



KIT DE ELUCIÓN ÁCIDA
INSTRUCCIONES DE USO

Eluido de glóbulos rojos: Para la elución ácida de anticuerpos en glóbulos rojos intactos.

RESUMEN

Los aloanticuerpos o autoanticuerpos que se adhieren a los glóbulos rojos, tanto *in vivo* como *in vitro*, se pueden disociar y recuperar durante la elución. Posteriormente, el eluido se puede utilizar para identificar a un único anticuerpo en suero multiespecífico, confirmar la presencia de un antígeno débil, identificar el anticuerpo causante de un resultado positivo en la prueba de la antiglobulina directa en la anemia hemolítica adquirida o reacción transfusional, detectar los anticuerpos causantes de la enfermedad hemolítica del recién nacido o preparar anticuerpos específicos a partir de sueros que contengan anticuerpos no deseados.

USO PREVISTO

Se pretende que el kit se utilice para disociar (eluir) anticuerpos IgG de los glóbulos rojos en seres humanos empleando un amortiguador de elución ácido y, a continuación, adaptar la acidez del eluido mediante un amortiguador alcalino para que los anticuerpos IgG en el eluido se puedan detectar a través de pruebas inmunohematológicas.

PRINCIPIO

Los anticuerpos no absorbidos en la muestra se eliminan al lavarla con la solución de lavado. Tras el lavado, el inmunocomplejo se rompe al añadir una solución de pH bajo. El eluido recuperado se modifica a pH 7,0 ±0,5 al añadir una solución amortiguadora (véase la sección **Limitaciones**). Para garantizar que el eluido solo contiene anticuerpos ligados a glóbulos rojos, el sobrenadante del último lavado de los glóbulos rojos que se va a eluir se debe analizar en paralelo con el eluido.

DESCRIPCIÓN DEL KIT

El eluido de glóbulos rojos de Lorne es un kit de elución ácida. El kit se compone de una solución de lavado concentrada, que se utiliza para disminuir la disociación de los anticuerpos durante el lavado; una solución de elución ácida, que consiste en un amortiguador de glicina de pH bajo que contiene colorante (indicador de pH), y un amortiguador, una solución de tris(hidroximetil)aminometano que contiene albúmina bovina. El kit no contiene ni está compuesto de sustancias CMR, sustancias que alteran el funcionamiento del sistema endocrino o que podrían causar sensibilización o una reacción alérgica al usuario. Todas las soluciones se suministran en la dilución óptima para su utilización en todas las técnicas aquí recomendadas sin necesidad de diluciones o adiciones suplementarias, salvo la solución de lavado concentrada. Para obtener información sobre el número de referencia del lote y la fecha de caducidad, consulte la **etiqueta del frasco**.

CONSERVACIÓN

No congelar. Los frascos de reactivo deben conservarse a temperatura ambiente. El almacenamiento prolongado a temperaturas fuera de este rango puede acelerar la pérdida de la actividad del reactivo. Este reactivo se ha sometido a estudios de estabilidad durante el traslado a 37 °C y -25 °C, según lo descrito en el documento BS EN ISO 23640:2015.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras pueden obtenerse mediante una técnica de flebotomía aséptica. Se prefieren las muestras anticoaguladas con EDTA. Si las pruebas se retrasan, las muestras deben conservarse a 2-8 °C. El empleo de las células de más de 72 horas podría producir menos anticuerpos y alterar el pH del eluido final.

PRECAUCIONES

1. El reactivo es solo para uso en diagnóstico *in vitro*.
2. Si el frasco está roto o agrietado, se debe descartar su contenido de inmediato.
3. No utilizar el reactivo si está caducado (véase la **etiqueta del frasco**).
4. No utilizar el reactivo si presenta precipitado.
5. La manipulación del reactivo debe realizarse con la apropiada indumentaria de protección, tales como guantes desechables y bata de laboratorio.
6. Los reactivos han sido filtrados a través de cápsulas de 0,2 µm para reducir la carga microbiana, pero no se proporcionan esterilizados. Una vez abierto el vial, el contenido debe permanecer viable hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando no haya una marcada turbidez, lo que podría indicar un deterioro o contaminación del reactivo.
7. La solución de lavado contiene 0,1 % de azida sódica. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere y puede reaccionar con el cobre o plomo de las tuberías y formar azidas metálicas explosivas. Al eliminar el producto, hacerlo con abundante agua.
8. Se debe tener precaución en el uso y eliminación de los frascos y su contenido.

