

# 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 (sk)

*Len na profesionálne použitie*

Súprava na eluovanie protilátok z červených krviniek



**Uchovávajú v tme**

## Všeobecné informácie

PeliStrip elution kit sa používa na rýchlu kyslú elúciu protilátok z neporušených červených krviniek.

Napríklad na identifikovanie protilátok u pacientov s pozitívnym DAT (priamy antiglobulínový test) alebo na identifikáciu protilátok, ktoré sa izolujú zo séra alebo z plazmy, prostredníctvom ich *in vitro* nanosenia na vybrané červené krvinky.

Na detekciu a identifikáciu protilátok sa eluát môže testovať vo forme séra alebo plazmy.

## Časti súpravy

**Elution Solution 1: dve nádobky (biely vrchnák) po 8 ml.** Uchovávajú pri 18-25 °C.

**Neutralisation Solution 2: jedna nádobka (čierny vrchnák) s 12 ml.** Tento Tris-neutralizačný tlmivý roztok obsahuje BSA a má modrú farbu na indikáciu pH a aby sa dal jednoducho rozoznať. Uchovávajú pri 18-25 °C v tme.

## Bezpečnostné opatrenia

Používajte len na *in vitro* diagnostiku.

Súpravu uchovávajú pri 18-25 °C. Neutralisation Solution 2 uchovávajú v tme. Dlhšie skladovanie na svetle môže spôsobiť odfarbenie Neutralisation Solution 2. Nepoužívajte Neutralisation Solution 2, ak tento roztok nemá modrú farbu.

Neutralisation Solution 2 obsahuje 0,1% NaN<sub>3</sub> (hmot./obj.) ako konzervačnú látku. Nezmrazujte.

Hoci bol hovädzí sérový albumín testovaný na infekčné choroby, a to s negatívnym výsledkom, toto činidlo sa nedá považovať za roztok bez infekčných agensov. Každá nádobka a jej obsah sa musia používať a likvidovať opatrne.

Ak je roztok zakalený, nepoužívajte ho, pretože to môže byť dôsledok mikrobiálnej kontaminácie.

Tečúce alebo poškodené nádobky sa nesmú používať.

Túto súpravu nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie, ktorý je vytlačený na štítku.

Každá nádobka a jej obsah sa musia používať a likvidovať opatrne.

Po ukončení testu odpad likvidujte v súlade so smernicami vášho laboratória.

## Odoberanie vzoriek

Vzorky krvi odoberajte sterilným spôsobom, s pridaním antikoagulačných látok, najlepšie EDTA. Ak sa krv testuje neskôr, vzorky sa musia uchovávať pri 2-8 °C, pričom by sa mali testovať do 72 hodín.

## Spôsob testovania

Senzibilizované červené krvinky dôkladne premyte so studeným (2-8 °C) PBS (fosfátom tlmený fyziologický roztok), aby sa odmyli všetky nenaviazané proteíny a aby sa minimalizovala disociácia protilátok naviazaných na bunky.

Premyté bunky zmiešajte s Elution Solution 1, aby sa disociovali protilátky. Po centrifugácii sa eluát musí neutralizovať s Neutralisation Solution 2.

## Postup pri testovaní

Materiály, ktoré sú potrebné, ale nie sú dodávané:

- potrebné skúmavky: sklenené skúmavky s okrúhlym dnom – veľkosť 75 x 10/12 mm;
- chladené (2-8 °C) PBS.

1. Scentrifugujte vzorku a odstráňte čo najviac supernatantu.
2. Premyte najmenej 1 ml nabalených senzibilizovaných krviniek 5-krát vo vychladenom (2-8 °C) PBS, aby sa odstránila akákoľvek nenaviazaná protilátka. Táto alikvotná časť postačuje na získanie 1 ml nabalených buniek po ukončení premývania. Rýchlosť a trvanie posledného centrifugačného kroku musia byť nastavené tak, aby poskytovali nabalené bunky, napr. 5 minút pri 3000 g, alebo podľa vášho laboratórneho protokolu.  
Časť posledného premývacieho roztoku si odložte ako kontrolu.
3. Použite sklenenú skúmavku s veľkosťou 75 x 10/12 mm.  
Na dosiahnutie optimálnych výsledkov je nevyhnutné, aby ste až po neutralizáciu (krok 6) pracovali BEZ PRERUŠENIA, aby ste čo najkratšie pracovali pri nízkom pH. Okrem toho odporúčame, aby ste pracovali vedľa centrifúgy.  
Pridajte 1 ml nabalených červených krviniek.  
Pridajte 1 ml Elution Solution 1 (biely vrchnák).  
Poznámka: ak máte k dispozícii menej ako 1 ml nabalených červených krviniek, eluát sa môže pripraviť pridaním úmerne zníženého objemu Elution Solution 1. Použite minimálne 500 µl nabalených buniek, pretože menší objem môže viesť k nesprávnym výsledkom.

