

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

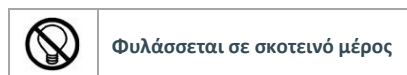
REF **K1398**

IVD **CE**

054_v02 01/2017 (el)

Μόνο για επαγγελματική χρήση

Κιτ για την έκλυση αντισωμάτων από ερυθρά αιμοσφαίρια



Γενικές πληροφορίες

Το PeliStrip elution kit χρησιμοποιείται για την ταχεία όξινη έκλυση αντισωμάτων από άθικτα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Παραδείγματα: χάρην, για την αναγνώριση αντισωμάτων σε ασθενείς με θετικό DAT (άμεση δοκιμασία αντισφαιρίνης), ή για την αναγνώριση αντισωμάτων τα οποία απομονώνονται από ορούς ή πλάσμα με επίχρησή τους *in vitro* επί επιλεγμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Το έκλουσμα μπορεί να εξεταστεί ως ορός ή πλάσμα για την ανίχνευση και την αναγνώριση των αντισωμάτων.

Μέρη του κιτ

Elution Solution 1: δύο φιαλίδια (λευκό πώμα) των 8 ml. Αποθήκευση στους 18-25°C.

Neutralisation Solution 2: ένα φιαλίδιο (μαύρο πώμα) των 12 ml. Το Tris-ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης περιέχει BSA και είναι χρωματισμένο μπλε για ένδειξη του pH και εύκολη ταυτοποίηση. Αποθήκευση στους 18-25°C σε σκοτεινό μέρος.

Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση μόνο.

Το κιτ πρέπει να αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 18-25°C. Το Neutralisation Solution 2 πρέπει να αποθηκεύεται σε σκοτεινό μέρος. Η μακροχρόνια αποθήκευση σε φως μπορεί να οδηγήσει σε αποχρωματισμό του Neutralisation Solution 2. Αν το χρώμα του Neutralisation Solution 2 δεν είναι μπλε, το διάλυμα δεν πρέπει να χρησιμοποιείται.

Το Neutralisation Solution 2 περιέχει 0,1% NaN₃ (κ.ό.) ως συντηρητικό. Μην καταψύχετε.

Παρότι η αλβουμίνη ορού βοοειδών έχει ελεγχθεί για λοιμώδεις νόσους και βρέθηκε αρνητική, το αντιδραστήριο δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι απαλλαγμένο από μολυσματικούς παράγοντες. Εφιστάται η προσοχή κατά τη χρήση και την απόρριψη κάθε περιέκτη και του περιεχομένου του.

Μην χρησιμοποιείτε τα διαλύματα εάν είναι θολά, αυτό μπορεί να υποδηλώνει μικροβιακή μόλυνση.

Φιαλίδια που παρουσιάζουν διαρροή ή είναι κατεστραμμένα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

Το κιτ δεν πρέπει να χρησιμοποιείται μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Εφιστάται η προσοχή κατά τη χρήση και την απόρριψη κάθε περιέκτη και του περιεχομένου του.

Τα απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται μετά την ολοκλήρωση της δοκιμής σύμφωνα με τους κανονισμούς του εργαστηρίου.

Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα αίματος πρέπει να λαμβάνονται άσηπτα με την προσθήκη αντιπηκτικών, κατά προτίμηση EDTA. Εάν η εξέταση των δειγμάτων αίματος καθυστερήσει, τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C, κατά προτίμηση όχι περισσότερο από 72 ώρες.

Μέθοδος δοκιμής

Τα ευαισθητοποιημένα ερυθρά αιμοσφαίρια εκπλένονται σχολαστικά με κρύο (2-8°C) PBS (αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών), για να απομακρυνθούν όλες οι μη δεσμευμένες πρωτεΐνες και για να ελαχιστοποιηθεί ο διαχωρισμός των συνδεδεμένων με κύτταρα αντισωμάτων.

Τα εκπλυμένα κύτταρα αναμεινώνονται με Elution Solution 1 για να διαχωριστούν τα αντισώματα. Μετά τη φυγοκέντρωση, το έκλουσμα πρέπει να εξουδετερώνεται με Neutralisation Solution 2.

