



Kit eluizione acida
ISTRUZIONI PER L'USO

Red Cell Elute: Per l'eluizione acida di anticorpi da eritrociti intatti.

RIEPILOGO

È possibile disassociare e recuperare gli allo/auto anticorpi adsorbiti sugli eritrociti, sia *in vivo* che *in vitro*, tramite eluizione. L'eluato pertanto può essere utilizzato per identificare un singolo anticorpo in sieri multispecifici, dimostrare la presenza di un antigene debole, identificare l'anticorpo responsabile della positività a un test dell'antiglobulina diretta nell'anemia emolitica acquisita o in una reazione trasfusionale, identificare gli anticorpi che causano la Malattia emolitica del neonato o preparare un anticorpo specifico da sieri contenenti anticorpi indesiderati.

USO PREVISTO

Questo kit è destinato ad essere utilizzato per dissociare (eluire) gli anticorpi di tipo IgG dagli eritrociti umani utilizzando un tampone di eluizione acida e per regolare conseguentemente l'acidità dell'eluato utilizzando un tampone alcalino, in modo che gli anticorpi IgG nell'eluato possano essere identificati tramite procedure di test immuno-ematologici.

PRINCIPIO

Gli anticorpi non adsorbiti nel campione vengono rimossi mediante lavaggio con la soluzione di lavoro per il lavaggio. Dopo il lavaggio, il complesso antigene-anticorpo viene spezzato dall'aggiunta di una soluzione a basso pH. L'eluato recuperato viene regolato a pH 7.0 ± 0.5 aggiungendo una soluzione tamponata con una base (vedere **Limitazioni**). Per garantire che l'eluato contenga esclusivamente anticorpi legati agli eritrociti, occorre testare il surnatante rimasto dall'ultimo lavaggio degli eritrociti da eluire in parallelo con l'eluato.

DESCRIZIONE DEL KIT

Lorne Red Cell Elute è un kit di eluizione acida. Il kit è composto da soluzione di lavaggio concentrata, utilizzata per minimizzare la dissociazione degli anticorpi durante il lavaggio; soluzione di eluizione acida, ovvero un tampone di glicina a pH basso contenente un agente di colorazione (indicatore pH) e una soluzione tampone basica; soluzione tris(idrossimetil)amminometano contenente albumina bovina. Il kit non contiene né comprende sostanze CMR, o sostanze che alterano il sistema endocrino o che potrebbero provocare una sensibilizzazione o una reazione allergica nell'utilizzatore. Tutte le soluzioni vengono fornite alla diluizione ottimale per l'uso con tutte le tecniche raccomandate indicate di seguito senza la necessità di ulteriori diluizioni o aggiunte ad eccezione della soluzione di lavaggio concentrata. Per il numero di riferimento del lotto e la data di scadenza vedere **Etichetta della fiala**.

CONSERVAZIONE

Non congelare. Conservare le fiale di reagente a temperatura ambiente dal momento della ricezione. La conservazione prolungata a temperature al di fuori di questo intervallo può provocare una perdita accelerata dell'attività del reagente. Questo reagente è stato sottoposto a studi di stabilità al trasporto a 37°C e -25°C come descritto nel documento BS EN ISO 23640:2015.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni possono essere prelevati utilizzando una tecnica di flebotomia aseptica. Si preferiscono campioni anticoagulati prelevati in EDTA. In caso di ritardo nei test, conservare i campioni a 2-8°C. L'uso di cellule più vecchie di 72 ore può produrre meno anticorpi e alterare il pH dell'eluato finale.

PRECAUZIONI

1. Il reagente è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*.
2. Se una fiala presenta crepe o perdite, gettare via il contenuto immediatamente.
3. Non usare il reagente dopo la data di scadenza (vedere **Etichetta della fiala**).
4. Non usare il reagente se è presente un precipitato.
5. Quando si maneggia il reagente, indossare indumenti protettivi quali guanti monouso e un camice da laboratorio.
6. I reagenti sono stati filtrati attraverso una capsula da 0,2 µm per ridurre la carica batterica, ma non vengono forniti sterili. Dopo l'apertura di una fiala, il contenuto rimane vitale fino alla data di scadenza, a condizione che non vi sia una torbidità marcata, che può indicare il deterioramento o la contaminazione del reagente.
7. La soluzione di lavaggio contiene 0,1% di azoturo di sodio. L'azoturo di sodio può risultare tossico se ingerito e può reagire con le tubature in piombo o rame fino a formare azoturi metallici esplosivi. Per lo smaltimento sciacquare con grandi volumi di acqua.
8. È necessario prestare attenzione durante l'uso e lo smaltimento di ciascuna fiala e del suo contenuto.

