

ELU KIT™ PLUS Red Cell Elution System

Para a eluição de anticorpos em ácido de glóbulos vermelhos intactos



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Nocivo – contém azida de sódio a 0,1%



Consultar as Instruções de Utilização



Conservar entre 1 e 30 °C. Não congelar.



IMMUCOR Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel Strasse 26A
D-63322 Rödemark, GERMANY
REPRESENTANTE AUTORIZADO NA COMUNIDADE EUROPEIA



Fabricante:
Dominion Biologicals Limited
5 Isnor Drive, Dartmouth, Nova Escócia CANADÁ B3B 1M1
Tel.: 902-468-3992 Fax: 902-468-3599

	Usar até (prazo de validade)		Nocivo
	Código do lote		Número de catálogo

RESUMO

O anticorpo adsorvido pelos glóbulos vermelhos, seja *in vivo* ou *in vitro*, pode ser dissociado e recuperado através do processo de eluição. O eluato recuperado pode ser utilizado:

- para identificar um anticorpo único em soros que contenham várias especificidades de anticorpos;
- para demonstrar a presença de um antígeno fraco;
- para identificar o anticorpo responsável por um teste de aglutinação directo positivo para anemia hemolítica adquirida ou reacção à transfusão;
- para identificar os anticorpos responsáveis pela doença hemolítica em recém-nascidos;
- para preparar anticorpos específicos a partir de soros que contenham anticorpos indesejados.

Os métodos para preparar eluatos incluem a eluição pelo calor, o congelamento-descongelamento, a alteração do pH e o tratamento com solventes orgânicos, tais como o éter, cloro de metileno, clorofórmio ou xileno.

PRINCÍPIO

O anticorpo não adsorvido que rodeia os glóbulos vermelhos sensibilizados é retirado através de irrigação com uma solução de lavagem que minimiza a perda do anticorpo adsorvido pelos glóbulos vermelhos. Após a lavagem, o complexo antígeno-anticorpo é dissociado adicionando uma solução de pH baixo. O pH do eluato recuperado é então ajustado adicionando uma solução tampão de base. O eluato fica então pronto a ser utilizado.

REAGENTE

O Kit ELU KIT™ PLUS consiste em três soluções:

- Concentrado de solução de lavagem:** contém 0,1% de azida de sódio como agente antimicrobiano. Diluir o concentrado 1/10 (1+9) em água destilada ou desionizada para preparar uma solução de lavagem de trabalho.
- Solução I, solução de eluição em ácido:** um tampão de glicina de pH baixo, que contém um agente corante (indicador de pH). Não contém conservantes nem agentes antimicrobianos. Utilizada conforme fornecida.
- Solução II, solução tampão de base:** uma solução Tris (hidroximetilaminometano), que contém albumina bovina com 0,1% de azida de sódio como agente antimicrobiano. Utilizada conforme fornecida.

Apenas para utilização em diagnósticos profissionais *in vitro*.

PRECAUÇÕES

A turvação poderá indicar contaminação bacteriana ou deterioração do reagente. Não utilizar reagentes contaminados ou recipientes sem rótulos. Não utilizar após o prazo de validade. O ELU KIT™ PLUS pode ser armazenado em área refrigerada ou a temperatura ambiente. Não congelar.



A AZIDA DE SÓDIO É TÓXICA. NÃO INGERIR. A AZIDA DE SÓDIO PODERÁ REAGIR COM TUBAGENS DE CHUMBO OU COBRE E FORMAR AZIDAS METÁLICAS EXPLOSIVAS. AO ELIMINAR, FAZER CORRER ÁGUA EM GRANDE QUANTIDADE PARA PREVENIR A ACUMULAÇÃO DE AZIDAS.

ESTE PRODUTO DEVE SER CONSIDERADO COMO SENDO DE RISCO BIOLÓGICO, DEVENDO A SUA ELIMINAÇÃO CUMPRIR OS REQUISITOS APLICÁVEIS À ELIMINAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO PERIGOSO.



ELU KIT™ PLUS Red Cell Elution System

Para a eluição de anticorpos em ácido de glóbulos vermelhos intactos



QUALQUER ALBUMINA BOVINA UTILIZADA NO FABRICO DESTES PRODUTOS PROVÉM DE ANIMAIS DOADORES INSPECIONADOS E CERTIFICADOS PELOS NOSSOS INSPECTORES DE SERVIÇO VETERINÁRIO COMO ESTANDO ISENTOS DE QUALQUER DOENÇA. ESTE PRODUTO DE BASE RUMINANTE É CONSIDERADO COMO APRESENTANDO UM RISCO REDUZIDO DE EET (ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME TRANSMISSÍVEL).

