

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 (it)

Solo per uso professionale

Kit per l'eluizione degli anticorpi dai globuli rossi



Conservare al buio

Informazioni generali

Il PeliStrip elution kit è utilizzato per l'eluizione acida rapida di anticorpi da globuli rossi intatti.

Per esempio, per identificare gli anticorpi in pazienti con DAT (test dell'antiglobulina diretto) positivo oppure per identificare gli anticorpi isolati dal siero o dal plasma rivestendoli *in vitro* su globuli rossi selezionati.

L'eluato può essere analizzato come un siero o un plasma per rilevare e identificare gli anticorpi.

Componenti del kit

Elution Solution 1: due fiale (tappo bianco) da 8 ml. Conservare a 18-25°C.

Neutralisation Solution 2: una fiala (tappo nero) da 12 ml. Questo tampone di neutralizzazione tripla contiene BSA ed ha colore blu per indicare il pH e facilitare il riconoscimento. Conservare al buio a 18-25°C.

Precauzioni

Da utilizzare solo per diagnostica *in vitro*.

Il kit deve essere conservato a 18-25°C. La Neutralisation Solution 2 deve essere conservata al buio. Una conservazione prolungata alla luce può comportare lo scolorimento della Neutralisation Solution 2. Se il colore della Neutralisation Solution 2 non è blu, la soluzione non deve essere utilizzata.

La Neutralisation Solution 2 contiene 0,1% di NaN₃ (w/v) come conservante. Non congelare.

Sebbene l'albumina di siero bovino analizzata per individuare malattie infettive risulti negativa, il reagente non si può ritenere privo di agenti infettanti. Prestare attenzione all'utilizzo e allo smaltimento di ciascun contenitore e del suo contenuto.

Non utilizzare se le soluzioni sono torbide in quanto potrebbero presentare contaminazione microbica.

Fiale che presentano perdite o risultano danneggiate non devono essere usate.

Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza, stampata sull'etichetta.

Prestare attenzione all'uso e allo smaltimento di ciascun contenitore e del suo contenuto.

Lo smaltimento dei rifiuti, al termine del test, deve essere eseguito in conformità alle norme di laboratorio.

Raccolta del campione

I campioni ematici devono essere prelevati in modo asettico con l'aggiunta di anticoagulanti, preferibilmente EDTA. Se l'analisi dei campioni ematici viene ritardata, i campioni devono essere conservati a 2-8°C, preferibilmente per non oltre 72 ore.

Metodo del test

I globuli rossi sensibilizzati vengono accuratamente lavati con PBS (soluzione salina tamponata con fosfato) fredda (2-8°C), per rimuovere tutte le proteine libere e per minimizzare la dissociazione degli anticorpi legati alle cellule.

Le cellule lavate vengono miscelate con la Elution Solution 1 per dissociare gli anticorpi. Dopo la centrifugazione l'eluato deve essere neutralizzato con la Neutralisation Solution 2.

Procedura del test

Materiali richiesti ma non forniti:

- *Requisiti delle provette: provette in vetro a fondo tondo; dimensioni 75 x 10/12 mm.*
- *PBS fredda (2-8°C).*

1. Centrifugare il campione e rimuovere quanto surnatante possibile.
2. Lavare almeno 1 ml di globuli rossi sensibilizzati impacchettati in PBS fredda (2-8°C) per rimuovere eventuali anticorpi liberi. L'aliquota deve essere sufficiente a generare 1 ml di cellule impacchettate al termine del lavaggio. L'ultima fase di centrifuga deve essere eseguita a una velocità e per un periodo idoneo per generare cellule impacchettate, per esempio 5 minuti a 3000 g o in conformità al protocollo del laboratorio.
Conservare parte dell'ultima soluzione di lavaggio da utilizzare come controllo.
3. Utilizzare una provetta di vetro di 75 x 12 mm.
Per ottenere risultati ottimali è necessario procedere **SENZA RITARDI** fino alla neutralizzazione (punto 6), tenere il tempo di lavorazione a pH basso il più breve possibile. Inoltre, si consiglia di lavorare accanto alla centrifuga.
Aggiungere 1 ml di globuli rossi impacchettati.
Aggiungere 1 ml di Elution Solution 1 (tappo bianco).
Nota: se la quantità di globuli rossi impacchettati disponibile è inferiore a 1 ml, l'eluato può essere preparato aggiungendo una corrispondente quantità ridotta della Elution Solution 1. Deve essere usato un minimo di 500 µl di globuli rossi impacchettati, una quantità inferiore potrebbe comportare falsi risultati.

