

Bromelin solution

für die Röhrchenmethode

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

ZWECKBESTIMMUNG

Bromelin ist ein konserviertes, stabiles Enzymreagenz, dessen Wirksubstanz aus der Ananas hergestellt wird. Nach entsprechender Verarbeitung des Enzymproteins entsteht die gebrauchsfertige Bromelin solution.

Die Anwendung dieses Reagenzes ist nur für qualifiziertes und geschultes Fachpersonal vorgesehen.

PRINZIP DES VERFAHRENS

In der Blutgruppenserologie wird Bromelin solution zur Bestimmung von sehr schwachen Isoagglutininen, für den Kompatibilitätstest, sowie zur Verstärkung der Reaktion von Immunantikörpern verwendet. Das Reagenz wird daher auf der Routinesuche nach Antikörpern in Seren von Probanden und Patienten verwendet. Die Wirkung beruht auf ihrer Fähigkeit als proteolytisches Enzym die Oberfläche von Erythrozyten so zu verändern, dass eine bessere Zugänglichkeit einiger Antigene für die entsprechenden Immunglobuline erreicht wird. Eine Reihe von Blutgruppenantigenen werden dagegen aber durch Bromelin zerstört, wie z. B. MNSs, Duffy, Xg, Pr und T.

TESTSEREN

Das aufgeführte Reagenz wird in der folgenden Form angeboten:

Bromelin solution *ready for use (1-drop-technique)*

Das Reagenz enthält als Konservierungsmittel 0,01% (w/v) Neomycinsulfat. Außer dem aktiven Enzym-Bestandteil beinhaltet das Reagenz Natriumchlorid, hochmolekulare Verbindungen und Pufferlösungen.

WANRUNG

Das Reagenz wurde aus dem Pflanzenextrakt der Ananas hergestellt. Dieses biologische Produkt sollte wegen nie völlig auszuschließender Gefährdung durch Krankheitserreger als potentiell infektiös angesehen werden.

Das Reagenz enthält Neomycinsulfat, das toxisch wirken kann.

Bei der Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen.

Aus den oben genannten Gründen sollte das Reagenz mit angemessener Sorgfalt gehandhabt werden.

LAGERUNG

Ungeöffnet und nach dem erstmaligen Öffnen gut verschlossen bei +2 bis +8 °C lagern, kurzzeitig zur Anwendung auch bei Raumtemperatur.

Grundsätzlich nur bis zum angegebenen Verfallsdatum lagern und anwenden.

HINWEISE

1. Es sollten bei jeder Austestung positive und negative Kontrollen mitgeführt werden.
2. Unsachgemäß Lagerung beeinträchtigt die Wirksamkeit des Reagenzes.
3. Die Reaktionsfähigkeit des Reagenzes wird durch eine leichte Trübung nicht beeinträchtigt. Bakterielle und chemische Kontamination des Reagenzes ist zu vermeiden.
4. Wenn eine sichtbare Veränderung des Reagenzes festgestellt wird sollte es nicht mehr eingesetzt werden, die Veränderung kann auf eine mikrobielle Kontamination hinweisen.
5. Die Stärke der positiven Reaktion ist vom Alter des verwendeten Blutes abhängig.
6. Zentrifugieren außerhalb des angegebenen Drehzahl-Bereiches kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
7. Bei der Anwendung dieses Reagenzes sind alle gültigen nationalen Gesetze, Verordnungen und Richtlinien in ihrer gültigen Fassung zu beachten, in Deutschland insbesondere die „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“¹.

PROBENVORBEREITUNG

1. Blutproben sollten mit einer der üblichen Entnahmetechnik gewonnen werden.
2. Das auszutestende Blut sollte so bald wie möglich nach der Blutentnahme geprüft werden, um die Gefahr falsch positiver bzw. falsch negativer Reaktionen durch unsachgemäße Lagerung oder Kontamination der Probe zu minimieren.

Nicht sofort getestetes Blut ist bei +2 bis +8 °C zu lagern.

