

Instructions for use



Sanquin Reagents B.V.
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands

Phone: +31 20 5123599
Fax: +31 20 5123570
Reagents@sanquin.nl
www.sanquin.org/reagents

PeliStrip elution kit

REF **K1398**

IVD **CE**

054_v02 01/2017 (fr)

Réservé à l'usage professionnel

Kit pour l'éluion d'anticorps à partir d'érythrocytes



À conserver à l'obscurité

Informations générales

Le PeliStrip elution kit est utilisé pour l'éluion acide rapide d'anticorps à partir d'érythrocytes intacts. Par exemple dans le but d'identifier les anticorps chez des patients qui présentent un TDA (test direct à l'antiglobuline) positif ou dans le but d'identifier des anticorps qui ont été isolés à partir de sérum ou de plasma par fixation *in vitro* sur des érythrocytes sélectionnés. L'éluat peut être analysé à la manière de sérum ou de plasma pour détecter et identifier les anticorps.

Éléments du kit

Elution Solution 1 : deux flacons (capuchon blanc) de 8 ml. À conserver entre 18-25°C.

Neutralisation Solution 2 : un flacon (capuchon noir) de 12 ml. Ce tampon de neutralisation Tris contient de l'albumine sérique bovine (BSA) et est de couleur bleue pour l'indication du pH et une identification aisée. À conserver entre 18-25°C à l'obscurité.

Précautions

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Le kit doit être conservé entre 18-25°C. La Neutralisation Solution 2 doit être conservée à l'obscurité. Une conservation prolongée à la lumière peut entraîner une décoloration de la Neutralisation Solution 2. Si la Neutralisation Solution 2 n'est pas de couleur bleue, la solution ne doit pas être utilisée.

La Neutralisation Solution 2 contient du NaN₃ à 0,1% (poids/volume) comme conservateur. Ne pas congeler.

Bien que l'albumine sérique bovine ait été testée pour les maladies infectieuses et que les résultats se soient avérés négatifs, le réactif ne peut être garanti exempt d'agents infectieux. Il convient d'agir avec précaution lors de l'utilisation et de l'élimination de chaque conteneur et de son contenu.

Ne pas utiliser si les solutions sont troubles car ceci peut indiquer une contamination microbienne.

Ne pas utiliser des flacons endommagés ou présentant une fuite.

Ne pas utiliser le kit au-delà de la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Il convient d'agir avec précaution lors de l'utilisation et de l'élimination de chaque conteneur et de son contenu.

Au terme du test, l'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations de votre laboratoire.

Recueil des spécimens

Les échantillons de sang doivent être prélevés de manière aseptique avec ajout d'anticoagulants, de préférence de l'EDTA. Si l'analyse des échantillons de sang est retardée, ceux-ci doivent être conservés entre 2-8°C, de préférence pendant une durée ne dépassant pas 72 heures.

Méthode de test

Les érythrocytes sensibilisés sont soigneusement lavés à l'aide de PBS (tampon phosphate salin) froid (2-8°C) afin d'éliminer toutes les protéines non liées et de minimiser la dissociation des anticorps liés aux cellules.

Les cellules lavées sont mélangées avec la Elution Solution 1 afin de dissocier les anticorps. Après centrifugation, l'éluat doit être neutralisé avec la Neutralisation Solution 2.

Procédure de test

Matériel nécessaire mais non fourni:

- Tubes requis : tubes en verre à fond arrondi ; dimensions 75 x 10/12 mm.
- PBS froid (2-8°C).

1. Centrifuger l'échantillon et éliminer le plus de surnageant possible.
2. Laver au moins 1 ml du culot d'érythrocytes sensibilisés 5 fois dans du PBS froid (2-8°C) afin d'éliminer tous les anticorps non liés. L'aliquote doit être suffisante pour récolter 1 ml de culot cellulaire une fois le lavage terminé. La dernière étape de centrifugation doit s'effectuer à une vitesse et pendant une durée générant un culot de cellules ; p.ex. 5 minutes à 3000 g ou conformément au protocole de votre laboratoire.
Réserver une partie de la solution du dernier lavage ; celle-ci servira de contrôle.
3. Utiliser un tube à essai en verre de 75 x 10/12 mm.
Pour des résultats optimaux, il faut effectuer la procédure SANS DÉLAI jusqu'à la neutralisation (étape 6), en maintenant la durée de travail à faible pH la plus brève possible. De plus, il est conseillé de travailler à côté de la centrifugeuse.
Ajouter 1 ml de culot érythrocytaire.
Ajouter 1 ml de Elution Solution 1 (capuchon blanc).

Remarque : si l'on dispose de moins d'1 ml de culot érythrocytaire, l'éluat peut être préparé en ajoutant un volume proportionnellement réduit de Elution Solution 1. Il faut utiliser un volume minimum de 500 µl de concentré érythrocytaire car un volume inférieur pourrait donner de faux résultats.

