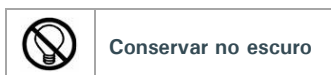


# Instructions for use



Sanquin Reagents B.V. Plesmanlaan 125 1066 CX Amsterdam The Netherlands	Phone: +31 20 5123599 Fax: +31 20 5123570 Reagents@sanquin.nl www.sanquin.org/reagents
<b>PeliStrip elution kit</b>	<b>REF K1398</b> <b>IVD CE</b>
054_v02 01/2017 (pt)	<i>Exclusivamente para uso profesional</i>

Kit para a eluição de anticorpos a partir dos eritrócitos



Conservar no escuro

## Informação geral

O PeliStrip elution kit é utilizado para uma eluição ácida rápida dos anticorpos a partir de eritrócitos intactos. Por exemplo, para identificar os anticorpos nos doentes com um TDA (teste directo de antiglobulina) positivo, ou para identificar anticorpos que sejam isolados a partir do soro ou do plasma, revestindo-os *in vitro* com eritrócitos seleccionados. O eluato pode ser testado sob a forma de soro ou plasma para detectar e identificar os anticorpos.

## Componentes do kit:

**Elution Solution 1: dois frascos (tampa branca) de 8 ml.** Conservar a 18-25 °C.

**Neutralisation Solution 2: um frasco (tampa preta) de 12 ml.** Este tampão de neutralização Tris contém BSA e está corado de azul para indicação do pH e para um reconhecimento fácil. Conservar a 18-25 °C no escuro.

## Precauções

Exclusivamente para o diagnóstico *in vitro*.

O kit deve ser armazenado a uma temperatura de 18-25 °C. A Neutralisation Solution 2 deve ser conservada no escuro. A conservação prolongada à luz pode resultar na descoloração da Neutralisation Solution 2. Se a cor da Neutralisation Solution 2 não for azul, a solução não deve ser utilizada.

A Neutralisation Solution 2 contém  $\text{NaN}_3$  a 0,1% (p/v) como conservante. Não congelar.

Apesar de a albumina de soro bovino ter sido testada para as doenças infecciosas e ter sido considerada negativa, o reagente não pode ser dado como isento de agentes infecciosos. A manipulação e a destruição de cada recipiente devem ser efectuadas com cuidado.

Não utilizar se as soluções estiverem turvas, pois tal pode indicar contaminação microbiana.

Os frascos danificados ou com fugas não podem ser usados.

O kit não deve ser utilizado para além do prazo de validade impresso no rótulo.

A manipulação e a eliminação de cada recipiente e respectivo conteúdo devem ser efectuadas com cuidado.

A eliminação de resíduos, depois de concluído o teste, deve ser efectuada de acordo com as regulamentações do seu laboratório.

## Colheita de amostras

As amostras de sangue devem ser colhidas assepticamente com a adição de anticoagulantes, de preferência EDTA. Caso o teste das amostras de sangue seja adiado, as amostras terão de ser conservadas a 2-8 °C, de preferência durante não mais de 72 horas.

## Método de teste

Os eritrócitos sensibilizados são lavados cuidadosamente com PBS ("phosphate buffered saline", soro fisiológico tamponado com fosfato) frio (2-8 °C), para lavar todas as proteínas não ligadas e para minimizar a dissociação dos anticorpos ligados às células.

As células lavadas são misturadas com a Elution Solution 1 para dissociar os anticorpos. Após a centrifugação, o eluato tem de ser neutralizado com a Neutralisation Solution 2.

## Procedimento do teste

Materiais necessários mas não fornecidos:

- *Requisitos para os tubos: tubos de vidro de fundo redondo; dimensões 75 x 10/12 mm.*
- *PBS (2-8 °C) frio.*

1. Centrifugue a amostra e retire tanto sobrenadante quanto possível.
2. Lave pelo menos 1 ml de concentrado de eritrócitos sensibilizados 5 vezes em PBS frio (2-8 °C) para remover qualquer anticorpo não ligado. A alíquota deve ser suficiente para produzir 1 ml de concentrado de células quando a lavagem estiver concluída. A última etapa de centrifugação deve ser a uma velocidade e tempo que resultem num concentrado de células, por ex. 5 minutos a 3000 g ou conforme o seu protocolo de laboratório.  
Guarde parte da última solução de lavagem para servir de controlo.
3. Utilize um tubo de teste em vidro, de 75 x 10/12 mm.  
Para resultados óptimos, é necessário trabalhar SEM DEMORA até à neutralização (etapa 6), mantendo o tempo de trabalho a um pH baixo tão curto quanto possível. Além disso, recomendamos que se trabalhe junto à centrífuga.  
Adicione 1 ml do concentrado de eritrócitos.  
Adicione 1 ml de Elution Solution 1 (tampa branca).  
Nota: Se houver menos de 1 ml de concentrado de eritrócitos disponível, o eluato pode ser preparado adicionando um volume igualmente reduzido de Elution Solution 1. Deve utilizar-se um mínimo de 500 µl de concentrado de eritrócitos, um volume menor pode originar resultados falsos.