PROCEDIMENTO

Reagentes fornecidos: Concentrado de solução de lavagem ELU KIT™ PLUS, Solução I (solução de eluição em ácido) e Solução II (solução tampão de base).

Materiais e equipamento não fornecidos:

Tubos de ensaio em vidro descartáveis (recomendados: 12 x 75 mm), pipetas de transferência, temporizador, banho de água ou incubadora a 37 °C (± 1 °C), centrífuga serológica (900-1000 rcf), água destilada ou desionizada, solução salina isotónica (recomendada: solução salina de tampão fosfato com pH de 6,5 a 7,5) e outros reagentes para efectuar testes com o eluato.

I PROCEDIMENTO DE ELUIÇÃO

NOTA: Deixar que todos os reagentes/soluções atinjam a temperatura ambiente (18 - 25 °C), antes de utilizar neste procedimento. Agitar todas as soluções completamente antes de serem utilizadas.

- Diluir o Concentrado de solução de lavagem adicionando um volume da solução a nove volumes de água destilada ou desionizada. Esta solução de lavagem de trabalho deverá ser conservada entre 1 e 10 °C num recipiente fechado. Esta solução poderá ser utilizada até seis meses depois, caso não se observe turvação ou outros sinais de contaminação durante a conservação. A utilização de uma solução de lavagem "fria" poderá minimizar o crescimento de anticorpos durante a fase de lavagem do procedimento.
- Efectuar um teste de aglutinação directo na amostra de glóbulos vermelhos que foi sensibilizada com o anticorpo *in vivo* ou *in vitro*. Registrar os resultados.
- Centrifugar a amostra de glóbulos sensibilizados num tubo de ensaio limpo e rotulado. Retirar o excesso de plasma ou de soro. Lavar uma vez com solução salina isotónica.
- Transferir um volume adequado de glóbulos vermelhos aglomerados para um tubo de ensaio limpo e rotulado (recomenda-se 1 mL de glóbulos aglomerados)*. Lavar os glóbulos vermelhos aglomerados com a solução de lavagem de trabalho, pelo menos, quatro vezes para eliminar o anticorpo não ligado. Reservar uma pequena alíquota do sobrenadante da última lavagem para testar relativamente à actividade do anticorpo. A lavagem inadequada poderá resultar na contaminação de anticorpos no soro.
- Transferir os glóbulos lavados para um tubo de ensaio limpo e rotulado. Adicionar 20 gotas (~1 mL) de Solução I a 1 mL de glóbulos vermelhos aglomerados lavados para a eluição do anticorpo*. Misturar cuidadosamente. Centrifugar imediatamente durante 45 a 60 segundos a 900-1000 rcf. Misturar em excesso ou não centrifugar imediatamente poderá resultar em hemólise, alterando o pH do eluato.
- Transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio limpo. Eliminar os glóbulos. Adicionar 5 gotas de Solução II para tamponar o eluato*. Misturar bem. Continuar a adicionar Solução II gota a gota, misturando bem cada gota até surgir uma cor azul distintiva. A cor azul indica uma gama de pH de ~6,5-7,5.

*NOTA: Este procedimento baseia-se num volume de amostra recomendado de 1 mL de glóbulos vermelhos aglomerados. No entanto, podem utilizar-se volumes inferiores se a relação proporcional entre os glóbulos aglomerados e a Solução I ELU KIT™ PLUS se mantiver. A utilização de um volume de glóbulos aglomerados inferior a 1 mL resultará num volume final de eluato inferior para a realização de testes.

- Centrifugar o eluato para eliminar detritos celulares.
- Transferir o eluato clarificado para um tubo de ensaio limpo e rotulado. O eluato está pronto a ser testado.

Se não for imediatamente testado, o eluato poderá ser conservado entre 1 e 10 °C durante até sete dias e testado, caso não se observe turvação durante a conservação. Deverá observar-se uma reactividade óptima com eluatos que se encontrem dentro da gama de pH de 6,5 a 7,5.

II TESTAR O ELUATO ATRAVÉS DO TESTE DE ANTIGLOBULINA MODIFICADA

Podem utilizar-se glóbulos vermelhos reagentes comerciais, ou amostras de doentes ou de doadores como glóbulos de teste. Se forem utilizadas amostras de doentes ou de doadores, lavar os glóbulos, pelo menos, três vezes em solução salina isotónica antes de preparar a suspensão de glóbulos. É necessário lavar exaustivamente os glóbulos de teste, uma vez que o método de teste de antiglobulina modificada elimina a fase de lavagem do teste de antiglobulina.