4. SUBITO DOPO AVER AGGIUNTO l'Elution Solution 1, miscelare delicatamente la provetta capovolgendola 5 volte. CENTRIFUGARE IMMEDIATAMENTE per 1 minuto a 1000 g oppure per un tempo e velocità adeguati perché la centrifuga generi pellet di cellule e residui di cellule.
5. TRASFERIRE DIRETTAMENTE il surnatante utilizzando una pipetta (vetro) pulita in una provetta di vetro pulita (il pellet deve essere scartato, le cellule non possono essere più utilizzate).
6. L'eluato acido DEVE ESSERE NEUTRALIZZATO IMMEDIATAMENTE aggiungendo la Neutralisation Solution 2 (tappo nero) a gocce finché il colore blu permane dopo aver aggiunto e miscelato la soluzione. L'aspetto e la persistenza del colore blu indicano il che pH dell'eluato è stato aggiustato alla gamma desiderata (6,6-7,4). La quantità della Neutralisation Solution 2 richiesta può variare in base a vari fattori; il fattore principale è il grado di emolisi dei globuli rossi prima dell'eluazione o dovuto al tempo prolungato a pH basso durante l'eluazione. Se l'eluato acido è di colore rosso o marrone a causa dell'emolisi dei globuli rossi, con l'aggiunta della Neutralisation Solution 2 l'eluato diventa torbido anziché blu.
7. Centrifugare almeno 1 minuto a > 1000 g per rimuovere eventuale precipitato o residui di cellule oppure per un tempo e velocità appropriati perché la centrifuga crei pellet di eventuale precipitato e residui di cellule. Trasferire l'eluato utilizzando una pipetta (vetro) pulita in una provetta di vetro pulita.

L'eluato è ora pronto per il test degli anticorpi con la tecnica di agglutinazione indiretta con PEG. Procedure alternative per il test degli anticorpi devono essere convalidate dall'utilizzatore.

Utilizzare il surnatante rimasto dall'ultimo lavaggio come controllo. Se il test non può essere effettuato immediatamente, l'eluato può essere conservato a 2-8°C preferibilmente fino a 72 ore, ma per non più di 7 giorni. La torbidità può indicare contaminazione microbica.

Interpretazione dei risultati

Una reazione positiva dell'eluato (per esempio l'agglutinazione) indica la presenza nell'eluato di anticorpi dei globuli rossi (eluiti dai globuli rossi originari) per gli antigeni presenti nei globuli rossi del test.

Una reazione negativa dell'eluato (per esempio, nessuna agglutinazione visibile) indica che l'eluato non contiene anticorpi per gli antigeni presenti nei globuli rossi del test.

Se si sospetta un'anemia emolitica indotta da farmaci, l'eluato deve essere sottoposto a test per le cellule sensibilizzate con il farmaco appropriato.

Limitazioni

Una reazione positiva (per esempio l'agglutinazione) della soluzione di lavaggio conservata può indicare la presenza di anticorpi dovuti a lavaggio inadeguato, che possono interferire con l'attività degli anticorpi dell'eluato. Pertanto, la procedura di eluazione deve essere ripetuta dopo un lavaggio più accurato delle cellule con PBS fredda (2-8°C). Tuttavia, una reazione positiva della soluzione di lavaggio conservata può anche indicare la presenza di anticorpi a bassa affinità eluiti dalle cellule durante la procedura di lavaggio.

In caso di reazione negativa dell'eluato (per esempio, nessuna agglutinazione visibile) mentre i dati clinici indicano la presenza di anticorpi rivestiti, si consiglia vivamente l'uso di un metodo di eluazione alternativo.

I campioni ematici di oltre 72 ore possono generare eluati meno potenti di quelli dei campioni freschi.

L'incubazione prolungata nella Elution Solution 1 può causare emolisi dei globuli rossi e denaturazione degli anticorpi eluiti.

Reazioni di falso positivo o falso negativo possono verificarsi per la contaminazione dei materiali del test o qualsiasi scostamento dalla procedura del test e altre tecniche prescritte nelle Istruzioni per l'uso.

Lo scambio della Elution Solution 1 con la Neutralisation Solution 2 comporterà reazioni deboli o falso negative.

Referenze

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.

Si garantisce che i prodotti Sanquin daranno i risultati indicati nelle istruzioni d'uso del fabbricante originario. È essenziale attenersi rigorosamente a queste indicazioni circa le procedure e layout di prova e utilizzare i reagenti e le apparecchiature raccomandate. Sanquin declina ogni responsabilità per eventuali conseguenze derivanti dalla mancata osservanza di queste norme.