Διαδικασία δοκιμής

Απαιτούμενα αλλά μη παρεχόμενα υλικά:

- Απαιτήσεις για τους σωλήνες: γυάλινοι σωλήνες με στρογγυλό πυθμένα, διαστάσεις 75 x 10/12 mm.
- Κρύο (2-8°C) PBS.

1. Φυγοκεντρίστε το δείγμα και απομακρύνετε όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο υγρό.
2. Εκπλύνετε τουλάχιστον 1 ml συμπυκνωμένα ευαισθητοποιημένα ερυθρά αιμοσφαίρια 5 φορές σε κρύο (2-8°C) PBS για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένων αντισωμάτων. Η ποσότητα θα πρέπει να επαρκεί για την απόδοση 1 ml συμπυκνωμένων κυττάρων όταν ολοκληρωθεί η έκλυση. Το τελευταίο βήμα της φυγοκέντρωσης πρέπει να γίνεται σε ταχύτητα και χρόνο που δίνει συμπυκνωμένα κύτταρα, π.χ. 5 λεπτά σε 3000 g ή σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου σας.
Φυλάξτε ένα μέρος του τελευταίου διαλύματος έκλυσης για χρήση ως μάρτυρα.
3. Χρησιμοποιήστε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα 75 x 10/12 mm.
Για βέλτιστα αποτελέσματα, είναι απαραίτητο να εργαστείτε ΧΩΡΙΣ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ μέχρι την εξουδετέρωση (βήμα 6), κρατώντας τη διάρκεια της εργασίας σε χαμηλό pH όσο το δυνατόν συντομότερη. Επιπλέον, συνιστάται η εργασία πλησιέστερα στη φυγοκέντρωση.
Προσθέστε 1 ml συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.
Προσθέστε 1 ml Elution Solution 1 (λευκό πώμα).
Σημείωση: εάν διατίθεται λιγότερο από 1 ml συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια, το έκλουσμα μπορεί να ετοιμαστεί με την προσθήκη εξίσου μειωμένου όγκου Elution Solution 1. Πρέπει να χρησιμοποιηθούν τουλάχιστον 500 μl συμπυκνωμένα ερυθρά κύτταρα, ένας χαμηλότερος όγκος μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αποτελέσματα.

4. ΑΜΕΣΩΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ Elution Solution 1 αναμείξτε ελαφρώς το περιεχόμενο του σωλήνα αναστρέφοντας 5 φορές. ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΤΕ ΑΜΕΣΩΣ για 1 λεπτό σε 1000 g ή για όσο χρόνο και ταχύτητα χρειάζεται για την καθίζηση των κυττάρων και των κυτταρικών καταλοίπων.
5. ΜΕΤΑΦΕΡΕΤΕ ΑΜΕΣΩΣ το υπερκείμενο υγρό με ένα καθαρό (γυάλινο) σιφώνιο σε ένα καθαρό γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα (το ίζημα πρέπει να απορρίπτεται, τα κύτταρα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν πια).
6. Το όξινο έκλουσμα ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΝΕΤΑΙ ΑΜΕΣΩΣ με προσθήκη Neutralisation Solution 2 (μαύρο πώμα) στάγδην μέχρι το μπλε χρώμα να παραμείνει μετά την προσθήκη και την ανάμειξη των σταγόνων. Η όψη και η διατήρηση του μπλε χρώματος σημαίνει ότι το pH του εκλούσματος έχει ρυθμιστεί στο επιθυμητό εύρος (6,6-7,4). Ο απαιτούμενος όγκος Neutralisation Solution 2 μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις διάφορες πτυχές. Η βασική πτυχή είναι ο βαθμός αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων πριν από την έκλουση ή ο παρατεταμένος χρόνος σε χαμηλό pH κατά τη διάρκεια της έκλουσης. Αν το όξινο έκλουσμα είναι χρωματισμένο κόκκινο ή καφέ λόγω αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, το έκλουσμα θα θολώσει αντί να χρωματιστεί μπλε με την προσθήκη Neutralisation Solution 2.
7. Φυγοκεντρίστε τουλάχιστον 1 λεπτό σε >1000 g για την απομάκρυνση τυχόν ιζήματος ή κυτταρικών καταλοίπων ή για όσο χρόνο και ταχύτητα χρειάζεται για την καθίζηση τυχόν ιζήματος και κυτταρικών καταλοίπων.
Μεταφέρετε το έκλουσμα με ένα καθαρό (γυάλινο) σιφώνιο σε ένα καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα.