SMALTIMENTO DEL REAGENTE E GESTIONE DELLE FUORIUSCITE

Per informazioni sullo smaltimento dei kit reagenti e sulla decontaminazione di un sito di fuoriuscita, vedere le **Schede di dati di sicurezza dei materiali**, disponibili su richiesta.

CONTROLLI E CONSIGLI

1. Testando la soluzione conservata dopo l'ultimo lavaggio si avrà la conferma che l'anticorpo rilevato nell'eluato è stato rilasciato da uno stato legato e non da anticorpi liberi rimanenti dopo un lavaggio inadeguato. Se le provette di controllo sono positive, l'eluizione deve essere ripetuta avendo cura di lavarle accuratamente.
2. La tecnica in provetta dell'antiglobulina può essere considerata valida solo se tutti i test negativi reagiscono positivamente con gli eritrociti sensibilizzati con IgG (cellule di controllo di Coombs).
3. Nelle **Tecniche raccomandate** un volume è di circa 50µl se si usa la fiala contagocce fornita.
4. L'uso del kit e l'interpretazione dei risultati devono essere eseguiti da personale adeguatamente formato e qualificato in conformità ai requisiti del paese in cui il kit è in uso. L'utilizzatore deve stabilire l'idoneità del kit per l'uso in altre tecniche.

COMPONENTI DEL KIT FORNITI

- Soluzione di eluizione acida 1 x 10 ml (Solution I).
- Soluzione tampone basica 1 x 10 ml (Solution II).
- Soluzione di lavaggio concentrata 2 x 25 ml.
- Flacone di lavaggio.

REAGENTI E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Tecnica in provetta

- Antiglobuline umane, ovvero Lorne AHG Elite (Cat # 435010 o 415010) o anti-IgG umane, ovvero Lorne Anti-Human IgG (Cat # 402010 o 401010).
- Sistema di lavaggio per cellule Coombs.
- Provette in vetro (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Soluzione di PBS (pH 6.8-7.2) o soluzione salina isotonica (pH 6.5-7.5).
- Eritrociti sensibilizzati con IgG, ovvero Lorne Coombs Control Cells (Cat # 970010).
- Bagno d'acqua o incubatore di calore a secco equilibrato a 37°C ± 2°C.

Tecnica di microtipizzazione Bio-Rad-ID

- ID-Card Bio-Rad (LISS/Coombs o Coombs Anti-IgG).
- ID-Centrifuge Bio-Rad.
- ID-CellStab o ID-Diluent 2 Bio-Rad.
- Bio-Rad ID-Incubator equilibrato a 37°C ± 2°C.

Tecnica di tipizzazione Ortho BioVue

- Cassette Ortho BioVue System (polispecifiche AHG o Anti-IgG AHG).
- Centrifuga Ortho BioVue System.
- Blocco di calore Ortho BioVue System equilibrato a 37°C ± 2°C.
- Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.

Tutte le tecniche

- Pipette volumetriche.

PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO PER IL LAVAGGIO

1. Versare il contenuto di 1 flacone di soluzione di lavaggio concentrata nel flacone di lavaggio fornito.
2. Aggiungere acqua distillata o deionizzata di buona qualità sufficiente a riempire il flacone di lavaggio fino alla linea di riempimento (250 ml) e miscelare accuratamente.
3. La soluzione di lavoro per il lavaggio è pronta per l'uso e può essere conservata a 2-8°C per un massimo di sei mesi e utilizzata se non presenta torbidità.
4. L'uso della soluzione di lavoro per il lavaggio a freddo minimizza la dissociazione degli anticorpi durante la fase di lavaggio della procedura.

TEST DEL CAMPIONE DI ERITROCITI PRIMA DELL'ELUIZIONE

1. Eseguire un test dell'antiglobulina diretta sul campione di eritrociti da analizzare e registrarne i risultati.
2. Se il campione dà un test dell'antiglobulina diretta positivo, allora vi è un anticorpo legato, dovuto alla sensibilizzazione *in vivo* o *in vitro*, presente sugli eritrociti.