ELIMINACIÓN DEL REACTIVO Y CÓMO ACTUAR EN CASO DE DERRAME

Para obtener información sobre la eliminación del reactivo del kit y la descontaminación del lugar del derrame, consulte las **Hojas de datos de seguridad de los materiales** que pueden obtenerse previa solicitud.

CONTROLES Y CONSEJOS

1. El análisis de la solución reservada del último lavado confirmará si el anticuerpo que se ha detectado en el eluido se había liberado de una unión y no del anticuerpo libre restante tras un lavado inadecuado. Si los tubos de control ofrecen un resultado positivo, la elución se debe repetir, procurando llevar a cabo un lavado exhaustivo.
2. La técnica de antiglobulina en tubo solo se puede considerar válida si todas las pruebas negativas reaccionan de manera positiva con glóbulos rojos sensibilizados con IgG (célula de control de Coombs).
3. En las **Técnicas recomendadas**, un volumen equivale aproximadamente a 50 µl cuando se utiliza el cuentagotas del frasco suministrado.
4. La utilización del kit y la interpretación de los resultados deben llevarse a cabo por personal habilitado y formado de acuerdo con los requisitos del país donde se utilice el kit. El usuario debe definir la idoneidad del kit para su uso en otros procedimientos.

COMPONENTES DEL KIT SUMINISTRADOS

- Solución de elución ácida 1 x 10 ml (solución I).
- Amortiguador 1 x 10 ml (solución II).
- Solución de lavado concentrada 2 x 25 ml.
- Frasco de lavado.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

Técnica en tubo

- Globulina antihumana; es decir, Lorne AHG Elite (n.º de cat. 435010 o 415010) o IgG antihumana; es decir, Lorne Anti-Human IgG (n.º de cat. 402010 o 401010).
- Lavador de células de Coombs.
- Tubos de ensayo de vidrio (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) (pH 6,8-7,2) o solución salina isotónica (pH 6,5-7,5).
- Glóbulos rojos sensibilizados con IgG; es decir, células de control de Coombs de Lorne (n.º de cat. 970010).
- Baño de María o incubadora de calor seco equilibrada a 37 °C ±2 °C.

Técnica de micro tipificación en Bio-Rad-ID

- Tarjetas de identificación Bio-Rad (LISS/Coombs o anticuerpos IgG de Coombs).
- Centrifugadora ID Bio-Rad.
- Bio-Rad ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Incubadora Bio-Rad ID equilibrada a 37 °C ±2°.

Técnica de tipificación en Ortho Biovue

- Casete del sistema Ortho BioVue (AGH poliespecífica o AGH de anticuerpos IgG).
- Centrifugadora del sistema Ortho BioVue.
- Calentador de bloque del sistema Ortho BioVue equilibrado a 37 °C ±2 °C.
- Diluyente de glóbulos rojos Ortho 0,8 %.

Todas las técnicas

- Pipetas volumétricas.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LAVADO

1. Verter el contenido de 1 frasco de solución de lavado concentrada en el frasco de lavado proporcionado.
2. Añadir la cantidad suficiente de agua destilada o desionizada de buena calidad para llenar el frasco de lavado hasta la línea de llenado (250 ml) y agitar bien.
3. La solución de lavado está lista para ser utilizada y se debe conservar a 2-8 °C durante un máximo de seis meses; se puede utilizar si no se observa turbidez.
4. El empleo de la solución de lavado fría reducirá la disociación de anticuerpos durante la fase de lavado del procedimiento.

ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE GLÓBULOS ROJOS ANTES DE LA ELUCIÓN

1. Realizar una prueba de la antiglobulina directa en la muestra de glóbulos rojos que se va a analizar y registrar los resultados.
2. Si la muestra obtiene un resultado positivo en la prueba de la antiglobulina directa significa que hay un anticuerpo ligado, debido a la sensibilización *in vivo* o *in vitro*, a los glóbulos rojos.
3. Para averiguar si la sensibilización se debe a la inmunoglobulina o al complemento, debe analizarse la muestra junto con los anticuerpos IgG y C3d.
4. Si la muestra obtiene un resultado positivo con un anticuerpo IgG, entonces el resultado positivo en la prueba de la antiglobulina directa se debe a la inmunoglobulina y se puede llevar a cabo una elución para eliminar y detectar los anticuerpos que estén presentes.
5. Si la muestra obtiene un resultado positivo con un anticuerpo C3d, entonces el resultado positivo en la prueba de la antiglobulina directa se debe al complemento y no se debe llevar a cabo una elución, porque no demostraría la presencia de anticuerpos.
6. Cuanto más claro sea el resultado de la prueba de la antiglobulina directa, más anticuerpos se eluirán con facilidad de la superficie de los glóbulos rojos.