4. IMMÉDIATEMENT APRÈS AVOIR AJOUTÉ la Elution Solution 1, mélanger délicatement le tube en le retournant 5 fois. Centrifuger IMMÉDIATEMENT pendant 1 minute à 1000 g ou pendant une durée et à une vitesse permettant à la centrifugeuse de sédimenter les cellules et les débris cellulaires.
5. TRANSFÉRER DIRECTEMENT le surnageant à l'aide d'une pipette (en verre) propre dans un tube à essai en verre propre (le sédiment doit être jeté ; les cellules ne peuvent plus être utilisées).
6. L'éluat acide DOIT ÊTRE NEUTRALISÉ IMMÉDIATEMENT en ajoutant goutte à goutte la Neutralisation Solution 2 (capuchon noir) jusqu'à ce que la couleur bleue persiste après avoir ajouté et mélangé la goutte. L'apparition et la persistance de la couleur bleue indique que le pH de l'éluat a été ajusté à une valeur comprise dans l'intervalle souhaité (6,6-7,4). Le volume de Neutralisation Solution 2 requis peut varier en fonction de plusieurs éléments ; l'élément principal est le degré d'hémolyse des érythrocytes avant l'élution ou en raison d'une durée prolongée à faible pH au cours de l'élution. Si l'éluat acide est de couleur rouge ou brune à cause de l'hémolyse des érythrocytes, l'éluat deviendra trouble plutôt que bleu lors de l'ajout de la Neutralisation Solution 2.
7. Centrifuger pendant au moins 1 minute à > 1000 g afin d'éliminer les précipités ou débris cellulaires ou pendant une durée et à une vitesse permettant à la centrifugeuse de sédimenter tous les précipités et débris cellulaires. Transférer l'éluat à l'aide d'une pipette (en verre) propre dans un tube à essai en verre propre.

L'éluat est prêt à présent pour les analyses d'anticorps par technique d'agglutination indirecte avec du PEG. Les autres procédures d'analyses d'anticorps doivent être validées par l'utilisateur.

Utiliser le surnageant réservé du dernier lavage comme contrôle. Si l'analyse ne peut pas être effectuée immédiatement, l'éluat peut être conservé entre 2-8°C, de préférence jusqu'à 72 heures mais pas au-delà de 7 jours. Une turbidité peut indiquer une contamination microbienne.

Interprétation des résultats

Une réaction positive (p.ex. agglutination) de l'éluat indique que celui-ci contient des anticorps érythrocytaires (élués à partir des érythrocytes d'origine) dirigés contre les antigènes présents sur les érythrocytes du test.

Une réaction négative (p.ex. pas d'agglutination visible) de l'éluat indique que celui-ci ne contient pas d'anticorps dirigés contre les antigènes présents sur les érythrocytes du test.

Si l'on suspecte une anémie hémolytique induite par les médicaments, l'éluat doit être testé vis-à-vis de cellules sensibilisées avec le médicament adéquat.

Limites

Une réaction positive (p.ex. agglutination) de la solution de lavage réservée peut indiquer la présence d'anticorps résultant d'un lavage inadéquat, lesquels peuvent interférer avec l'activité des anticorps de l'éluat. Par conséquent, la procédure d'élution devra être répétée après un lavage plus soigneux des cellules avec du PBS froid (2-8°C). Toutefois, une réaction positive de la solution de lavage réservée peut également indiquer la présence d'anticorps de faible affinité élués à partir des cellules au cours de la procédure de lavage.

Si l'éluat affiche une réponse négative (p.ex. pas d'agglutination visible) alors que les données cliniques indiquent la présence d'anticorps fixés, il est fortement conseillé d'utiliser une autre méthode d'élution.

Les échantillons sanguins de plus de 72 heures peuvent engendrer des éluats moins puissants que ceux provenant d'échantillons frais.

Une incubation prolongée dans la Elution Solution 1 peut provoquer l'hémolyse des érythrocytes et la dénaturation des anticorps élués.

Des réactions faussement positives ou faussement négatives peuvent survenir en raison de la contamination du matériel du test ou d'une déviation quelconque par rapport à la procédure de test et par rapport aux autres techniques recommandées décrites dans le mode d'emploi.

L'intervention de la Elution Solution 1 et de la Neutralisation Solution 2 entraînera des réactions faibles ou faussement négatives.

Références

1. Engelfriet C.P. et al.; Immunohaematology, Sanquin Blood Supply Foundation, 2003.
2. Issitt P.D.; Applied Blood Group Serology, 4th ed. Montgomery Scientific Publications, 1998.
3. Mollison P.L. et al.; Blood Transfusion in Clinical Medicine, 9th ed. 1993.
4. Rekvig O.P., Hannestad K., Vox Sang. 33: 280-285, 1977.
5. Leger R.M. et al.; Transfusion 38:565-572, 1998.

Nous garantissons que les produits Sanquin produiront les résultats décrits dans le mode d'emploi du fabricant original. Il est essentiel de respecter rigoureusement les procédures et les schémas d'essai et d'utiliser les réactifs et le matériel recommandés. Sanquin n'acceptera aucune responsabilité relativement au non-respect de ces indications.