



## KIT DE ELUIÇÃO ÁCIDA INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### Red Cell Elute: para eluição ácida de anticorpos de hemácias intactas.

#### RESUMO

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

#### UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Este kit destina-se a ser utilizado para dissociar (eluir) anticorpos do tipo IgG de hemácias humanas, utilizando um tampão de eluição ácida, e para ajustar subsequentemente a acidez do eluato utilizando um tampão alcalino para que os anticorpos IgG presentes no eluato possam ser identificados utilizando procedimentos de teste imuno-hematológicos.

#### PRINCÍPIO

Os anticorpos não adsorvidos presentes na amostra são removidos por lavagem com a solução de lavagem de trabalho. 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 alcalina (consulte Limitações). Para assegurar que o eluato apenas contém anticorpos ligados a hemácias, o sobrenadante da última lavagem de hemácias a serem eluídas tem de ser testado em paralelo com o eluato.

#### DESCRIÇÃO DO KIT

O kit Lorne Red Cell Elute é um kit de eluição ácida. O kit é constituído pela Solução de Lavagem Concentrada, que é utilizada para minimizar a dissociação de anticorpos durante a lavagem, a Solução de Eluição Ácida, que é um tampão de glicina

de baixo pH contendo um agente corante (indicador de pH) e a Solução Tampão Alcalina, uma solução de Tris (hidroximetilaminometano) contendo albumina bovina. O kit não contém nem consiste 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. Todas as soluções são fornecidas na diluição ideal para utilização com todas as técnicas recomendadas indicadas abaixo, sem necessidade de diluição ou acréscimo adicional, com exceção da Solução de Lavagem Concentrada. Para obter informações sobre o número de referência do lote e o prazo de validade, consulte o **rótulo do frasco**.

#### CONSERVAÇÃO

Não congele. Após receção, os frascos de reagente devem ser armazenados à temperatura ambiente. A conservação prolongada a temperaturas fora deste intervalo pode resultar em perda acelerada de atividade do reagente. Este reagente foi submetido a estudos de estabilidade durante o transporte a  $37^\circ\text{C}$  e  $-25^\circ\text{C}$ , conforme descrito no documento BS EN ISO 23640:2015.

#### COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras podem ser colhidas utilizando uma técnica de flebotomia asséptica. São preferidas as amostras anticoaguladas colhidas em EDTA. Se o teste for adiado, conserve as amostras a  $2-8^\circ\text{C}$ . A utilização de células colhidas há mais de 72 horas pode resultar na presença de menos anticorpos e alterar o pH do eluato final.

#### PRECAUÇÕES

1. O reagente destina-se apenas a utilização em diagnóstico *in vitro*.
2. Se um frasco estiver partido ou apresentar fugas, elimine o conteúdo imediatamente.
3. Não utilize o reagente após o prazo de validade (consulte o **rótulo do frasco**).
4. Não utilize o reagente se estiver presente precipitado.
5. Ao manusear o reagente deve utilizar-se vestuário de proteção, como luvas descartáveis e uma bata de laboratório.
6. Os reagentes foram filtrados através de uma cápsula de  $0,2\ \mu\text{m}$  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.
7. A solução de lavagem contém 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.

8. 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 de reagentes do kit e a descontaminação de um local afetado por um derrame, consulte a **Ficha de Dados de Segurança**, disponível mediante pedido.

#### CONTROLOS E RECOMENDAÇÕES

1. O teste de solução guardada da última lavagem confirmará que os anticorpos detetados no eluato são provenientes de um estado de ligação e não são anticorpos dissociados remanescentes de uma lavagem inadequada. Se os tubos de controlo forem positivos, a eluição deve ser repetida tendo o cuidado de lavar bem.
2. A técnica em tubo de antiglobulina apenas pode ser considerada válida se todos os testes negativos reagirem positivamente com hemácias sensibilizadas com IgG (células de controlo de Coomb).
3. Nas **Técnicas recomendadas**, um volume corresponde a cerca de 50  $\mu\text{l}$  quando é utilizado o conta-gotas do frasco fornecido.
4. A utilização do kit e a interpretação dos resultados devem ser realizadas por pessoal qualificado e com a devida formação, de acordo com os requisitos em vigor no país onde o kit é utilizado. O utilizador tem de determinar a adequabilidade do kit para utilização com outras técnicas.