Se se suspeitar de um teste de antiglobulina directo positivo induzido por fármacos, poderá ser necessário efectuar mais testes com o eluato, comparando-o com glóbulos sensibilizados com o fármaco, para avaliar a recuperação do anticorpo.

- Preparar um botão de glóbulos vermelhos "seco" para testes do seguinte modo:
Adicionar uma gota de uma suspensão de glóbulos de 3 a 5% a um tubo de ensaio limpo e rotulado. Adicionar 5 a 10 gotas de solução salina isotónica. Centrifugar a 900-1000 rcf durante, pelo menos, 30 segundos. Decantar completamente a solução salina sobrenadante para garantir a eliminação de toda a solução salina residual, resultando num botão de glóbulos vermelhos "seco".
- Adicionar duas gotas de eluato ao botão de glóbulos vermelhos "seco".
NOTA: Se se observar um teste de antiglobulina directo com os glóbulos sensibilizados, poderão ser utilizadas 3 a 4 gotas de eluato para aumentar a sensibilidade do teste.
Não adicionar albumina bovina ou outros potenciadores.
- Misturar bem e incubar a 37 °C (±1 °C) durante 15 minutos.
- Após a incubação, adicionar 5 a 10 gotas da solução de lavagem de trabalho a cada tubo. Centrifugar a 900-1000 rcf durante, pelo menos, 30 segundos. Decantar completamente a solução de lavagem sobrenadante para garantir a eliminação de toda a lavagem residual, resultando num botão de glóbulos vermelhos "seco".
- Adicionar duas gotas de globulina anti-humana (consultar as Indicações de utilização do fabricante apropriadas para a Globulina anti-humana).
- Misturar cuidadosa, mas exaustivamente, o conteúdo de cada tubo para ressuspender os botões de glóbulos vermelhos.
- Centrifugar os tubos durante:
 - 15 segundos a 900-1000 rcf
 - ou centrifugação com força equivalente*

* *NOTA: a força centrífuga aplicada deve ser a mínima necessária para produzir um sobrenadante transparente e um botão de glóbulos vermelhos nitidamente delineados que possam ser facilmente ressuspensos. Não é possível recomendar uma única velocidade ou tempo de centrifugação para todos os tipos de centrífugas ou aplicações de teste disponíveis. As centrífugas devem ser calibradas individualmente para determinar o tempo e velocidade ideais para obter os resultados pretendidos.*

- Ressuspender com cuidado o botão de glóbulos vermelhos e examinar a existência de aglutinação. Classificar e registar os resultados.

NOTA: Recomenda-se a utilização de um microscópio ou auxiliar óptico apenas para a confirmação de reacções de hemaglutinação negativas ou fracas.

- Os resultados do teste de antiglobulina negativos ou positivos fracos deverão ser adequadamente controlados adicionando glóbulos de controlo reagentes sensibilizados com IgG (consultar Controlos).

CONTROLOS

- É necessário efectuar testes com a solução de lavagem reservada ("Última lavagem" - consultar o Procedimento de eluição, Parte I, Passo 4) para garantir que o anticorpo detectado no eluato foi libertado a partir de um estado ligado e não se trata de um anticorpo "livre" residual que tenha permanecido após uma lavagem inadequada. Se o teste de controlo da "última lavagem" for positivo, a eluição deverá ser repetida utilizando solução de lavagem fria, com cuidado para lavar rápida e exaustivamente.
- A aplicação de glóbulos de controlo reagentes sensibilizados com IgG para ajudar a confirmar a validade dos resultados de testes de antiglobulina negativos é um teste de controlo essencial para os procedimentos que incluam uma fase de teste de antiglobulina (consulte as Indicações de utilização do fabricante relevantes para glóbulos de controlo sensibilizados com IgG).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES TESTES DO ELUATO:

Positivo (+): aglutinação
Negativo (-): sem aglutinação

Teste inválido: ausência de reacção dos glóbulos sensibilizados com IgG quando adicionados a testes negativos.
Teste inválido: a "Última lavagem" reservada demonstra resultados positivos.

A aglutinação de glóbulos testados em comparação com o eluato e a ausência de aglutinação dos testes de controlo da "Última lavagem" reservada indicam que o anticorpo serologicamente detectável foi recuperado dos glóbulos sensibilizados. A ausência de aglutinação indica que não foi recuperado qualquer anticorpo serologicamente detectável ou que o anticorpo recuperado talvez não demonstre especificidade de um grupo sanguíneo.