- Per determinare se la sensibilizzazione è dovuta all'immunoglobulina o al complemento, testare il campione contro anti-IgG e anti-C3d.
- Se il campione dà un risultato positivo con anti-IgG, allora il test dell'antiglobulina diretta positivo è dovuto all'immunoglobulina ed è possibile realizzare un'eluizione per rimuovere e identificare l'anticorpo presente.
- Se il campione dà un risultato positivo con anti-C3d, allora il test dell'antiglobulina diretta positivo è dovuto al complemento e l'eluizione non deve essere realizzata poiché non riuscirebbe a dimostrare l'attività anticorpale.
- Quanto più forte è il risultato del test dell'antiglobulina diretta, quanti più anticorpi sarà facile eluire dalla superficie degli eritrociti.

TECNICA DI ELUZIONE RACCOMANDATA

- Prelevare 2 ml dal campione di eritrociti da analizzare e lavare gli eritrociti una volta in soluzione salina isotonica avendo cura di travasare completamente la soluzione salina dopo il lavaggio.
- Lavare gli eritrociti quattro volte con la soluzione di lavoro per il lavaggio per rimuovere qualsiasi anticorpo non legato.
- Conservare una piccola aliquota del surnatante rimasto dall'ultimo lavaggio, la quale sarà usata in seguito per testare l'attività degli anticorpi.
- Assicurarsi di travasare completamente la soluzione di lavaggio dopo ogni lavaggio.
- Inserire in una provetta etichettata: 1 ml di eritrociti concentrati sensibilizzati lavati e aggiungere 1 ml di Solution I per eluire l'anticorpo.
- Miscelare accuratamente e centrifugare la provetta per 60 secondi a 1000 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Trasferire il surnatante (eluato) in una provetta pulita e scartare le cellule.
- Aggiungere goccia a goccia Solution II all'eluato, miscelando accuratamente dopo ogni goccia fino a quando appare di colore blu. Il colore blu indica un range di pH di 6.5-7.5 e significa che l'eluato è stato tamponato al pH corretto.
- Se appaiono precipitati, centrifugare per 60 secondi a 1000 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Per il test dell'eluato vedere sotto. È possibile conservare l'eluato fino a 7 giorni a 2-8°C.

SELEZIONE DI ERITROCITI PER ELUATO/SURNATANTE ULTIMO LAVAGGIO

- La scelta degli eritrociti utilizzati per il test contro l'eluato dipende da ciascun laboratorio.
- È possibile utilizzare eritrociti reagenti commerciali al 3-5% o allo 0,8%.
- È possibile utilizzare i campioni di eritrociti di pazienti e donatori a condizione che le cellule siano lavate almeno tre volte in soluzione salina isotonica e poi sospese al 3% o allo 0,8% prima dell'uso.
- Se si sospetta un'anemia emolitica indotta da farmaci, allora l'eluato deve essere testato contro le cellule sensibilizzate con il farmaco in questione.

TEST DELL'ELUATO/SURNATANTE ULTIMO LAVAGGIO

A. Tecnica del test in provetta

- Inserire in una provetta etichettata: 2 volumi* di eluato o surnatante rimasto dall'ultimo lavaggio e 1 volume di eritrociti.
- Miscelare accuratamente e incubare a 37°C per 15 minuti.
- Dopo l'incubazione aggiungere 10 gocce di soluzione di lavoro per il lavaggio.
- Miscelare accuratamente e centrifugare tutte le provette per 30 secondi a 1000 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Travasare la soluzione, quindi aggiungere due gocce di antiglobulina umana.
- Miscelare accuratamente e centrifugare per 20 secondi a 900-1000 rcf.
- Risospingere le cellule e procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione. Registrare i risultati.
- Confermare la validità di tutte le reazioni negative utilizzando eritrociti sensibilizzati con IgG (vedere **Controlli e consigli**).

* Se si osserva un test dell'antiglobulina diretta debole (2+ o meno) sulle cellule sensibilizzate, è possibile utilizzare 3-4 gocce di eluato per potenziare la sensibilità del test.

B. Tecnica di microtipizzazione Bio-Rad-ID

- Preparare una sospensione di eritrociti lavati allo 0,8% in Bio-Rad ID-Diluent 2.
- Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero necessario di microprovette Bio-Rad LISS/Coombs o Coombs Anti-IgG schede gel.
- Inserire nella microprovetta appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 25µl di eluato.
- Inserire in un'altra microprovetta: 50µl di sospensione di eritrociti e 25µl di surnatante rimasto dall'ultimo lavaggio.
- Incubare la/le ID-Card LISS/Coombs per 15 minuti a 37°C.
- Centrifugare la/le ID-Card LISS/Coombs nella centrifuga Bio-Rad ID-Card.
- Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

C. Tecnica di tipizzazione Ortho BioVue

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.

- Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero necessario di camere di reazione della cassetta AHG polispecifiche o AHG Anti-IgG Ortho.
- Inserire nella camera di reazione appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti per test e 40µl di eluato.
- Inserire in un'altra camera di reazione: 50µl di sospensione di eritrociti e 40µl di surnatante rimasto dall'ultimo lavaggio.
- Incubare la/le cassetta/e per 15 minuti a 37°C.
- Centrifugare la/le cassetta/e in una centrifuga Ortho BioVue System.
- Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

Interpretazione dei risultati

- Positivo:** L'agglutinazione degli eritrociti costituisce un risultato positivo del test e, entro i limiti accettati della procedura di test, indica che sono stati recuperati uno o più anticorpi dagli eritrociti sensibilizzati.
- Negativo:** L'assenza di agglutinazione degli eritrociti costituisce un risultato negativo e, entro i limiti accettati della procedura di test, non è stato recuperato nessun anticorpo dagli eritrociti sensibilizzati.
- I risultati del surnatante rimasto dall'ultimo lavaggio devono essere negativi. Occorre ripetere il test in caso di risultati positivi.

LIMITAZIONI

- L'attività dell'eluato è limitata dalla quantità di anticorpo legato agli eritrociti, dalla quantità di dissociazione dell'anticorpo durante la procedura di lavaggio e da quanto l'immunoglobulina viene denaturata dal pH basso durante la dissociazione.
- La contaminazione dell'eluato con anticorpi non legati dovuti al lavaggio inadeguato degli eritrociti durante la procedura di eluizione può limitare l'attività dell'eluato.
- La mancata regolazione del pH alla portata corretta può causare emolisi.
- L'eccessiva diluizione dell'eluato tramite aggiunta di quantità eccessive di "Soluzione tampone basica" durante la regolazione del pH dell'eluato può causare risultati più deboli o falsi negativi.
- Gli eritrociti utilizzati per gli studi di eluizione non devono essere utilizzati per la fenotipizzazione.
- I risultati falsi positivi o falsi negativi possono verificarsi anche a causa di:
 - Contaminazione dei materiali dei test
 - Errata concentrazione cellulare
 - Tempo o temperatura di incubazione errati
 - Errata o eccessiva centrifugazione
 - Errata conservazione dei materiali dei test o omissione dei reagenti
 - Scostamento dalle tecniche raccomandate

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI SPECIFICHE

- Il kit è stato caratterizzato da tutte le procedure menzionate nelle **Tecniche raccomandate**.
- Prima del rilascio, ogni lotto di Lorne Red Cell-Elute è stato testato mediante le **Tecniche raccomandate** e ha dimostrato di eluire un'ampia gamma di anticorpi IgG da eritrociti sensibilizzati.
- Il kit è conforme alle raccomandazioni contenute nell'edizione più recente delle Linee guida per i servizi di trasfusione di sangue nel Regno Unito.

DICHIARAZIONE DI NON RESPONSABILITÀ

- L'utilizzatore è responsabile delle prestazioni del kit con qualsiasi metodo diverso da quelli indicati nelle **Tecniche raccomandate**.
- Qualsiasi scostamento dalle **Tecniche raccomandate** deve essere approvato prima dell'uso¹.

BIBLIOGRAFIA

- British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. *Transfusion Medicine*, 1995, **5**, 145-150.
- Judd WJ. Elution of Antibody from Red Cells. In: Seminar On Antigen-Antibody Reactions Revisited. Bell CA. Ed. Arlington. VA: American Association of Blood Banks 1982:175.
- Rekvig OP, Hannestad K. Acid Elution of Blood Group Antibodies from Intact Erythrocytes. *Vox Sang* 1977; 33:280.
- R.M. Leger, P.A. Arndt, D.J. Ciesielski, and G. Garratty. False-positive eluate reactivity due to the low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. *Transfusion* 1998;38:565-572

DIMENSIONI DEI REAGENTI DISPONIBILI

	Dimensione delle confezioni	Numero catalogo
Red Cell Elute	10 test/kit	930110



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill

Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Regno Unito
Tel: +44 (0) 118 921 2264
Fax: +44 (0) 118 986 4518
E-mail: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta