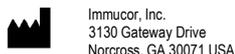


Freeze Dried Papain

Enzima proteolítica para uso sorológico

- IVD
- 10°C Rx ONLY
- Sem conservantes
- Sem padrão de potência nos EUA
- Rejeitar se apresentar turvação NÃO CONGELAR



Immucor, Inc.
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30071 USA

EC REP

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich, GERMANY

IFU 315ptbr-8

Utilização:

Enzima proteolítica para utilização sorológica

O reagente Freeze Dried Papain da Immucor é usado como uma enzima proteolítica em testes sorológicos.

Sumário do Teste:

A aplicação de enzimas proteolíticas em procedimentos imunohematológicos foi descrita pela primeira vez por Morton e Pickles, em 1951.¹ Em seus estudos foi utilizada a tripsina. Este trabalho foi rapidamente seguido por relatórios da utilização de papaína,^{2, 3} (1955), ficina (1957)⁴ e bromelinas (1959). Foi observado por estes investigadores, e por posteriores, que a utilização de enzimas aumenta a reatividade de alguns anticorpos, principalmente os dos sistemas Rhesus, Lewis, Kidd e do grupo sanguíneo P. O uso de enzimas proteolíticas permite a detecção de exemplos de anticorpos fracos nos sistemas Rhesus e Kidd, não demonstráveis por outros métodos convencionais. Concomitante à potenciação seletiva, as enzimas inibem a detecção de anticorpos dos outros sistemas de grupos sanguíneos, especialmente os sistemas Lutheran, MN e Duffy. Estas características fazem com que as enzimas sejam valiosas ferramentas suplementares na detecção e identificação de anticorpos. Dado que as enzimas inibem a detecção de alguns anticorpos, devem apenas ser usadas em conjunto com outros métodos de detecção de anticorpos.

Princípio do Teste:

O reagente Freeze Dried Papain é concebido para ser usado em procedimentos de uma fase (direto) e de duas fases (indireto). Pode ser utilizado como método adicional em procedimentos de detecção e identificação de anticorpos, testes de compatibilidade, procedimentos de adsorção de anticorpos e titulações. No procedimento de uma fase (direto), a enzima é misturada diretamente com os glóbulos vermelhos e o soro de teste. Na técnica de duas fases (indireto), os glóbulos vermelhos de teste são pré-tratados com a enzima, lavados para retirar a enzima livre e, em seguida, incubados com o soro de teste. Em ambos os métodos, o teste pode ser convertido para o teste de antiglobulina. Se o soro for incubado com papaína e com outros enzimas por um período de tempo suficientemente prolongado, as moléculas de imunoglobulina podem ser clivadas.⁶ Neste caso, e como seria de esperar, os métodos de uma fase (diretos) podem ser menos sensíveis em detectar anticorpos, com baixa concentração, do que as técnicas de duas fases (indiretas).⁷

Reagentes:

O reagente Freeze Dried Papain é uma enzima proteolítica derivada de *Carica papaya*. Foi filtrada e liofilizada. O reagente Freeze Dried Papain deve ser reconstituído com soro fisiológico, antes da utilização. Ver no rótulo do frasco do reagente, o volume para reconstituição. Fabricado para a Immucor, Inc.

Precauções:

Não congelar

Rejeitar se apresentar turvação

Legenda:

Sublinhado = adição ou alteração significativa; ▲ = eliminação de texto

Freeze Dried Papain

Enzima proteolítica para uso sorológico

Antes de utilizar o produto verifique se a versão desta Instrução de Uso corresponde à versão informada na embalagem do produto. Para obter as Instruções de Uso também em formato impresso, sem custo adicional, contatar o Serviço de Atendimento ao Consumidor através do SAC 0800-707-3855 ou através do e-mail fresenius.br@fresenius-kabi.com

Conservar o reagente Freeze Dried Papain e a solução Freeze Dried Papain reconstituída a 1-10 °C. Não congelar. Não utilizar após o prazo de validade. Não utilizar para após 48 horas da reconstituição ou em caso de existência de turvação.

Para utilização em diagnóstico in vitro.

O formato para a data de validade é AAAA-MM-DD (ano-mês-dia).

Coleta e Preparação da Amostra:

Amostra do soro:

Coletar uma amostra de sangue utilizando uma técnica de flebotomia correta. Os testes devem ser realizados logo que possível após a coleta para minimizar a possibilidade de ocorrerem reações falsamente positivas ou falsamente negativas, devido a armazenamento impróprio ou à contaminação da amostra. O soro que não for testado no prazo de 24 horas, deve ser armazenado a 1-10 °C, logo que possível. Como alternativa, o soro pode ser separado dos glóbulos vermelhos e congelado. Os anticorpos fracamente negativos podem deteriorar-se e tornarem-se indetectáveis em amostras conservadas à temperatura ambiente durante vários dias, antes da execução do teste, ou em amostras armazenadas por períodos de tempo prolongados, a 1-10 °C. As amostras que são armazenadas inadequadamente, perdem a reatividade do anticorpo. As amostras mantidas à temperatura ambiente durante 48 horas, podem perder a atividade do complemento. Não utilizar amostras coletadas em tubos com separadores de gel neutro. Podem ocorrer resultados positivos falsos com tais amostras.

Amostras de glóbulos vermelhos:

As amostras de glóbulos vermelhos do paciente ou dador podem ser coletadas em ACD, CPD, CPDA-1, EDTA ou sem anticoagulante. Os segmentos das unidades de sangue coletadas em soluções de anticoagulante/conservante aprovadas pela FDA podem ser testados até à data de validade da unidade. Se os Reagentes de Glóbulos Vermelhos são usados com esta enzima, seguir as instruções do fabricante dos glóbulos vermelhos para a utilização em métodos enzimáticos

Procedimento:

Materiais Fornecidos:

O reagente Freeze Dried Papain da Immucor é comercializado na forma liofilizada, em frasco próprio para reconstituição e armazenamento. Reconstituir com soro fisiológico isotônico, antes da utilização. Ver no rótulo do frasco do reagente, o volume para reconstituição. Misturar completamente, mas de forma suave, após o material estar em solução.

Outros Materiais Necessários:

1. Amostra de glóbulos vermelhos a ser tratada
2. Soro fisiológico isotônico
3. Tubos de teste 10 ou 12 x 75 mm e um suporte de tubos de teste
4. Pipetas
5. Centrífuga com capacidade para desenvolver uma Força de Centrifugação Relativa (RCF) de 900-1000 x g ou, em opção, um sistema de lavagem celular automático
6. Banho de água ou estufa a 37 °C.
7. Antiglobulina Humana contendo anti-IgG (se for executado o teste da antiglobulina)
8. Glóbulos vermelho de controle de antiglobulina sensibilizados com IgG (por exemplo, Checkcell da Immucor).
9. Cronômetro
10. Caneta Marcador

Método de Teste:

MÉTODO DE UMA FASE (DIRETO)

1. Rotular um tubo para tratamento com a enzima.
2. Colocar no tubo 2 gotas de soro, 1 gota de suspensão de glóbulos vermelhos, a 2-5%, em soro fisiológico e 2 gotas de solução de Freeze Dried Papain reconstituída. Misturar completamente.

3. Incubar a mistura à temperatura ambiente (18-30 °C), durante aproximadamente 5 minutos.

Nota: Pode ocorrer alguma descoloração dos glóbulos vermelhos.

4. Centrifugar o tubo*.

5. Examinar o sobrenadante, para verificar a existência de hemólise. Suspender suavemente o botão de glóbulos vermelhos e verificar a existência de aglutinação. Registrar os resultados.

6. Incubar a 36-38°C durante, aproximadamente 15 minutos.

7. Centrifugar*.

8. Examinar o sobrenadante e verificar a existência de hemólise. Suspender suavemente o botão de glóbulos vermelhos e verificar a existência de aglutinação. Registrar os resultados.

9. O teste pode ser agora convertido para o teste de antiglobulina.

MÉTODO DE DUAS FASES (INDIRETO)

1ª fase: Pré-tratamento dos glóbulos vermelhos

1. Rotular tubos para o pré-tratamento com enzima.

2. Colocar em cada tubo, um volume de solução Freeze Dried Papain reconstituída e dez volumes de uma suspensão a 5% dos glóbulos vermelhos respetivos, em soro fisiológico. Misturar completamente.

3. Incubar a 36-38°C, durante aproximadamente 10 minutos.

4. Lavar os glóbulos vermelhos, pelo menos três vezes, com soro fisiológico.

5. Reconstituir os glóbulos vermelhos a uma suspensão de 2-5% com soro fisiológico.

2ª fase: Teste

1. Rotular os tubos adequadamente.

2. Colocar em cada tubo, 2 gotas do soro a testar e uma gota duma suspensão a 2-5% de glóbulos vermelhos pré tratados, em soro fisiológico. Misturar completamente.

3. Incubar à temperatura ambiente (18-30°C) durante cinco minutos. (Fase de teste opcional.)

4. Centrifugar*.

5. Examinar o sobrenadante e verificar a existência de hemólise. Suspender suavemente o botão de glóbulos vermelhos e verificar a existência de aglutinação. Registrar os resultados.

6. Incubar a 36-38°C durante, aproximadamente 15 minutos.

7. Centrifugar*.

8. Examinar o sobrenadante e verificar a existência de hemólise. Suspender suavemente o botão de glóbulos vermelhos e verificar a existência de aglutinação. Registrar os resultados.

9. O teste pode agora ser convertido num teste de antiglobulina.

FASE ANTIGLOBULINA (COOMBS) (SEGUIDA DE INCUBAÇÃO A 37 °C)

1. Lavar os glóbulos vermelhos com soro fisiológico, pelo menos três vezes, tendo o cuidado de decantar completamente, após a última lavagem.

2. Adicionar Antiglobulina Humana aos tubos de teste, de acordo com as instruções do fabricante.

3. Centrifugar de acordo com as indicações do fabricante da Antiglobulina Humana.

4. Suspender suavemente os botões de glóbulos vermelhos e verificar a existência de aglutinação. Registrar os resultados.

5. Todos os testes negativos ou fracamente positivos devem ser controlados com glóbulos de controle de antiglobulina sensibilizados por IgG.

*Tempo de centrifugação sugerido: 15-30 segundos a 900-1000 x g. Uma centrifugação excessiva pode causar uma aderência do botão de glóbulos às paredes do tubo, requerendo uma agitação vigorosa para a suspensão das células. Isto pode fazer com que as reações fracas se dispersem e sejam interpretadas como falso-negativas. Uma centrifugação inadequada, que resulte na ausência de formação de um sobrenadante translúcido e de um botão de glóbulos vermelhos claramente delineado, pode também causar resultados fracamente positivos ou negativos. Assim, é recomendado, que seja utilizada a centrifugação mínima requerida, para produzir um botão de glóbulos vermelhos claramente delineado e um sobrenadante translúcido.

Controle de Qualidade:

Controle autólogo (autocontrole):

Um controle autólogo (glóbulos vermelhos e soro do paciente/doador) deve ser sempre executado em todos os testes, uma vez que as autoaglutininas reativas a frio são potencializadas por enzimas proteolíticas, como a papaina.ª

Legenda:

Sublinhado = adição ou alteração significativa;▲ = eliminação de texto

Controle para tratamento enzimático:

Sempre que os glóbulos vermelhos são tratados com uma enzima, deve ser incluído um controle para tratamento enzimático. Pode ser usado reagente anti-D humano, ou um único paciente-dador, a uma diluição tal que, a reatividade à temperatura ambiente, seja apenas verificada com glóbulos vermelhos tratados com enzima. O soro anti-D diluído deve ser testado pelo método enzimático (direto ou indireto), que esteja sendo utilizado, contra glóbulos vermelhos D-positivo e D-negativo conhecidos.

Interpretação dos Resultados:

Os resultados devem ser interpretados imediatamente, após a finalização do teste.

Positivo – Aglutinação e/ou hemólise indica a presença de anticorpo(s) irregular(es). A identificação do(s) anticorpo(s) pode ser feita usando o Panocell da Immucor.

Negativo – A não existência de aglutinação e/ou hemólise indica a ausência de anticorpos detectáveis contra os antígenos presentes nos glóbulos vermelhos.

Método de Adsorção Sugerido para o Tratamento de Glóbulos Vermelhos:

1. Lavar um volume suficiente de glóbulos vermelhos com soro fisiológico, pelo menos três vezes, ou até o sobrenadante do fluido de lavagem se apresentar translúcido. Remover completamente o sobrenadante, após a última lavagem.

