

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 (sr)

Samo za profesionalnu
upotrebu

Pribor za eluciju antitela iz eritrocita



Skladištiti na
tamnom mestu

Opšte informacije

PeliStrip elution kit se koristi za brzu eluciju antitela iz očuvanih eritrocita u kiseloj sredini.

Na primer, za identifikaciju antitela kod pacijenata sa pozitivnim DAT (direktnim antiglobulinskim testom), ili za identifikaciju antitela koja su izolovana iz seruma ili plazme njihovim oblaganjem *in vitro* na izabranim eritrocitima.

Eluat se može testirati kao serum ili plazma radi detekcije i identifikacije antitela.

Delovi pribora

Elution Solution 1: dve bočice (beli poklopac) zapremine 8 ml. Skladištiti na temperaturi od 18-25°C.

Neutralisation Solution 2: jedna bočica (crni poklopac) zapremine 12 ml. Ovaj Tris-neutralizacioni pufer sadrži BSA i obojen je plavo radi označavanja pH vrednosti i jednostavnog prepoznavanja. Skladištiti na temperaturi od 18-25°C na tamnom mestu.

Mere predostrožnosti

Samo za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.

Pribor treba skladištiti na temperaturi od 18-25°C. Neutralisation Solution 2 treba skladištiti na tamnom mestu. Produženo skladištenje na svetlosti može dovesti do obezbojenja rastvora Neutralisation Solution 2. Ako boja rastvora Neutralisation Solution 2 nije plava, rastvor ne treba koristiti.

Neutralisation Solution 2 sadrži 0,1% NaN₃ (w/v) kao konzervans. Ne zamrzavati.

Iako je goveđi serum albumin testiran na zarazne bolesti i dao negativan rezultat, ne može se smatrati da reagens ne sadrži zarazne agense. Treba obratiti pažnju prilikom upotrebe i odlaganja svake posude i njenog sadržaja.

Nemojte da koristite ako su rastvori mutni, to može biti znak mikrobiološke kontaminacije.

Bočice koje cure ili su oštećene ne smeju se koristiti.

Pribor ne treba koristiti nakon isteka datuma roka trajanja, koji je odštampan na etiketi.

Treba obratiti pažnju prilikom upotrebe i odlaganja svake posude i njihovih sadržaja.

Odlaganje u otpad, nakon završetka testa, treba obavljati u skladu sa propisima vaše laboratorije.

Uzimanje uzoraka

Uzorke krvi treba prikupiti aseptičnom metodom uz dodatak antikoagulansa, po mogućstvu EDTA. Ako se testiranje uzoraka krvi odloži, uzorci se moraju skladištiti na temperaturi od 2-8°C, po mogućstvu ne duže od 72 časa.

Metod testiranja

Senzibilisani eritrociti se temeljno ispiraju pod hladnim (2-8°C) PBS-om (fiziološki rastvor puferovan fosfatom) radi ispiranja svih nevezanih proteina i smanjenja odvajanja antitela povezanih sa ćelijama.

Ispirane ćelije se mešaju sa Elution Solution 1 radi odvajanja antitela. Nakon centrifugiranja, eluat treba neutralizovati uz pomoć rastvora Neutralisation Solution 2.

Procedura testiranja

Nephodni materijali koji nisu priloženi:

- *Potrebne epruvete: staklene epruvete sa zaobljenom dnom; veličina 75 x 10/12 mm.*
- *Hladan (2-8°C) PBS.*

1. Centrifugirajte uzorak i uklonite supernatant što je više moguće.
2. Ispirajte najmanje 1 ml pakovanih senzibilisanih eritrocita 5 puta u hladnom (2-8°C) PBS-u radi uklanjanja svih nevezanih antitela. Ostatak treba da bude dovoljan za dobijanje 1 ml pakovanih ćelija nakon završetka ispiranja. Poslednji korak centrifugiranja treba da bude pri brzini i u vremenskom periodu koji dovode do stvaranja pakovanih ćelija, npr. 5 minuta na 3000 g ili u skladu sa laboratorijskim protokolom. Sačuvajte deo rastvora sa poslednjeg ispiranja koji će služiti kao kontrola.
3. Upotrebite staklene epruvete za testiranje zapremine 75 x 10/12 mm. Za optimalne rezultate, neophodno je raditi BEZ ODLAGANJA do neutralizacije (korak 6), održavajući vreme rada pri niskoj pH vrednosti što je kraće moguće. Pored toga, savetuje se da se radi pored centrifuge. Dodajte 1 ml pakovanih eritrocita. Dodajte 1 ml rastvora Elution Solution 1 (beli poklopac). Napomena: ako ima manje od 1 ml pakovanih eritrocita, eluat se može pripremiti dodavanjem jednako smanjene zapremine rastvora Elution Solution 1. Treba koristiti najmanje 500 µL pakovanih eritrocita, jer manja zapremina može dovesti do lažnih rezultata.

