



# LORNE LABORATORIES LTD.

## GREAT BRITAIN

### KIT DE ELUIÇÃO ÁCIDA

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

**RED CELL ELUTE - Para eluição ácida de anticorpos de hemácias intactas.**



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

PARA OBTER AS INSTRUÇÕES DE USO EM FORMATO IMPRESSO, SEM CUSTO ADICIONAL, CONTATAR O SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR: SAC (21) 3907-2534 / [sac@kovalent.com.br](mailto:sac@kovalent.com.br)

### SUMÁRIO

Anticorpos adsorvidos em hemácias, tanto *in vivo* ou *in vitro*, podem ser dissociados e recuperados através da eluição. O eluato pode então ser utilizado para identificar um anticorpo específico em soros contendo anticorpos multiespecíficos, demonstrar a presença de um antígeno de baixa frequência, identificar o anticorpo responsável pelo resultado positivo do teste de antiglobulina direta na anemia hemolítica auto-imune ou em reações transfusionais, identificar os anticorpos causadores da doença hemolítica do recém-nascido ou obter anticorpos específicos a partir de soros contendo anticorpos indesejáveis.

### PRINCÍPIO

Anticorpos não adsorvidos às hemácias sensibilizadas são removidos através de lavagens com uma solução que impede a perda dos anticorpos adsorvidos nas hemácias. Após a lavagem, o complexo antígeno-anticorpo é quebrado pela adição de uma solução de baixo pH. O eluato recuperado é ajustado para o pH  $7.0 \pm 0.5$  pela adição de uma solução tampão (ver limitações).

### DESCRIÇÃO DO KIT

Lorne Red Cell Elute é um kit de eluição ácida. O Kit consiste em uma solução de lavagem concentrada, que é usada para minimizar a dissociação dos anticorpos durante a lavagem, uma solução de eluição ácida, que é um tampão de glicina de baixo pH contendo um corante (indicador de pH) e uma solução tampão, solução de Tris (hidroximetilaminometano) contendo albumina bovina. Todas as soluções são fornecidas na diluição específica para o uso, seguida de todas as recomendações técnicas sem a necessidade de diluição ou adição, exceto a solução de lavagem concentrada. O número de referência do lote e a data de vencimento estão impressos nos rótulos dos frascos.

### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Não congelar. Os frascos originais devem ser armazenados de 2-25°C. O armazenamento prolongado a temperaturas fora das especificações pode resultar em perda acelerada de reatividade.

### COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue podem ser colhidas através das técnicas convencionais de flebotomia. Quando utilizado na coleta da amostra o anticoagulante preferido é o EDTA. Caso ocorra a demora para a execução do teste, armazenar as amostras a 2-8°C. A utilização de células com mais de 72 horas pode render menos anticorpos e alterar o pH do eluato final.

### PRECAUÇÕES

1. O reagente é somente para uso em diagnóstico *in vitro*.
2. Se o frasco estiver rachado ou vazando, descartar o conteúdo imediatamente.
3. Não utilizar reagentes fora da data de vencimento (ver etiquetas).
4. Não utilizar os reagentes se houver presença de precipitados.
5. Durante a manipulação dos reagentes, deve-se utilizar equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas descartáveis e jalecos.
6. O reagente foi purificado através de um filtro de 0.2 µm para reduzir a carga biológica. Uma vez que o frasco for aberto, o conteúdo permanece viável até a data de vencimento, desde que não haja nenhuma turbidez que indique contaminação ou deterioração.
7. A solução de lavagem possui azida sódica (0,1%) que é classificada pelas Diretrizes aplicáveis da comunidade Européia (CE) como nocivo (Xn). A azida sódica pode ser tóxica se ingerida e pode reagir com tubulações de cobre formando azidas explosivas. No descarte utilizar água em abundância.
8. Nenhum teste pode garantir que produtos derivados de fontes animais ou humanas estejam livres de agentes infecciosos, portanto, todo cuidado deve ser tomado no manuseio e descarte de cada frasco e de seu conteúdo.

### DESCARTE DO REAGENTE E MEDIDAS DE CONTROLE DE DERRAMAMENTO

Para informação de descarte dos reagentes do kit e descontaminação em derramamentos, consultar a ficha de segurança do kit que pode ser disponibilizada quando requerido.

### CONTROLES E AVISOS

1. O ensaio realizado com solução de lavagem certificará que os anticorpos detectados no eluato são provenientes da membrana das hemácias e não anticorpos dissociados remanescentes de uma lavagem inadequada. Se os controles são positivos, a eluição deve ser repetida usando solução de lavagem fria. Tomando cuidado para lavar rápida e cuidadosamente.
2. As técnicas de antiglobulina podem ser consideradas válidas somente se todos os testes negativos reagirem positivamente com hemácias sensibilizadas por IgG.
3. Nas Técnicas Recomendadas um volume corresponde a aproximadamente 50 µl, quando usado o conta-gotas fornecido com o frasco.
4. O uso dos reagentes e a interpretação dos resultados devem ser realizados por pessoal treinado e qualificado, de acordo com os requerimentos do país onde o reagente está sendo usado. O usuário deve determinar a adequação do reagente para o uso em outras técnicas.

