

AHG (COELHO) MISTURADA, POLIESPECÍFICA, ANTI-IGG E ANTI-C3D INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

AHG Elite (Clear) ou AHG Elite (Green): Para técnicas de antiglobulina.

RESUMO

Em 1945, Coombs, Mourant e Race descreveram a utilização de soro AHG para a detecção de anticorpos não aglutinantes ligados a hemácias. Em 1957, Dacie et al demonstraram que os anticorpos presentes em soros antiglobulina eram dirigidos contra determinados componentes do complemento. Os reagentes AHG detetam moléculas de anticorpos não aglutinantes, bem como moléculas de complemento ligadas a hemácias após reações antigénio-anticorpo *in vivo* ou *in vitro*.

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Estes reagentes são reagentes de determinação do grupo sanguíneo, poliespecíficos, destinados a serem utilizados para detetar qualitativamente a presença ou ausência de anticorpos IgG sensibilizantes (todas as 4 subclasses) e fatores de complemento C3d e C3b em hemácias humanas, quando testadas em conformidade com as técnicas recomendadas nestas Instruções de utilização.

PRINCÍPIO

Os reagentes contêm anticorpos contra anticorpos IgG humanos e fatores de complemento C3 (C3d e C3b) em hemácias humanas, e provocam a aglutinação (agregação) direta de hemácias que estejam sensibilizadas com anticorpos IgG humanos e/ou fatores de complemento C3 (C3d e C3b). A não ocorrência de aglutinação (ausência de agrupamento) indica, geralmente, a ausência de anticorpos IgG humanos sensibilizantes e fatores de complemento C3 (C3d e C3b) em hemácias humanas (consulte **LIMITAÇÕES**).

REAGENTES

Os reagentes Lorne AHG Elite Clear e AHG Elite Green contêm anticorpos anti-IgG derivados de coelhos com atividade não específica removida por adsorção e anticorpos IgM monoclonais de rato anti-C3d, clone BRIC-8. Os anticorpos estão diluídos numa solução tamponada contendo albumina bovina. Os reagentes não contêm nem consistem em substâncias cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução (CMR), substâncias passíveis de causarem a desregulação do sistema endócrino nem substâncias passíveis de causarem sensibilização ou uma reação alérgica no utilizador. Cada reagente é fornecido na diluição ideal para utilização com todas as técnicas recomendadas indicadas abaixo, sem necessidade de diluição ou acréscimo adicional. Para obter informações sobre o número de referência do lote e o prazo de validade, consulte o **rótulo do frasco**.

Reagente	Linha/clone celular	Cor	Corante utilizado
AHG Elite Clear	IgG anti-humana de coelho BRIC-8 (Anti-C3d)	Incolor	Nenhum
AHG Elite Green	IgG anti-humana de coelho BRIC-8 (Anti-C3d)	Verde	Azul patenteado e tartrazina

CONSERVAÇÃO

Após receção, os frascos de reagente devem ser armazenados a 2–8 °C. O armazenamento prolongado a temperaturas fora deste intervalo pode resultar em perda acelerada de reatividade do reagente. Este reagente foi submetido a estudos de estabilidade durante o transporte a 37 °C e –25 °C, conforme descrito no documento BS EN ISO 23640:2015.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras devem ser colhidas de forma assética em EDTA, de modo a evitar a ligação do complemento *in vitro*, e testadas logo que possível. Caso não esteja disponível EDTA, as amostras colhidas em ACD, CPD ou CPDA-1 são preferíveis às coaguladas. Se apenas estiverem disponíveis amostras coaguladas, não as refrigere antes do teste.

PRECAUÇÕES

- Os reagentes destinam-se apenas a utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Se um frasco de reagente estiver partido ou apresentar fugas, elimine o conteúdo imediatamente.
- Não utilize os reagentes após o prazo de validade (consulte o **rótulo do frasco**).
- Não utilize os reagentes se estiver presente precipitado.
- Ao manusear reagentes deve utilizar-se vestuário de proteção, como luvas descartáveis e uma bata de laboratório.
- Os reagentes foram filtrados através de uma cápsula de 0,2 µm para reduzir a carga biológica, mas não são fornecidos estéreis. Quando um frasco é aberto, o conteúdo do mesmo deverá manter-se viável até ao fim

do prazo de validade, desde que não exista turvação acentuada, a qual pode indicar deterioração ou contaminação do reagente.

- Os reagentes contêm <0,1% de azida de sódio. A azida de sódio pode ser tóxica se ingerida e pode reagir com tubagens de chumbo e cobre, formando azidas metálicas explosivas. Aquando da eliminação, enxague com grandes volumes de água.
- Os materiais utilizados para produzir os produtos foram testados na origem e demonstraram ser negativos para anticorpos contra o VIH 1, VIH 2 e VHC, bem como para HBsAg, utilizando testes microbiológicos aprovados.
- Nenhum teste conhecido pode garantir que os produtos de origem humana ou animal estão isentos de agentes infecciosos. Deve ter-se cuidado na utilização e eliminação de cada frasco e respetivo conteúdo.

