspension und 25 µl des Eluats.
- In ein anderes Mikroröhrchen geben: 50 µl rote Blutkörperchen-Suspension und 25 µl der überstehenden Flüssigkeit des letzten Waschvorgangs.
- Die LISS/Coombs-ID-Karte(n) 15 Minuten lang bei 37 °C inkubieren.
- Die LISS/Coombs-ID-Karte(n) in der Bio-Rad-ID-Karten-Zentrifuge zentrifugieren.
- Makroskopisch auf die Agglutination hin ablesen.

C. Ortho BioVue-Typisierungsmethode

- Eine 0,8%-ige Suspension gewaschener roter Blutkörperchen in 0,8 % Ortho Red Cell Diluent erstellen.
- Aluminiumfolie von so vielen Reaktionskammern von Ortho AHG polyspezifischen oder AGH Anti-IgG-Kassetten wie notwendig entfernen.
- In eine geeignete Reaktionskammer geben: 50 µl der Testsuspension der roten Blutkörperchen und 40 µl des Eluats.
- In eine andere Reaktionskammer geben: 50 µl rote Blutkörperchen-Suspension und 40 µl der überstehenden Flüssigkeit des letzten Waschvorgangs.
- Die Kassette(n) 15 Minuten lang bei 37 °C inkubieren.
- Die Kassette(n) in einer Ortho-BioVue-System-Zentrifuge zentrifugieren.
- Makroskopisch auf die Agglutination hin ablesen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- Positiv:** Eine Agglutination der roten Blutkörperchen stellt ein positives Testergebnis dar und zeigt innerhalb der zulässigen Einschränkungen des Testverfahrens an, dass ein oder mehr Antikörper aus den sensibilisierten roten Blutkörperchen gewonnen wurden.
- Negativ:** Eine nicht vorhandene Agglutination der roten Blutkörperchen stellt ein negatives Testergebnis dar und zeigt innerhalb der zulässigen Einschränkungen des Testverfahrens an, dass kein Antikörper aus den sensibilisierten roten Blutkörperchen gewonnen wurde.
- Die Ergebnisse der überstehenden Flüssigkeit des letzten Waschvorgangs müssen negativ sein. Bei positiven Ergebnissen muss der Test wiederholt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die Aktivität des Eluats wird von der Menge der an die roten Blutkörperchen gebundenen Antikörper, dem Maß an Dissoziation von Antikörpern während des Waschverfahrens und dem Grad, in dem Immunglobulin während der Dissoziation durch den niedrigen pH-Wert denaturiert wird, eingeschränkt.
- Die Kontamination des Eluats mit nicht gebundenen Antikörpern aufgrund von unzureichendem Waschen der roten Blutkörperchen beim Elutionsverfahren kann die Aktivität des Eluats einschränken.
- Wird der pH-Wert nicht auf den richtigen Bereich eingestellt, kann dies eine Hämolyse zur Folge haben.
- Eine übermäßige Verdünnung des Eluats durch das Hinzufügen übermäßiger Mengen an „gepufferter Grundlösung“ beim Anpassen des pH-Werts des Eluats kann schwächere oder falsch negative Ergebnisse hervorrufen.
- Für Elutionsstudien verwendete rote Blutkörperchen sollten nicht zur Phänotypisierung verwendet werden.
- Falsch positive oder falsch negative Ergebnisse können auch auftreten aufgrund von:
 - Kontamination von Testmaterialien
 - Ungeeigneter Zellkonzentration
 - Ungeeigneter Inkubationszeit oder -temperatur
 - Unsachgemäßer oder übermäßiger Zentrifugierung
 - Unsachgemäßer Lagerung von Testmaterialien oder Auslassung von Reagenzien
 - Abweichung von den empfohlenen Methoden

BESTIMMTE LEISTUNGSMERKMALE

- Das Kit zeichnete sich durch alle in den **empfohlenen Methoden** erwähnten Verfahren aus.
- Vor der Freigabe wurde jedes Los des Lorne Red Cell-Elute anhand von **empfohlenen Methoden** getestet und es wurde gezeigt, dass es eine große Bandbreite an IgG-Antikörpern aus sensitivierten roten Blutkörperchen eluiert.

3. Das Kit hält die in der neuesten Ausgabe der Richtlinien für die Bluttransfusionsdienste im Vereinigten Königreich enthaltenen Empfehlungen ein.

HAFTUNGSAUSSCHLUSS

1. Für das Leistungsverhalten des Kits nach einem anderen Verfahren als den in der **empfohlenen Methode** erwähnten ist der Benutzer verantwortlich.
2. Alle Abweichungen von der **empfohlenen Methode** sollten vor der Verwendung validiert werden¹.

BIBLIOGRAPHIE

1. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. *Transfusion Medicine*, 1995, **5**, 145-150.
2. Judd WJ. Elution of Antibody from Red Cells. In: Seminar On Antigen-Antibody Reactions Revisited. Bell CA. Ed. Arlington. VA: American Association of Blood Banks 1982:175.
3. Rekvig OP, Hannestad K. Acid Elution of Blood Group Antibodies from Intact Erythrocytes. *Vox Sang* 1977: 33:280.
4. R.M. Leger, P.A. Arndt, D.J. Ciesielski, und G. Garratty. False-positive eluate reactivity due to the low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. *Transfusion* 1998;38:565-572

VERFÜGBARE GRÖSSEN DER REAGENZIEN

| | Packungsgröße | Katalognummer |
|----------------|---------------|---------------|
| Red Cell Elute | 10 Tests/Kit | 930110 |



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Vereinigtes Königreich
Tel: +44 (0) 118 921 2264
Fax: +44 (0) 118 986 4518
E-Mail: info@lornelabs.com

| | | |
|-----------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EC | REP | Advena Ltd. Tower Business Centre, 2 nd Fl., Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta |
|-----------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|