### COMPONENTES DO KIT FORNECIDO

- Solução de Eluição Ácida 1 x 10 mL (solução 1);
- Solução Tampão 1 x 10 mL (solução 2);
- Solução de Lavagem Concentrada 2 x 25 mL;
- Frasco de Solução de Lavagem.

### REAGENTES E MATERIAL NECESSÁRIO

- Anti-globulina humana, Lorne Polyspecific AHG Elite;
- Água destilada ou deionizada;
- Tubos de ensaio de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Kit Red Cell Elute,
- Hemácias sensibilizadas por IgG,
- Tampão salina fosfato (PBS) - pH 6.8-7.2 ou Solução Fisiológica 0,9% - pH 6.5-7.5.
- Centrífuga para tubos;
- Pipetas volumétricas;
- Banho-maria ou estufa de calor seco à 37°C ± 2°C.

### PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LAVAGEM

1. Coloque o conteúdo de um frasco da Solução de Lavagem Concentrada (25 mL) no frasco de solução de lavagem fornecido.
2. Adicione água destilada ou desionizada até a marca no frasco (250 mL) e homogeneize bem.
3. A solução de lavagem está pronta para uso e pode ser armazenada por até seis meses à 2-8°C caso não seja observada turbidez.
4. O uso da solução de lavagem a baixas temperaturas irá minimizar a dissociação de anticorpos durante a fase de lavagem do procedimento.

### TESTE DAS HEMÁCIAS ANTES DA ELUIÇÃO

1. Realizar um teste de antiglobulina direta sobre a amostra de hemácias a serem testadas e registre os resultados.
2. Caso o teste de antiglobulina direta seja positivo existe a presença de anticorpos ligados às hemácias, devido à sensibilização *in vivo* ou *in vitro*.
3. Para determinar se a sensibilização é devida a imunoglobulinas ou ao complemento, teste a amostra com o anti-IgG e anti-C3d.
4. Se a amostra apresentar resultado positivo para o teste anti-IgG, o resultado de antiglobulina direta positivo é devido a imunoglobulinas, sendo a eluição realizada para remover e identificar anticorpos presentes.
5. Se a amostra apresentar um resultado positivo para o teste anti-C3d, então o resultado de antiglobulina direta positivo é devido ao complemento e uma eluição não deve ser realizada porque irá falhar em demonstrar a atividade de anticorpos.
6. Quanto mais intenso for o resultado do teste de antiglobulina direta, maior quantidade de anticorpos serão eluídos da superfície das hemácias.

### TÉCNICA DE ELUIÇÃO RECOMENDADA

1. Pegar 2mL da amostra de hemácias a serem testadas, lavar uma vez em solução fisiológica 0,9% tomando cuidado para decantar completamente a salina após a lavagem.
2. Lave as hemácias quatro vezes com a Solução de Lavagem para remoção de qualquer anticorpo não adsorvido às hemácias, certificando-se completamente de decantar a solução de lavagem após cada lavagem.
3. Reserve uma pequena alíquota do sobrenadante da última lavagem, o qual posteriormente será utilizado para testar a atividade dos anticorpos.
4. Coloque em um tubo de ensaio identificado: 1 ml das hemácias lavadas e adicione 1 ml da solução 1 para eluir os anticorpos.
5. Misture bem e centrifugue o tubo por 60 segundos a 1000 FCR (força centrífuga relativa) ou por um tempo e força alternativos adequados.
6. Transferir o sobrenadante (eluato) para um tubo limpo e descartar as células.
7. Adicionar no eluato a Solução 2, gota a gota, misturando bem após cada gota, até aparecer a cor azul. A cor azul indica que a mistura está em uma faixa de pH de 6,5 a 7,5 indicando que o eluato foi tamponado para o pH correto.
8. Para testar o eluato veja abaixo. O eluato pode ser armazenado por até 7 dias à temperatura de 2-8 ° C.

- Armazenamento inadequado de materiais ou negligência no uso dos reagentes;
- Descumprimento das técnicas recomendadas.

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

1. O Kit tem sido caracterizado por todos do procedimentos mencionados nas **Técnicas Recomendadas**.
2. Antes do lançamento, cada lote de Lorne Red Cell-Eluite foi testado de acordo com as **Técnicas Recomendadas** e sido demonstrado pelo eluato uma ampla gama de anticorpos IgG de hemácias sensibilizadas.
3. O kit está em conformidade com as recomendações contidas na última edição da Guidelines for the UK Blood Transfusion Services.