ELIMINAÇÃO DO REAGENTE E CONTROLO DE DERRAMES

Para obter informações sobre a eliminação dos reagentes e a descontaminação de um derrame, consulte a **Ficha de Dados de Segurança de Materiais**, disponível mediante pedido.

CONTROLOS E RECOMENDAÇÕES

- Um controlo positivo (anti-D fraco <0,1 UI/ml) e um controlo negativo (um soro inerte) devem ser testados em paralelo com cada lote de testes. Os testes devem ser considerados inválidos se os controlos não apresentarem os resultados esperados.
- As técnicas de antiglobulina apenas podem ser consideradas válidas se todos os testes negativos reagirem positivamente com hemácias sensibilizadas com IgG.
- Antes da utilização, deixe o reagente aquecer até à temperatura ambiente. Assim que o reagente tiver sido utilizado, volte a armazená-lo a 2–8 °C.
- Nas **Técnicas recomendadas**, um volume corresponde a cerca de 50 µl quando é utilizado o conta-gotas do frasco fornecido.
- A utilização dos reagentes e a interpretação dos resultados devem ser realizadas por pessoal qualificado e com a devida formação, em conformidade com os requisitos em vigor no país onde os reagentes são utilizados. O utilizador tem de determinar a adequabilidade dos reagentes para utilização com outras técnicas.

REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Agente de lavagem de células Coombs.
- Tubos de teste de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Hemácias sensibilizadas com IgG, p. ex., Lorne Coombs Control Cells (número de catálogo: 970010).
- Anticorpos inertes, p. ex., Lorne Inert AB Serum (número de catálogo: 110010).
- Solução de baixa força iónica (LISS): com 0,03 M de NaCl, 0,003 M de Na₂HPO₄; tampão NaH₂PO₄ com pH 6,7 a 22 °C ± 1 °C e 0,24 M de glicina.
- Solução PBS (pH 6,8–7,2) ou solução salina isotónica (pH 6,5–7,5).
- Pipetas volumétricas.
- Banho-maria ou incubadora de calor seco calibrada para 37 °C ± 2 °C.
- Anticorpos anti-D fracos, p. ex., Lorne Precise Weak Anti-D (número de catálogo: 209005).

TÉCNICAS RECOMENDADAS

A. Técnica de antiglobulina direta (TAD)

- Lave 1 volume de hemácias (suspensão a 2–3% em solução salina tamponada com fosfato [PBS] ou solução salina isotónica) 4 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica, tendo o cuidado de decantar a solução salina entre lavagens e de ressuspender cada botão de células após cada lavagem. Decante completamente a solução salina após a última lavagem.
- Adicione 2 volumes de Lorne AHG Elite a cada botão de células secas.
- Misture bem e, em seguida, centrifugue todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (força centrífuga relativa) ou utilizando um período de tempo e uma força alternativos adequados.
- Com cuidado, proceda à ressuspensão do botão de hemácias e leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.

B. Técnica de antiglobulina indireta (NISS IAT)

- Prepare uma suspensão a 2–3% de hemácias em solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica.
- Coloque num tubo de teste rotulado: 2 volumes de soro de teste e 1 volume de suspensão de hemácias.
- Misture bem e incube a 37 °C durante 15 minutos.
- Lave as hemácias 4 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica, tendo o cuidado de decantar a solução salina entre lavagens e de ressuspender cada botão de hemácias após

- cada lavagem. Decante completamente a solução salina após a última lavagem.
- Adicione 2 volumes de Lorne AHG Elite a cada botão de células secas.
 - Misture bem e, em seguida, centrifugue todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (força centrífuga relativa) ou utilizando um período de tempo e uma força alternativos adequados.
 - Com cuidado, proceda à ressuspensão do botão de hemácias e leia macroscopicamente para detecção de aglutinação.

C. Técnica de antiglobulina indireta em LISS (LISS IAT)

- Prepare uma suspensão a 1,5–2% de hemácias em LISS.
- Coloque num tubo de teste rotulado: 2 volumes de soro de teste e 2 volumes de suspensão de hemácias.
- Misture bem e incube a 37 °C durante 15 minutos.
- Siga os passos 4 a 7 da técnica NISS IAT acima.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE TESTE

- Positivo:** a aglutinação de hemácias constitui um resultado de teste positivo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando a presença de IgG e/ou complemento (C3d/C3b) nas hemácias.
- Negativo:** a não ocorrência de aglutinação das hemácias constitui um resultado negativo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando a ausência de IgG e/ou complemento (C3d/C3b) nas hemácias.