LIMITES DO PROCEDIMENTO DE TESTE

A actividade do eluato limita-se ao seguinte:

- A quantidade inicial de anticorpo ligado aos glóbulos vermelhos sensibilizados.
- O grau de dissociação do anticorpo ocorrido durante o procedimento de lavagem. Em raras ocasiões, registou-se a ocorrência de absorção não específica de anticorpos de alta potência; este fenómeno registou-se como estando associado à utilização combinada da solução de lavagem de baixa força iónica na presença de um anticorpo em soro fortemente reactivo. Neste caso, poderá ocorrer um potencial resultado de eluato falso-positivo⁴.
- Os glóbulos conservados durante mais de 72 horas poderão resultar em níveis inferiores de anticorpo recuperado e na reactividade mais reduzida do eluato resultante. Adicionalmente, a utilização de amostras conservadas poderá resultar em eluatos corados com hemoglobina e na dificuldade em ajustar o pH final do eluato à gama necessária para os testes.
- O grau a que a imunoglobulina é desnaturada pelo pH baixo durante a dissociação (que se prevê que seja mínimo se o procedimento for efectuado conforme recomendado).
- Podem ocorrer resultados falso-positivos resultantes da contaminação do eluato com anticorpo não ligado devido à lavagem inadequada dos glóbulos vermelhos na Parte I, Passo 4 do procedimento de eluição.
- Podem ocorrer testes falso-negativos se as suspensões de glóbulos vermelhos para teste não forem suficientemente lavadas antes da incubação com o eluato, ou se o sistema de teste ficar de algum modo contaminado com proteína humana, além do anticorpo recuperado durante a fase de eluição.
- A incapacidade de ajustar o pH à gama adequada poderá resultar na hemólise dos glóbulos de teste. Adicionalmente, a actividade do anticorpo recuperado poderá ser adversamente afectada pela variação de pH acima ou abaixo da gama ideal.
- O excesso de diluição do eluato devido à adição incorrecta de volume dos componentes do ELU KIT™ PLUS ou à adição de quantidades excessivas de reagentes durante o ajuste da gama de pH do eluato poderá resultar em resultados enfraquecidos ou falso-negativos.
- É pouco provável que os procedimentos de eluição efectuados em glóbulos vermelhos que tenham sido sensibilizados apenas com complemento apresentem eluatos reactivos.
- Os glóbulos vermelhos utilizados em estudos de eluição não podem ser utilizados em fenotipagem.
- Outras variáveis de teste, tais como uma técnica inadequada, uma centrifugação ou incubação indevida, vidros incorrectamente lavados e/ou materiais contaminados poderão originar resultados falso-negativos ou falso-positivos.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Quando utilizado segundo o método recomendado descrito, o ELU KIT™ PLUS demonstra resultados satisfatórios na preparação de eluatos a partir de glóbulos vermelhos sensibilizados *in vitro* com uma gama de anticorpos IgG de diferentes especificidades.

Não existem padrões de potência para este produto.

BIBLIOGRAFIA

- Technical Manual. 13th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1999.
- Rekvig OP, Hannestad K. Acid Elution of Blood Group Antibodies From Intact Erythrocytes. *Vox Sang* 1977; 33:280.
- 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.
- Leger RM, Arndt PA, Ciesielski DJ, Garratty G. False-positive eluate reactivity due to the low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. *Transfusion* 1998; 38:565-572.

PRODUTO	CÓDIGO DO PRODUTO	TAMANHO
ELU KIT™ PLUS Red Cell Elution System	5800073	Kit de teste

 ANTES DE UTILIZAR O PRODUTO, VERIFIQUE O NÚMERO DA INSTRUÇÃO DE USO E A VERSÃO CORRESPONDENTE NA EMBALAGEM DO PRODUTO.

Para obter as instruções de uso em formato impresso, sem custo adicional, contactar o serviço de atendimento ao consumidor através do SAC 0800-707-3855 ou através do email fresenius.br@fresenius-kabi.com.

Importado / Distribuído por:

Fresenius HemoCare Brasil Ltda.

Rua Roque González, n.º 128 - Jardim Branco Flora
Itapeverica da Serra - São Paulo - Brasil

CEP.: 06855-690

Farm. Res: Mary M. Yamauchi - CRF-SP 13.956

SAC: 0800-707-385

[DBL-26 Revisto 04/2015]