TÉCNICA RECOMENDADA DE ELUCIÓN

1. Tomar una muestra de 2 ml de la muestra de glóbulos rojos que se va a analizar y lavar los glóbulos rojos una vez en la solución salina isotónica; se debe decantar por completo la solución salina después del lavado.
2. Lavar los glóbulos rojos cuatro veces con la solución de lavado para eliminar los anticuerpos que no estén unidos.
3. Separar una pequeña muestra del sobrenadante del último lavado, que se utilizará después para comprobar la presencia de anticuerpos.
4. Se debe decantar por completo la solución de lavado después de cada lavado.
5. Añadir en un tubo etiquetado: 1 ml del concentrado de eritrocitos sensibilizados lavados y añadir 1 ml de la solución I para eluir el anticuerpo.
6. Mezclar minuciosamente y centrifugar el tubo durante 60 segundos a 1000 fcr o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
7. Pasar el sobrenadante (eluido) a un tubo limpio y desechar las células.
8. Añadir la solución II al eluido con el cuentagotas y mezclar bien después de cada gota hasta que el contenido se vuelva azul. El color azul indica un intervalo de pH de 6,5-7,5 y significa que el eluido se ha amortiguado al pH adecuado.
9. Si aparecen precipitados, centrifugar durante 60 segundos a 1000 fcr o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
10. Para el análisis del eluido consulte la información a continuación. El eluido se puede conservar durante un máximo de 7 días a 2-8 °C.

SELECCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS PARA EL ELUIDO / SOBRENADANTE DEL ÚLTIMO LAVADO

1. La elección de los glóbulos rojos que se utilizarán para analizarlos junto al eluido depende de cada laboratorio.
2. Se pueden utilizar reactivos de glóbulos rojos comerciales al 3-5 % o al 0,8 %.
3. Se pueden utilizar las muestras de glóbulos rojos de pacientes y donantes siempre que las células se hayan lavado al menos tres veces en una solución salina isotónica y luego se sumerjan en una suspensión al 3 % o 0,8 % antes de utilizarlas.
4. Si existe sospecha de anemia hemolítica medicamentosa, el eluido se debe analizar junto con los glóbulos rojos sensibilizados con el fármaco correspondiente.

ANÁLISIS DEL ELUIDO / SOBRENADANTE DEL ÚLTIMO LAVADO

A. Técnica de análisis en tubo

1. Añadir en un tubo etiquetado: 2 volúmenes* de eluido o sobrenadante del último lavado y 1 volumen de glóbulos rojos.
2. Mezclar minuciosamente e incubar a 37 °C durante 15 minutos.
3. Tras la incubación, añadir 10 gotas de la solución de lavado.
4. Mezclar minuciosamente y centrifugar todos los tubos durante 30 segundos a 1000 fcr o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
5. Decantar la solución y luego añadir dos gotas de anticuerpos contra las globulinas humanas.
6. Mezclar minuciosamente y centrifugar durante 20 segundos a 900-1000 fcr.
7. Volver a suspender las células y comprobar si hay aglutinación. Registrar los resultados.
8. Confirmar la validez de todas las reacciones negativas mediante glóbulos rojos sensibilizados con IgG (consultar la sección de **Controles y consejos**).

* Si se obtiene un resultado débil en la prueba de la antiglobulina directa (2+ o menos) en las células sensibilizadas, se pueden añadir 3-4 gotas de eluido para aumentar la sensibilidad de la prueba.