Το έκλουσμα είναι τώρα έτοιμο για έλεγχο αντισωμάτων υπό τεχνική έμμεσης συγκόλλησης με PEG. Εναλλακτικές διαδικασίες για τον έλεγχο αντισωμάτων πρέπει να επικυρώνονται από τον χρήστη.

Χρησιμοποιήστε το φυλαγμένο υπερκείμενο υγρό της τελευταίας έκπλυσης ως μάρτυρα. Εάν η δοκιμή δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί αμέσως, το έκλουσμα μπορεί να αποθηκευτεί στους 2-8°C κατά προτίμηση για 72 ώρες το πολύ, αλλά όχι για περισσότερο από 7 ημέρες. Η θολερότητα μπορεί να υποδεικνύει μικροβιακή μόλυνση.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Μια θετική αντίδραση (συγκόλληση) του εκλούσματος υποδηλώνει ότι το έκλουσμα περιέχει αντισώματα ερυθρών αιμοσφαιρίων (εκλουζόμενων από τα αρχικά ερυθρά αιμοσφαίρια) έναντι των αντιγόνων που είναι παρόντα στα υπό δοκιμή ερυθρά αιμοσφαίρια.

Μια αρνητική αντίδραση (μη ορατή συγκόλληση) του εκλούσματος υποδηλώνει ότι το έκλουσμα δεν περιέχει αντισώματα έναντι των αντιγόνων που είναι παρόντα στα υπό δοκιμή ερυθρά αιμοσφαίρια.

Εάν υπάρχει υποψία για φαρμακευτική αιμολυτική αναιμία, το έκλουσμα πρέπει να ελέγχεται έναντι κυττάρων ευαισθητοποιημένων με το κατάλληλο φάρμακο.

Περιορισμοί

Μια θετική αντίδραση (συγκόλληση) του φυλαγμένου διαλύματος έκπλυσης μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία αντισωμάτων λόγω ανεπαρκούς έκπλυσης, κάτι που μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των αντισωμάτων του εκλούσματος. Ως εκ τούτου, η διαδικασία έκλουσης πρέπει να επαναλαμβάνεται μετά από σχολαστικότερη έκπλυση των κυττάρων με κρύο (2-8°C) PBS. Ωστόσο, μια θετική αντίδραση του φυλαγμένου διαλύματος έκπλυσης θα μπορούσε επίσης να υποδηλώνει την παρουσία αντισωμάτων χαμηλής συγγένειας τα οποία εκλούνται από τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πλύσης.

Σε περίπτωση που το έκλουσμα δείχνει μια αρνητική αντίδραση (μη ορατή συγκόλληση) ενώ τα κλινικά δεδομένα υποδεικνύουν την παρουσία επιχρισμένων αντισωμάτων, συνιστάται θερμά η χρήση εναλλακτικής μεθόδου έκλουσης.

Δείγματα αίματος παλαιότερα των 72 ωρών μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα λιγότερο ισχυρά εκλούσματα σε σύγκριση με τα εκλούσματα από πρόσφατα δείγματα.

Η μακροχρόνια επώαση σε Elution Solution 1 μπορεί να προκαλέσει αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και μετουσίωση των εκλουζόμενων αντισωμάτων.

Ψευδώς θετικές ή ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις είναι πιθανό να συμβούν μέσω μόλυνσης των υλικών δοκιμής ή παρέκκλισης από τη διαδικασία δοκιμής και άλλες συνιστώμενες τεχνικές που περιγράφονται στις Οδηγίες Χρήσης.

Η ανταλλαγή Elution Solution 1 και Neutralisation Solution 2 θα οδηγήσει σε ασθeneίες ή ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις.

Παραπομπές

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.

Τα προϊόντα Sanquin είναι εγγυημένα να αποδίδουν όπως περιγράφεται στις αρχικές οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή. Η αυστηρή συμμόρφωση με τις διαδικασίες, τις διατάξεις δοκιμών και τα συνιστώμενα αντιδραστήρια και εξοπλισμό είναι ουσιώδης. Η Sanquin αποποιείται κάθε ευθύνη που οφείλεται σε τυχόν παρέκκλιση από τα παραπάνω.