## GARANTIA

1. O usuário é responsável pela performance do Kit caso utilizado qualquer outro meio que não os mencionados nas **Técnicas Recomendadas**.
2. Qualquer desvio das **Técnicas Recomendadas** deve ser validado antes da sua utilização.

## SELEÇÃO DAS HEMÁCIAS PARA TESTE DE ELUIÇÃO

1. A escolha das hemácias utilizadas no teste contra o eluato é de responsabilidade de cada Laboratório.
2. Hemácias comerciais a 3% podem ser utilizadas.
3. Amostras de hemácias de doadores ou pacientes também podem ser utilizadas, desde que sejam lavadas ao menos por 3 vezes em solução fisiológica isotônica e em seguida ressuspendidas a 3% antes do uso.
4. Se há suspeita de anemia hemolítica induzida por droga então o eluato deve ser testado utilizando as hemácias sensibilizadas com a droga em questão.

## TESTE DO ELUATO

1. Coloque em um tubo de ensaio identificado: 2 volumes \* do eluato e 1 volume de hemácias teste.
2. Misture bem e incube a 37 °C por 15 minutos.
3. Após a incubação, adicione 10 gotas da Solução de Lavagem.
4. Misture bem e centrifugue todos os tubos por 30 segundos a 1000 FCR ou por um tempo e força alternativos adequados.
5. Decantar a solução e, em seguida, adicionar duas gotas de anti-globulina humana.
6. Misture bem e centrifugue por 20 segundos de 900-1000 RCF.
7. Ressuspender as células e fazer leitura da aglutinação. Registrar os resultados.
8. Validar todas as reações negativas utilizando hemácias sensibilizadas com IgG (vide CONTROLES E AVISOS).

\*Caso o teste da antiglobulina direta tenha obtido um resultado muito baixo (2+ ou menor), podem ser utilizadas de 3 a 4 volumes do eluato para aumentar a sensibilidade do teste.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. **Positivo:** a aglutinação das hemácias teste constitui um resultado positivo do teste, e dentro dos limites admitidos no procedimento, indica que um ou mais anticorpos foram recuperados a partir das hemácias sensibilizadas.
2. **Negativo:** a ausência de aglutinação das hemácias teste constitui um resultado negativo do teste, e dentro dos limites admitidos no procedimento, indica que nenhum anticorpo foi recuperado a partir das hemácias sensibilizadas.








## LIMITAÇÕES

1. A atividade do eluato é limitada pela quantidade de anticorpos adsorvidos às hemácias, pela quantidade de dissociação de anticorpos durante o procedimento de lavagem e pelo grau de desnaturação dos anticorpos pelo baixo pH durante a dissociação.
2. A contaminação do eluato por anticorpos não adsorvidos devido à lavagem inadequada das hemácias durante o processo de eluição pode limitar a atividade do eluato.
3. Uma falha em ajustar o pH à faixa adequada pode resultar em hemólise.
4. A diluição excessiva do eluato pode ocorrer pela adição de quantidades excessivas de reagentes durante o ajuste do pH do eluato.
5. Hemácias utilizadas em estudos de eluição não devem ser utilizadas para fenotipagem.
6. Resultados falso-positivos ou falso-negativos também podem ocorrer devido a:
  - Contaminação de materiais utilizados no teste;
  - Concentração inadequada de células;
  - Tempo ou temperatura de incubação incorretos;
  - Centrifugação excessiva ou inadequada;

## BIBLIOGRAFIA

1. Rekvig OP, Hannestad K. Acid Elution of Blood Group Antibodies from Intact Erythrocytes. Vox Sang 1977; 33:280.
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. Widmann FK. Ed. Arlington. VA: American Association of Blood Banks 1985:235.
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
5. 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.

## QUADRO DE SÍMBOLOS

 REF	Numero do catálogo		Prazo de validade
 IVD	Para diagnóstico in vitro	 LOT	Número de lote
	Fabricante	 i	Ler as Instruções de Uso
	Conservar a		

## INFORMAÇÕES AO CONSUMIDOR

Fabricado por:  
**Lorne Laboratories Ltda**  
 Unit 1 Danehill  
 Cutbush Park Industrial Estate  
 Lower Earley  
 READING  
 Berks, RG6 4UT  
 United Kingdom

Importado e Distribuído por:  
**Kovalent do Brasil Ltda.**  
 Rua Cristóvão Sardinha, 110 – Jd. Bom Retiro  
 São Gonçalo – RJ – CEP 24722-350  
 www.kovalent.com.br  
 CNPJ: 04.842.199/0001-56  
 Farm. Resp.: Jorge A. Janoni CRF: 2648-RJ  
 MS: 80115310128  
**SAC: sac@kovalent.com.br - (21) 3907-2534**