Mit EDTA antikoagulierte Blutproben müssen innerhalb von 7 Tagen und mit Natriumzitrat behandelte Proben innerhalb von 14 Tagen nach der Entnahme getestet werden.

Konserven/Spenderblute können bis zum Verfallsdatum ausgetestet werden.

VORBEREITUNG DER TESTSEREN

Eine Vorbereitung des Reagenzes ist nicht erforderlich.

Das Reagenz wird direkt aus dem Fläschchen entnommen und eingesetzt.

VERFAHRENSWEISE

Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber benötigte Materialien:

- Röhrchenmethode:
1. Teströhrchen (10 x 75 mm oder 12 x 75 mm)
 2. Mikroliterpipette
 3. Zentrifuge
 4. Kurzzeitwecker
 5. isotonische Kochsalzlösung (0,85 - 0,9% Natriumchlorid)

Testdurchführung

Röhrchen-Zentrifugationsmethode

1. a) 2-5%ige Erythrozytensuspensionen in isotonischer Kochsalzlösung vorbereiten. (Erythrozyten können vorab 1-3 Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen werden) oder
b) Testerythrozyten eines kommerziell erworbenen Zellpanels verwenden.
2. In ein beschriftete Teströhrchen
a) 100 µL eines entsprechenden Testserums geben oder
b) 100 µL eines zu testenden Patienten/Probanden Serums/Plasmas geben.
3. In das Teströhrchen 100 µL
a) der entsprechenden Erythrozytensuspension zugeben
b) Testerythrozyten eines kommerziell erworbenen Zellpanels zugeben.
4. Anschließend einen Tropfen Bromelin solution zugeben.
5. Die Erythrozyten-/Reagenzmischung durch leichtes Schütteln mischen.
6. Teströhrchen 5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Teströhrchen 1 Minute bei 1.000 U/min (ca. 180-270 x g) zentrifugieren.
8. Zellen durch vorsichtiges Schütteln vollständig vom Röhrchenboden lösen und innerhalb 3 Minuten makroskopisch auf Agglutination untersuchen.
9. Ergebnis protokollieren.

Deutsch

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

„Vorsichtiges Schütteln“ bei der Röhrchen-Zentrifugationsmethode:

- Positives Ergebnis (+): Eine Agglutination der Erythrozyten ist als positives Testergebnis zu werten und zeigt
- a) die Anwesenheit des entsprechenden Antigens an.
 - b) die Anwesenheit eines oder mehrerer Antikörper an, die mit Hilfe des Antigramms des Zellpanel identifiziert werden können

- Negatives Ergebnis (-): Das Fehlen einer Agglutination der Erythrozyten ist als negatives Testergebnis zu bewerten und zeigt
- a) das entsprechende Antigen ist nicht nachweisbar.
 - b) ein irregulärer 'Antikörper liegt nicht vor.

GRENZEN DER TESTMETHODEN

1. Ungenauigkeiten bei der Einhaltung der Anweisungen in den Abschnitten „Testdurchführung“ und „Interpretation der Testergebnisse“ können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
2. Mitgeführte Kontrollen mit nicht eindeutigen oder falschen Ergebnissen führen automatisch zur nicht Verwertbarkeit aller Ergebnisse.
3. Hämolytierte, trübe, kontaminierte oder geronnene Blutproben dürfen nicht im Test eingesetzt werden.
4. Kein einzelnes Testserum oder eine einzelne Methode können garantieren alle seltenen oder schwachen Antigene und alle Varianten der Antigene zu detektieren.²
5. Erythrozyten, die mit Alloantikörpern oder Autoantikörpern sensibilisiert sind (z.B. Erythrozyten positiv im direkten Antiglobulintest), sind für die Austestung ungeeignet.
6. Manche Antigene wie z.B. MNSs, Duffy, Xg, Pr und T werden durch Bromelin zerstört!
7. Die Konzentration, die Aktivität und das eingesetzte Volumen des verwendeten Enzyms sind sehr wichtig. Durch falsche oder zu lange Lagerung des Enzyms (Inaktivierung des Enzyms), aber auch die Verwendung von zu viel Enzym-Lösung (Zerstörung der Antigene) kann es zu falsch negativen Ergebnissen führen. Bei einem negativen Testergebnis wird empfohlen die Enzymaktivität mit „Bromelin-Kontrolllösung“ zu überprüfen. Der Bromelin-Kontrolllösungs-Ansatz reagiert nur positiv wenn Bromelin mit einer ausreichenden Aktivität zugesetzt wurde.