#### COMPONENTES DO KIT FORNECIDOS

- Solução de Eluição Ácida 1 x 10 ml (Solução I).
- Solução Tampão Alcalina 1 x 10 ml (Solução II).
- Solução de Lavagem Concentrada 2 x 25 ml.
- Frasco de lavagem.

#### REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

##### Técnica em tubo

- Globulina anti-humana, isto é., Lorne AHG Elite (número de catálogo: 435010 ou 415010) ou IgG anti-humana, ou seja, Lorne Anti-Human IgG (número de catálogo: 402010 ou 401010).
- Agente de lavagem de células Coombs.
- Tubos de teste de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Solução PBS (pH 6,8-7,2) ou solução salina isotónica (pH 6,5-7,5).
- Hemácias sensibilizadas com IgG, ou seja, Lorne Coombs Control Cells (número de catálogo: 970010).
- Banho-maria ou incubadora de calor seco calibrada para  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

##### Técnica de microtipagem Bio-Rad-ID

- Bio-Rad ID-Cards (LISS/Coombs ou Coombs Anti-IgG).
- Bio-Rad ID-Centrífuge.
- Bio-Rad ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Bio-Rad ID-Incubator calibrada para  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

##### Técnica de tipagem Ortho BioVue

- Cassetes do Ortho BioVue System (AHG Polyspecific ou AHG Anti-IgG).
- Centrífugadora Ortho BioVue System.
- Bloco de aquecimento do Ortho BioVue System calibrado para  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Diluente de hemácias Ortho a 0,8%.

##### Todas as técnicas

- Pipetas volumétricas.

#### PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LAVAGEM DE TRABALHO

1. Despeje o conteúdo de 1 frasco de Solução de Lavagem Concentrada para o frasco de lavagem fornecido.
2. Adicione água destilada ou desionizada suficiente de boa qualidade para encher o frasco de lavagem até à linha de enchimento (250 ml) e misture bem.
3. A Solução de Lavagem de Trabalho está pronta a utilizar e pode ser armazenada a  $2-8^\circ\text{C}$  por um período máximo de seis meses e utilizada se não apresentar turvação.
4. A utilização de Solução de Lavagem de Trabalho fria minimizará a dissociação de anticorpos durante a fase de lavagem do procedimento.

## TESTE DA AMOSTRA DE HEMÁCIAS ANTES DA ELUIÇÃO

1. Proceda a um teste de antiglobulina direta com a amostra de hemácias a testar e registre os resultados.
2. Se a amostra apresentar um resultado positivo no teste de antiglobulina direta, então presentes anticorpos ligados nas hemácias, devido a sensibilização *in vivo* ou *in vitro*.
3. Para determinar se a sensibilização se deve a imunoglobulina ou ao complemento, teste a amostra comparativamente com anti-IgG e anti-C3d.
4. Se a amostra apresentar um resultado positivo com anti-IgG, então o teste de antiglobulina direta positivo deve-se a imunoglobulina e pode ser realizada uma eluição para remover e identificar os anticorpos presentes.
5. Se a amostra apresentar um resultado positivo com anti-C3d, então o teste de antiglobulina direta positivo deve-se ao complemento e a eluição não deve ser realizada, pois não conseguirá demonstrar atividade de anticorpos.
6. Quanto mais forte for o resultado do teste de antiglobulina direta, maior quantidade de anticorpos serão eluídos da superfície das hemácias.