2. Para cada mL de glóbulos vermelhos utilizado, adicionar 2 gotas de Freeze Dried Papain reconstituída. Misturar completamente.

3. Incubar à temperatura ambiente (18-30°C), durante aproximadamente, 10 minutos.

4. Lavar os glóbulos vermelhos tratados com enzimas com solução salina, pelo menos, três vezes, tendo o cuidado de remover totalmente o sobrenadante após cada lavagem.

5. Os glóbulos vermelhos tratados com enzima estão agora prontos a ser usados, em procedimentos de adsorção.

Limitações:

O Freeze Dried Papain inibe a detecção de anticorpos nos sistemas Duffy e MN, portanto deve ser usado preferencialmente como uma técnica suplementar, não levando à exclusão de outras técnicas não enzimáticas.ª

Se o soro é incubado com papaina por um período de tempo suficientemente prolongado, as moléculas de imunoglobulina podem ser clivadas. Por esta razão, o método de uma fase (direto) pode ser menos sensível, do que o método de duas fases (indireto).

Alguns soros normais contêm uma hemolisina quente, dirigida aos glóbulos vermelhos tratados com papaina.9,10 O anticorpo não afeta a sobrevivência dos glóbulos vermelhos *in vivo*, mas pode interferir no teste.

Alguns testes falso-positivos, podem resultar de contaminação bacteriana, de autoaglutininas reativas a frio, de tratamento excessivo dos glóbulos vermelhos e de uma centrifugação inadequada. Os resultados falso-negativos podem resultar de centrifugação em excesso, de armazenamento incorreto do Freeze Dried Papain ou do uso da solução reconstituída de Freeze Dried Papain após 48 horas de reconstituição.

Características Específicas de Desempenho:

A reatividade e especificidade do Freeze Dried Papain (FDP) são confirmadas por testes sorológicos. São utilizados nestes testes, anticorpos representativos com especificidades conhecidas, por serem potenciadas ou inibidas pelos métodos enzimáticos. O desempenho deste produto depende da aplicação dos métodos recomendados nos folhetos informativos. Para obter mais informações ou apoio técnico, contate a Immucor pelo telefone 855-IMMUCOR (466-8267).

Bibliografia:

1. Morton JA and Pickles MM. The proteolytic enzyme test in the detection of incomplete antibodies, J Clin Path 1951;4:189.
2. Goldsmith K. Papain-treated red cells in the detection of incomplete antibodies. Lancet 1955;:76.
3. Low B. A practical method using papain and incomplete Rh-antibodies in routine Rh blood-grouping. Vox Sang (OS) 1955;5:94.
4. Haber G, Rosenfield RE. Ficin treated red cells for hemagglutination studies. PH Andresen, Papers in dedication of his 60th birthday, Munksgaard, Copenhagen;1957:45
5. Pirofsky B, Mangum MEJ. Use of bromelain to demonstrate erythrocyte antibodies. Proc Soc Exp Bio (NY) 1959;101:49.
6. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine, 9th ed. Oxford:Blackwell Scientific, 1993.
7. Kissmyer-Nielson F. The serology of 123 anti-E and 55 anti-c antibodies. Sangre (Barcelona) 1964;9:221.
8. Brecher ME.ed. Technical manual 14th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002.
9. Bell CA, Zwicker H, Nevius DB. Non-specific warm hemolysins of papain-treated cells; Serologic characterization and transfusion risk. Transfusion 1973;13: 207.
10. Issitt PD, Anstee DJ. Applied blood group serology. 4th ed. Durham, NC: Montgomery Scientific Publications, 1998.



Código do folheto informativo 315ptbr-8
Rev 3/17

Registrado e Distribuído no Brasil por:

Fresenius Hemocare Brasil Ltda.

Rua Roque Gonzáles, 128, Jd. Branca Flor,

06855-690, Itapeverica da Serra, Brasil

CNPJ: 49.601107/0001-84

Responsável Técnica: Mary M. Yamauchi - CRF/SP 13.956

Registro MS: 10154450186

SAC 0800-707-3855

Legenda:

Sublinhado = adição ou alteração significativa; ▲ = eliminação de texto