LITERATUR

1. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)
2. Peter D. Issit, David J. Anstee *Applied Blood Group Serology*, 4. Edition, Montgomery Scientific Publications 1998
3. Brecher ME, ed. Technical manual 14th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
4. Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel *Transfusionsmedizin*, 3. Auflage, Springer-Verlag 2004.

REF	Artikel-Nummer	LOT	Charge
	Lagerung von - bis		Verfallsdatum
	In-Vitro Diagnostikum		CE EG CE Symbol
	Hersteller nach 98/79/EG		Gebrauchsinformation beachten
	Unique Device Identification		Vertreiber

REF
BG1613 Bromelin solution 10 ml

730-13-1906 Version 006 / 01.04.2022

CE

ANTITOXIN GmbH Industriestraße 88 69245 Bammental Deutschland
+49 (0) 6223/ 8661-0 +49 (0) 6223/ 8661-13 gara@antitoxin-gmbh.de

sifin

sifin diagnostics gmbh
Berliner Allee 317-321
13088 Berlin / Germany
+49 30 700 144-0

Bromelin solution

English

for Tube Method

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTENDED USE

Bromelin is a preserved stable enzyme reagent whose active ingredient is produced from pineapple. After appropriate processing of the enzyme protein, the ready to use Bromelin solution is formed.

The reagent is intended to be used by qualified and technical personnel only.

PRINCIPLE OF PROCEDURE

Bromelin solution is used in blood group serology to determination very weak Isoagglutinates, for the compatibility test as well as to enhance the response of immune antibodies. The reagent is therefore used in the routine search for antibodies in sera of patient and probands.

The effect is due to their ability as a proteolytic enzyme to change the surface of erythrocytes in such a way that a better accessibility of some antigens for the corresponding immunoglobulins is achieved.

However, a number of blood group antigens are destroyed by bromelin, such as MNSs, Duffy, Xg, Pr and T.

REAGENTS

The listed reagent is offered in the following form:

Bromelin solution *ready for use (1-drop-technique)*

The reagent contains 0.01% (w/v) neomycinsulfat as preservative.

Beside of the part of active enzym component, the reagent contains sodium chloride, macromolecules and buffer solutions.

WARNING

The reagent is prepared from the vegetable extract of pineapple.

As biological product it should be looked upon as potentially infectious because of never complete exclusion of danger through excitants of disease. The reagent contains neomycinsulfat that may be toxic.

On disposal, flush with large quantities of water.

For the reasons mentioned above the reagent should be handled with proper care.

STORAGE REQUIREMENT

Store opened and unopened products at +2 to +8°C.

May be at room temperature while in use.

In principle, store and use the reagent to declared expiry date only.

REMARKS

1. With each testing positive and negative controls should be performed.
2. Inappropriate storage impairs efficacy of the reagent
3. Weak turbidity of the reagent does not affect its reactivity.
- Bacteria and chemical contamination of the reagent should be avoided.
If a visible change is detected, the reagent should no longer be used, this sign may indicate a microbiological contamination.
4. Strength of positive reactions also depends on age of used blood.
5. Centrifugation highly different from appointed relative centrifugal force may lead to false results.
6. The test method identified below is for manual testing only. When using automated or semi-automated instruments, follow the procedures that are contained in the operator's manual provided by the device manufacturer. Laboratories must follow approved validation procedures.
7. For usage of this reagent all effective national laws, directives and guidelines have to be observed in its current valid version, in Germany especially the „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“.