## TÉCNICA DE ELUIÇÃO RECOMENDADA

1. Retire uma amostra de 2 ml das hemácias a testar e lave-as uma vez em solução salina isotônica, tendo o cuidado de decantar completamente a solução salina após a lavagem.
2. Lave as hemácias quatro vezes com a Solução de Lavagem de Trabalho para remover eventuais anticorpos não ligados.
3. Reserve uma pequena alíquota do sobrenadante da última lavagem, a qual será utilizada mais tarde para testar a atividade de anticorpos.
4. Certifique-se de que decanta completamente a solução de lavagem após cada lavagem.
5. Coloque num tubo de teste rotulado: 1 ml das hemácias lavadas sensibilizadas e adicione 1 ml da Solução 1 para eluir os anticorpos.
6. Misture bem e centrifugue o tubo durante 60 segundos a 1000 rcf (força centrífuga relativa) ou utilizando um período de tempo e uma força alternativos adequados.
7. Transfira o sobrenadante (eluato) para um tubo limpo e elimine as células.
8. Para a eluição, adicione a Solução II gota a gota, misturando bem após cada gota, até aparecer uma cor azul. A cor azul indica um intervalo de pH de 6,5–7,5 e significa que o eluato foi tamponado para o pH correto.
9. Se aparecerem precipitados, proceda à centrifugação durante 60 segundos a 1000 rcf ou utilizando um período de tempo e uma força alternativos adequados.
10. Para ensaiar o eluato consulte abaixo. O eluato pode ser armazenado por um período máximo de 7 dias a 2–8 °C.

## SELEÇÃO DE HEMÁCIAS PARA ELUIÇÃO/SOBRENADANTE DA ÚLTIMA LAVAGEM

1. A escolha das hemácias utilizadas no teste de comparação com o eluato depende de cada laboratório individual.
2. Podem ser utilizadas hemácias a 3–5% ou reagentes de hemácias a 0,8% disponíveis no mercado.
3. Também podem ser utilizadas amostras de hemácias de doentes ou dadores desde que sejam lavadas, pelo menos, 3 vezes em solução salina isotônica e, em seguida, suspensas a 3% ou 0,8% antes da utilização.
4. Em caso de suspeita de anemia hemolítica induzida por fármacos, o eluato deve ser testado comparativamente com células sensibilizadas com o fármaco em questão.

## TESTE DO ELUATO/SOBRENADANTE DA ÚLTIMA LAVAGEM

### A. Técnica de teste em tubo

1. Coloque num tubo de teste rotulado: 2 volumes\* de eluato ou sobrenadante da última lavagem e 1 volume de hemácias.
2. Misture bem e incube a 37 °C durante 15 minutos.
3. Após a incubação, adicione 10 gotas da Solução de Lavagem de Trabalho.
4. Misture bem e, em seguida, centrifugue todos os tubos durante 30 segundos a 1000 rcf (força centrífuga relativa) ou utilizando um período de tempo e uma força alternativos adequados.
5. Decante a solução e, em seguida, adicione duas gotas de globulina anti-humana.
6. Misture bem e centrifugue durante 20 segundos a 900–1000 rcf.
7. Volte a suspender as células e verifique a presença de aglutinação. Registre os resultados.
8. Confirme a validade de todas as reações negativas utilizando hemácias sensibilizadas com IgG (consulte **Controlos e Recomendações**).

\* Caso se observe um teste de antiglobulina direta fraco (2+ ou menos) com as células sensibilizadas, podem ser utilizadas 3–4 gotas de eluato para aumentar a sensibilidade do teste.

### B. Técnica de microtipagem Bio-Rad-ID

1. Prepare uma suspensão a 0,8% de hemácias lavadas em Bio-Rad ID-Diluent 2.
2. Remova a película de alumínio dos microtubos de cartão de gel necessários Bio-Rad LISS/Coombs ou Coombs Anti-IgG.
3. Coloque no microtubo apropriado: 50 µl de suspensão de hemácias e 25 µl de eluato.