B. Técnica de micro tipificación en Bio-Rad-ID

1. Preparar una suspensión de glóbulos rojos lavados al 0,8 % en ID-Diluent 2 de Bio-Rad.
2. Retirar el papel de aluminio de los microtubos de tarjetas de gel Bio-Rad LISS/Coombs o anticuerpos IgG de Coombs que sean necesarios.
3. Añadir en el microtubo correspondiente: 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos y 25 µl de eluido.
4. Añadir en otro microtubo: 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos y 25 µl del sobrenadante del último lavado.
5. Incubar la/s tarjeta/s de identificación LISS/Coombs durante 15 minutos a 37 °C.
6. Centrifugar la/s tarjeta/s de identificación LISS/Coombs en la centrifugadora Bio-Rad ID-Card.
7. Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

C. Técnica de tipificación en Ortho Biovue

1. Preparar una suspensión de glóbulos rojos lavados al 0,8 % en diluyente de glóbulos rojos de Ortho al 0,8 %.
2. Retirar el papel de aluminio de las cámaras de reacción de casetes Ortho AGH poliespecífica o AGH de anticuerpos IgG que sean necesarias.
3. Añadir en la cámara de reacción correspondiente: 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos analizada y 40 µl de eluido.
4. Añadir en otra cámara de reacción: 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos y 40 µl del sobrenadante del último lavado.
5. Incubar el/los casete/s durante 15 minutos a 37 °C.
6. Centrifugar el/los casete/s en una centrifugadora del sistema Ortho BioVue.
7. Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. **Positivo:** La aglutinación de los glóbulos rojos constituye un resultado positivo y, dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del análisis, indica que se han recuperado uno o más anticuerpos de los glóbulos rojos sensibilizados.
2. **Negativo:** La ausencia de aglutinación de glóbulos rojos constituye un resultado negativo y, dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del análisis, indica que no se ha recuperado ningún anticuerpo de los glóbulos rojos sensibilizados.
3. Los resultados del sobrenadante del último lavado deben ser negativos. Se debe repetir la prueba si se ha obtenido un resultado positivo.

LIMITACIONES

1. La actividad del eluido depende de la cantidad de anticuerpos ligados a los glóbulos rojos, el nivel de disociación del anticuerpo durante el procedimiento de lavado y el grado de desnaturalización que presenta la inmunoglobulina debido al pH bajo durante la disociación.
2. La contaminación del eluido con anticuerpos que no están unidos debido al lavado inadecuado de los glóbulos rojos durante el procedimiento de elución podría limitar la actividad del eluido.
3. Si no se logra adaptar el pH a un intervalo adecuado, se podría producir hemólisis.
4. Una dilución indebida del eluido al añadir una cantidad excesiva de amortiguador al adaptar el pH del eluido podría producir resultados más débiles o un resultado negativo falso.
5. Los glóbulos rojos que se utilicen en los estudios de elución no deben utilizarse para el fenotipado.
6. También pueden darse resultados positivos falsos o negativos falsos debido a:
 - Contaminación de los materiales del análisis
 - Concentración celular inadecuada
 - Tiempo o temperatura de incubación inadecuados
 - Centrifugación inadecuada o excesiva
 - Almacenamiento inadecuado de los materiales de la prueba u omisión de los reactivos.
 - Desviación de las técnicas recomendadas

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

1. El kit se ha caracterizado mediante todos los procedimientos mencionados en las **Técnicas recomendadas**.
2. Antes de su lanzamiento, cada lote de elución de glóbulos rojos de Lorne se ha analizado mediante las **Técnicas recomendadas** y se ha demostrado que eluye una gran cantidad de anticuerpos IgG de los glóbulos rojos sensibilizados.
3. El kit cumple con las recomendaciones incluidas en la última versión de las Guías para los Servicios de transfusión de sangre del Reino Unido.

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

1. El usuario es responsable del funcionamiento del kit en cualquier otro método distinto de los mencionados como **Técnicas recomendadas**.
2. Cualquier desviación de la **técnica recomendada** debe validarse antes de su uso¹.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. 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.
3. Rekvig OP, Hannestad K. Acid Elution of Blood Group Antibodies from Intact Erythrocytes. *Vox Sang* 1977: 33:280.
4. R.M. Leger, P.A. Arndt, D.J. Ciesielski, y G. Garratty. False-positive eluate reactivity due to the low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. *Transfusion* 1998;38:565-572

TAMAÑOS DE REACTIVOS DISPONIBLES

	Tamaño del envase	Número de catálogo
Eluido de glóbulos rojos	10 pruebas/kit	930110



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Reino Unido
Tel: +44 (0) 118 921 2264
Fax: +44 (0) 118 986 4518
Correo electrónico: info@lornelabs.com

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