SAMPLE PREPARATION

1. Blood sample should be collected by approved medical procedure.
2. Blood samples to be tested should be used as soon as possible after blood collection to reduce the risk of false-positive and false-negative results due to improper storage or contamination of the reagent.
If a delay in testing occurs, samples should be stored at +2 to +8°C.
Blood drawn into EDTA should be tested within 7 days and samples treated with sodium citrate within 14 days after collection.
Blood bag / Donor Blood can be tested until the expiry date.

REAGENT PREPARATION

There is no preparation of the reagent required.
Take and use the reagent directly from the vials.

PROCEDURE

Not included but necessary materials:

- Tube Centrifugation Method:
1. test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm)
 2. microliter pipette
 3. centrifuge
 4. timer
 5. isotonic saline (0,85 - 0,9% sodium chloride)

Test procedure

Tube Centrifugation Method

1. a) Prepare 2% to 5% suspensions of red blood cells in isotonic saline (red blood cells may be washed 1-3 times with isotonic saline) or b) use test erythrocytes of a commercially acquired cell panel.
2. In a labeled test tube a) give 100µl of an equivalent test serum, or b) give 100µl serum/plasma of a patient/proband to be tested
3. add to the test tube 100µl a) of the appropriate cell suspension or b) test erythrocytes of a commercially acquired cell panel.
4. Then add one drop of Bromelin solution
5. Mix Erythrocytes / Reagentmixture well by slightly shaking.
6. Incubate tube at room temperature for 5-15 min.
7. Centrifugation of the tube for 1 minute at 1.000 rpm (approximately 180-270 x g).
8. Gently shake the red cells completely from the bottom of the tube and check macroscopically for agglutination within 3 minutes.
9. Document the result.

INTERPRETATION OF RESULTS

"Slightly shaking" at Tube Centrifugation Method:

- Positive results (+): Visible agglutination of erythrocytes is a positive result and indicates
- a) the presence of the corresponding antigen
 - b) the presence of one or several antibodies which can be identified with the help of the antigen of the cell panel.
- Negative results (-): No visible agglutination of erythrocytes is a negative result and indicates
- a) the absence of the corresponding antigen
 - b) an irregular antibody does not exist.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Inaccuracy at compliance with instructions written under section "Procedures" and "Interpretation of results" may lead to incorrect results.
2. No valid conclusion concerning the test result can be reached, if controls with uncertain or false results occur.
3. Hemolyzed, turbid, contaminated or clotted blood samples must not be used in this test.
4. No one specific antiserum or technique can be guaranteed to detect all rare, weak or variant of antigens.²
5. Red blood cells coated with alloantibodies or autoantibodies (i.e., cells that are positive in the direct antiglobulin-test (DAT)) are unsuitable for testing.
6. Some antigens as e.g. MNSs, Duffy, Xg, Pr or T are destroyed by Bromelin.
7. The concentration, activity and volume used of the enzyme are very important. Due to incorrect or too long storage of the enzyme solution (inactivation of the enzyme), but also the use of too much enzyme solution (destruction of antigens), can lead to false negative results. In case of a negative test result, it is recommended to check the enzyme activity with "Bromelin control solution". Bromelin control solution only reacts positively if bromelin has been added to the test approach with sufficient activity.

LITERATURE

1. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)
2. Peter D. Issit, David J. Anstee Applied Blood Group Serology, 4. Edition, Montgomery Scientific Publications 1998
3. Brecher ME, ed. Technical manual 14th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002
4. Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel Transfusionsmedizin, 3. Auflage, Springer-Verlag 2004.

REF	Product Code	LOT	Lot
	Store from - to		Expiration Date
	In-Vitro Diagnostic		EU CE symbol
	Manufacturer as to 98/79/EG		Observe instruction for use
	Unique Device Identification		Distributor

REF
BG1613 Bromelin solution 10 ml

730-13-1906 Version 006 / 01.04.2022

CE

ANTITOXIN GmbH Industriestraße 88 69245 Bammental Germany
+49 (0) 6223/ 8661-0 +49 (0) 6223/ 8661-13 gara@antitoxin-gmbh.de

sifin

sifin diagnostics gmbh
Berliner Allee 317-321
13088 Berlin / Germany
+49 30 700 144-0