4. Coloque num outro microtubo: 50 µl de suspensão de hemácias e 25 µl de sobrenadante da última lavagem.
5. Incube o(s) LISS/Coombs ID-Card(s) durante 15 minutos a 37 °C.
6. Centrifugue o(s) LISS/Coombs ID-Card(s) na Bio-Rad ID-Card Centrifuge.
7. Leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.

### C. Técnica de tipagem Ortho BioVue

1. Prepare uma suspensão a 0,8% de hemácias lavadas em Diluente de hemácias Ortho a 0,8%.
2. Remova a película de alumínio das câmaras de reação necessárias na cassette Ortho AHG Polyspecific ou AHG Anti-IgG.
3. Coloque na câmara de reação apropriada: 50 µl de suspensão de hemácias de teste e 40 µl de eluato.
4. Coloque numa outra câmara de reação: 50 µl de suspensão de hemácias e 40 µl de sobrenadante da última lavagem.
5. Incube a(s) cassette(s) durante 15 minutos a 37 °C.
6. Centrifugue a(s) cassette(s) numa centrifugadora Ortho BioVue System.
7. Leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. **Positivo:** a aglutinação de hemácias constitui um resultado de teste positivo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando que um ou mais anticorpos foram recuperados a partir das hemácias sensibilizadas.
2. **Negativo:** a não ocorrência de aglutinação de hemácias constitui um resultado negativo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando que nenhum anticorpo foi recuperado a partir das hemácias sensibilizadas.
3. Os resultados do sobrenadante da última lavagem têm de ser negativos. O teste deve ser repetido caso se obtenham resultados positivos.

## LIMITAÇÕES

1. A atividade do eluato é limitada pela quantidade de anticorpos ligados às hemácias, a quantidade de dissociação de anticorpos durante o procedimento de lavagem e o grau em que a imunoglobulina é desnaturada pelo baixo pH durante a dissociação.
2. A contaminação do eluato com anticorpos não ligados devido a lavagem inadequada das hemácias durante o procedimento de eluição pode limitar a atividade do eluato.
3. O não ajuste do pH para o intervalo adequado pode resultar em hemólise.
4. A diluição excessiva do eluato devido à adição de quantidades excessivas de Solução Tampão Alcalina ao ajustar o pH do eluato pode causar resultados mais fracos ou negativos falsos.
5. As hemácias utilizadas para estudos de eluição não devem ser utilizadas para fenotipagem.
6. Também podem ocorrer resultados positivos falsos ou negativos falsos devido a:
  - Contaminação dos materiais de teste
  - Concentração de células inadequada
  - Tempo ou temperatura de incubação inadequados
  - Centrifugação inadequada ou excessiva
  - Conservação incorreta dos materiais de teste ou omissão de reagentes
  - Desvio das técnicas recomendadas

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

1. O kit foi caracterizado por todos os procedimentos mencionados nas **Técnicas recomendadas**.
2. Antes da libertação, cada lote de Lorne Red Cell-Elute foi testado pelas **técnicas recomendadas** e demonstrou eluir uma ampla gama de anticorpos IgG de hemácias sensibilizadas.
3. O kit cumpre as recomendações contidas na edição mais recente das "Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom" (Linhas de Orientação para os Serviços de Transfusão de Sangue no Reino Unido).

## ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE

1. O utilizador é responsável pelo desempenho do kit quando utilizado em qualquer outro método que não os mencionados em **Técnicas recomendadas**.
2. Eventuais desvios relativamente às **Técnicas recomendadas** devem ser validados antes da utilização<sup>1</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

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, and G. Garratty. False-positive eluate reactivity due to the low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. *Transfusion* 1998; 38:565-572

#### APRESENTAÇÕES DISPONÍVEIS DO REAGENTE

	Apresentação	Número de catálogo
Red Cell Elute	10 testes/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  
E-mail: info@lornelabs.com

EC	REP	Advena Ltd. Tower Business Centre, 2 <sup>nd</sup> Fl., Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta
----	-----	--