4. ODMAH NAKON DODAVANJA RASTVORA Elution Solution 1 blago mešajte epruvetu obrtanjem 5 puta. ODMAH CENTRIFUGIRAJTE tokom 1 minuta na 1000 g ili u skladu sa vremenom i brzinom dovoljnim za taloženje ćelija i ćelijskih ostataka u centrifugi.
5. DIREKTNO PRENESITE supernatant koristeći čistu (staklenu) pipetu u čistu staklenu epruvetu za testiranje (nataložene delove treba odložiti, ćelije se više ne mogu koristiti).
6. Kiseli eluat se MORA ODMAH NEUTRALIZOVATI dodavanjem rastora Neutralisation Solution 2 (crni poklopac) kap po kap dok plava boja ne ostane nakon dodavanja i mešanja kapljice. Izgled i istrajnost plave boje označava da je pH vrednost eluata dovedena do željenog opsega (6,6-7,4). Potrebna zapremina rastvora Neutralisation Solution 2 može se razlikovati u zavisnosti od nekoliko aspekata; glavni aspekt je stepen hemolize eritrocita pre elucije usled produženog perioda na niskoj pH vrednosti tokom elucije. Ako se kiseli eluat oboji crveno ili braon usled hemolize eritrocita, eluat će postati mutan umesto plave boje nakon dodavanja rastvora Neutralisation Solution 2.
7. Centrifugirajte tokom najmanje 1 minuta na > 1000 g da biste uklonili precipitat ili ostatke ćelija ili u skladu sa vremenom i brzinom dovoljnim za stvaranje taloga od delova i ćelijskih ostataka. Prenesite eluat koristeći čistu (staklenu) pipetu u čistu staklenu epruvetu za testiranje.

Eluat je sada spreman za testiranje antitela tehnikom indirektno aglutinacije sa PEG-om. Alternativne procedure za testiranje antitela treba da testira korisnik.

Koristite sačuvani supernatant sa poslednjeg ispiranja kao kontrolu. Ako se testiranje ne može obaviti odmah, eluat se može skladištiti na temperaturi od 2-8°C, po mogućstvu do 72 časa, ali ne duže od 7 dana. Zamućenje može naznačiti mikrobiološku kontaminaciju.

Tumačenje rezultata

Pozitivna reakcija (npr. aglutinacija) eluata označava da eluat sadrži antitela iz eritrocita (eluirana iz originalnih eritrocita) za antigene prisutne u testiranim eritrocitima.

Negativna reakcija (npr. nema vidljive aglutinacije) kod eluata označava da eluat ne sadrži antitela za antigene prisutne u testiranim eritrocitima.

Ako se sumnja na hemolitičku anemiju izazvanu lekovima, eluat treba testirati na ćelije senzibilisane sa odgovarajućim lekom.

Ograničenja

Pozitivna reakcija (npr. aglutinacija) na sačuvanom rastvoru sa ispiranja može naznačiti prisustvo antitela usled neodgovarajućeg ispiranja, što može poremetiti aktivnost antitea u eluatu. Stoga, proceduru elucije treba ponoviti nakon temeljnijeg ispiranja ćelija hladnim (2-8°C) PBS-om. Međutim, pozitivna reakcija na rastvoru sačuvanom sa ispiranja takođe može naznačiti prisustvo antitela niskog afiniteta eluiranih iz ćelija tokom procedure ispiranja.

U slučaju da eluat prikaže negativnu reakciju (npr. nema vidljive aglutinacije) dok klinički podaci naznačavaju prisustvo obloženih antitela, upotreba alternativnog metoda elucije se preporučuje.

Uzorci krvi stariji od 72 časa mogu rezultovati manje potentnim eluatima od onih iz svežih uzoraka.

Produžena inkubacija u rastvoru Elution Solution 1 može izazvati hemolizu eritrocita i denaturaciju eluiranih antitela.

Lažne pozitivne ili lažne negativne reakcije mogu se dogoditi zbog kontaminacije materijala za testiranje ili zbog odstupanja od procedure testiranja i drugih preporučenih tehnika opisanih u uputstvima za upotrebu.

Zamena rastvora Elution Solution 1 i Neutralisation Solution 2 dovešće do slabih ili lažnih negativnih reakcija.

Reference

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.

Sanquin proizvodi imaju garantovane performanse kao što je opisano u uputstvima za upotrebu originalnog proizvođača. Strogo pridržavanje ovih procedura, izgleda testa i preporučenih reagensa i opreme je od suštinskog značaja. Sanquin odriče svaku odgovornost koja dolazi iz odstupanja od ovoga.