ESTABILIDADE DAS REAÇÕES

- Os passos de lavagem devem ser realizados sem interrupções e os testes devem ser centrifugados e lidos imediatamente após a adição do reagente. Os atrasos podem resultar na dissociação de complexos antígeno-anticorpo, causando resultados negativos falsos ou fracos positivos.
- Deve ter-se precaução na interpretação dos resultados de testes realizados a temperaturas que não as **recomendadas**.

LIMITAÇÕES

- Hemácias com um teste de antiglobulina direta (TAD) positivo devido a um revestimento de IgG não podem ser submetidas a tipagem pela **técnica de antiglobulina indireta**.
- Um teste de antiglobulina direta (TAD) positivo devido a sensibilização do complemento pode não refletir a fixação do complemento *in vivo* se as células de teste forem de uma amostra coagulada refrigerada.
- A lavagem inadequada de hemácias na técnica de antiglobulina indireta pode neutralizar o reagente AHG.
- Após a conclusão da fase de lavagem, a solução salina residual em excesso pode diluir o reagente AHG Elite, reduzindo a potência do mesmo.
- Um teste de antiglobulina direta negativo não exclui necessariamente o diagnóstico clínico de doença hemolítica do recém-nascido ABO ou de anemia hemolítica autoimune. Também não exclui necessariamente a doença hemolítica do recém-nascido, especialmente em caso de suspeita de incompatibilidade ABO.
- Também podem ocorrer resultados positivos falsos ou negativos falsos devido a:
 - Contaminação dos materiais de teste
 - Conservação, concentração de células, tempo de incubação ou temperatura inadequados
 - Centrifugação inadequada ou excessiva

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

- Antes da libertação, cada lote destes reagentes foi testado utilizando os métodos de teste recomendados indicados nestas Instruções de utilização, comparativamente com hemácias revestidas com anti-D, anti-K e anti-Fy^a, de modo a verificar a reatividade adequada. Os testes cumpriram os requisitos de teste indicados na versão/edição atual das "Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom" (Linhas de Orientação para os Serviços de Transfusão de Sangue no Reino Unido).
- As potências dos reagentes anti-IgG e anti-C3d foram testadas comparativamente com o seguinte padrão de referência de potência mínima do Instituto Nacional de Padrões e Controlos Biológicos (NIBSC, National Institute of Biological Standards and Controls):
 - padrão de referência anti-AHG 96/666
- A potência do reagente anti-C3d é demonstrada em testes que utilizam células revestidas com C3d e C3b.
- A presença de aglutininas heteroespecíficas contaminantes ou de anticorpos contra o C4d foi excluída em testes que utilizaram hemácias de todos os grupos ABO e células revestidas com C4d.
- A reatividade de eventuais componentes anti-IgM, anti-IgA ou anti-cadeia leve, que poderão estar presentes, não foi comprovada.
- O controlo de qualidade dos reagentes foi realizado utilizando hemácias com fenótipos que foram verificados por um centro de transfusões de sangue no Reino Unido e tinham sido lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica antes da utilização.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE

- O utilizador é responsável pelo desempenho dos reagentes quando utilizados em qualquer outro método que não os mencionados em **Técnicas recomendadas**.
- Eventuais desvios relativamente às **Técnicas recomendadas** devem ser validados antes da utilização⁶.

BIBLIOGRAFIA

- Voak D, Downie DM, Moore BPL, and Engelfreit CP. Anti-Human Globulin reagent specification. The European and ISBT/ICSH View. Biotech Bulletin 1: 7-22 (1986).
- The Department of Health and Social Security. Health Services Management Antiglobulin Test. False negative results, HN (Hazard) (83) 625 Nov 1983.
- Bruce M, Watt AH, Hare W, Blue A, Mitchell R. A serious source of error in antiglobulin testing. Transfusion 1986; **26**: 177-181.
- Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in AHG (AHG) tests: optimum conditions and quality control. Haematologia 1988; **21**(1): 3-16.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
- 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.

APRESENTAÇÕES DISPONÍVEIS DO REAGENTE

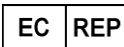
	Tamanho do frasco	Número de catálogo	Testes por frasco
Lorne AHG Elite (Clear)	10 ml	415010	100
Lorne AHG Elite (Green)	10 ml	435010	100

TABELA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Definição	Símbolo	Definição
	Fabricante		Número de catálogo
	Limitação de temperatura		Utilizar até AAAA-MM-DD
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Consultar as instruções de utilização
	Representante autorizado		Número de lote
	Símbolo CE verificado por um organismo notificado		



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
E-mail: info@lornelabs.com



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