- OKAMŽITE PO PRIDANÍ Elution Solution 1 skúmavku jemne premiešajte tak, že ju 5-krát prevráťte. Okamžite ju scentrifugujte, 1 minútu pri 1000 g, alebo použite čas a rýchlosť vhodné pre danú centrifúgu, aby sa vytvoril pelet z buniek a zvyškov buniek.
- PRIAMO PRENESTE supernatant s použitím čistej (sklenenej) pipety do čistej sklenenej skúmavky (pelet zlikvidujte, bunky sa už nedajú znova použiť).
- Kyslý eluát MUSÍTE OKAMŽITE ZNEUTRALIZOVAŤ tak, že budete po kvapkách pridávať Neutralisation Solution 2 (čierny vrchnák), pokým pretrváva modrá farba. Pričom po každej kvapke roztok premiešajte. Objavenie a pretrvávanie modrej farby indikuje, že pH eluátu je nastavené na požadovaný rozsah (6,6-7,4). Potrebný objem Neutralisation Solution 2 sa môže meniť v závislosti od niekoľkých aspektov, pričom hlavným aspektom je stupeň hemolýzy červených krviniek pred eluovaním alebo predĺženie času pri nízkom pH počas eluovania. Ak je kyslý eluát sfarbený v dôsledku hemolýzy červených krviniek načerveno alebo nahnedo, pridaním Neutralisation Solution 2 sa zakalí namiesto toho, aby zmenil farbu na modrú.
- Centrifugujte ho najmenej 1 minútu pri > 1000 g, aby sa odstránil akýkoľvek precipitát alebo zvyšky buniek, alebo použite čas a rýchlosť, ktoré sú vhodné pre vašu centrifúgu na to, aby sa peletoval akýkoľvek precipitát a zvyšky buniek. Eluát preneste s použitím čistej (sklenenej) pipety do čistej sklenenej skúmavky.

Eluát je tak pripravený na protilátkový test prostredníctvom nepriamej aglutinačnej metódy s PEG. Používateľ môže použiť aj alternatívne overené metódy na testovanie protilátok.

Ako kontrolu použite supernatant odložený pri poslednom premývaní. Ak nemôžete test realizovať okamžite, eluát sa môže uchovávať pri 2-8°C, ideálne do 72 hodín, ale nie dlhšie ako 7 dní. Zakalenie môže indikovať mikrobiálnu kontamináciu.

#### Interpretácia výsledkov

Positívna reakcia (napr. aglutinácia) eluátu indikuje, že eluát obsahuje krvinkové protilátky (eluované z pôvodných červených krviniek) proti antigénom prezentovaným na testovaných červených krvinkách.

Negatívna reakcia (napr. žiadna viditeľná aglutinácia) eluátu indikuje, že eluát neobsahuje protilátky proti antigénom prítomným na testovaných červených krvinkách.

Ak je podozrenie na liekom indukovanú hemolytickú anémiu, otestujte eluát na bunkách senzibilizovaných s príslušným liekom.

#### Obmedzenia

Positívna reakcia (napr. aglutinácia) odloženého premývacieho roztoku môže indikovať prítomnosť protilátok v dôsledku neadekvátneho premývania, čo môže ovplyvniť protilátkovú aktivitu v eluáte. Preto by sa eluovanie malo zopakovať po ďalšom dôkladnom premytí buniek s vychladeným (2-8°C) PBS. Positívna reakcia odloženého premývacieho roztoku však môže indikovať aj prítomnosť protilátok s nízkou afinitou, ktoré sa eluovali z buniek počas premývania.

V prípade, že eluát vykazuje negatívnu reakciu (napr. žiadnu viditeľnú aglutináciu), zatiaľ čo z klinických údajov vyplýva prítomnosť obalujúcich protilátok, dôrazne odporúčame použiť alternatívnu elučnú metódu.

Vzorky krvi staršie ako 72 hodín môžu viesť k slabším eluátom ako čerstvé vzorky.

Dlhšie inkubovanie v Elution Solution 1 môže spôsobiť hemolýzu červených krviniek a denaturáciu eluovaných protilátok.

Kontaminácia testovacích materiálov alebo akákoľvek odchýlka od testovacieho protokolu alebo od iných odporúčaných metód opísaných v Návode na použitie, môžu viesť k falošne pozitívnej alebo falošne negatívnej reakcii.

Zámena Elution Solution 1 za Neutralisation Solution 2 bude viesť k slabej alebo k falošne negatívnej reakcii.

#### Referencie

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

*Sanquin zaručuje, že funkčné charakteristiky jej výrobkov zodpovedajú popisu v pôvodnom návode na použitie od výrobcu. Je nevyhnutné presne dodržiavať postupy, rozvrhnutie testov a odporúčania ohľadom činidiel a vybavenia. Nadácia Sanquin sa zrieka akejkoľvek zodpovednosti v prípade akýchkoľvek odchýlok od týchto postupov, rozvrhnutí a odporúčaní.*