4. IMEDIATAMENTE DEPOIS DE ADICIONAR A Elution Solution 1, agite o tubo cuidadosamente, invertendo 5 vezes. Centrifugue imediatamente durante 1 minuto a 1000 g ou durante um tempo e velocidade apropriados para a centrífuga formar um pellet de células e resíduos celulares.
5. TRANSFIRA DIRECTAMENTE o sobrenadante utilizando uma pipeta transparente (de vidro) para um tubo de teste em vidro (o pellet deve ser eliminado, as células já não podem ser utilizadas).
6. O eluato ácido TEM DE SER NEUTRALIZADO IMEDIATAMENTE adicionando Neutralisation Solution 2 (tampa preta) gota-a-gota até a cor azul permanecer após adicionar e misturar a gota. O aparecimento e persistência da cor azul indicam que o pH do eluato foi ajustado para o intervalo pretendido (6,6-7,4). O volume de Neutralisation Solution 2 necessário pode variar, dependendo de vários aspectos; o aspecto principal é o grau de hemólise dos eritrócitos antes da eluição ou devido à exposição durante um tempo prolongado a um pH baixo durante a eluição. Se o eluato ácido tiver a cor vermelha ou castanha devido à hemólise dos eritrócitos, irá ficar turbido em vez de azul devido através da adição de Neutralisation Solution 2.
7. Centrifugue durante pelo menos 1 minuto a > 1000 g para remover qualquer precipitado ou resíduo celular, ou durante um tempo e velocidade apropriados para a centrífuga formar um pellet de qualquer precipitado e resíduos celulares. Transfira o eluato utilizando uma pipeta transparente (de vidro) para um tubo de teste em vidro transparente.

O eluato está agora pronto para o teste de anticorpos na técnica de aglutinação indirecta com PEG. Os procedimentos alternativos para o teste de anticorpos devem ser validados pelo utilizador.

Utilizar o sobrenadante guardado da última lavagem como controlo. Se o teste não puder ser efectuado imediatamente, o eluato pode ser armazenado a 2-8°C, de preferência durante um período de até 72 horas, mas durante não mais de 7 dias. A turbidez pode indicar contaminação microbiana.

#### **Interpretação dos resultados**

Uma reacção positiva (por ex., aglutinação) do eluato indica que o eluato contém anticorpos de eritrócitos (eluídos dos eritrócitos originais) contra os antigénios presentes nos eritrócitos em teste.

Uma reacção negativa (isto é, sem aglutinação visível) do eluato indica que o eluato não contém anticorpos contra os antigénios presentes nos eritrócitos em teste.

Caso haja suspeita de anemia hemolítica induzida por fármacos, o eluato deve ser testado relativamente a células sensibilizadas com o fármaco apropriado.

#### **Limitações**

Uma reacção positiva (por ex., aglutinação) da solução de lavagem guardada pode indicar a presença de anticorpos devido a lavagem inadequada, o que pode interferir com a actividade dos anticorpos do eluato. Por conseguinte, o procedimento de eluição deve ser repetido após uma lavagem mais cuidadosa das células com PBS frio (2-8°C). No entanto, uma reacção positiva da solução de lavagem guardada também pode indicar a presença de anticorpos de baixa afinidade eluídos a partir das células durante o procedimento de lavagem.

Caso o eluato apresente uma reacção negativa (por ex., sem aglutinação visível) enquanto os dados clínicos indicam a presença de anticorpos revestidos, aconselha-se vivamente a utilização de um método de eluição alternativo.

As amostras de sangue com mais de 72 horas podem resultar em eluatos menos potentes do que os das amostras frescas.

A incubação prolongada na Elution Solution 1 pode causar a hemólise dos eritrócitos e a desnaturação dos anticorpos eluídos.

Podem ocorrer reacções falso-positivas ou falso-negativas devido a contaminação dos materiais de teste ou a qualquer desvio do procedimento do teste e outras técnicas recomendadas descritas nas Instruções de Utilização.

A troca da Elution Solution 1 e da Neutralisation Solution 2 irá resultar em reacções fracas ou falso-negativas.

#### **Referências**

1. Engelfriet C.P. et al.; Immunohaematology, Sanquin Blood Supply Foundation, 2003.
2. Issitt P.D.; Applied Blood Group Serology, 4th ed. Montgomery Scientific Publications, 1998.
3. Mollison P.L. et al.; Blood Transfusion in Clinical Medicine, 9<sup>th</sup> ed. 1993.
4. Rekvig O.P., Hannestad K., Vox Sang. 33: 280-285, 1977.
5. Leger R.M. et al.; Transfusion 38:565-572, 1998.

*Os produtos Sanquin têm garantia de desempenho conforme descrito nas instruções de utilização do fabricante original. É essencial uma adesão rigorosa aos procedimentos, configurações de teste, reagentes e equipamento recomendados. A Sanquin declina qualquer responsabilidade em caso de desvio em relação ao acima mencionado.*