

Determinación cualitativa de anti-Ig G y anti-C3d humanos en hematies

IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Utilizando las técnicas recomendadas, los reactivos reaccionarán con inmunoglobulina y/o complemento ligados a la superficies de los hematies, provocando la aglutinación de las células sensibilizadas adyacentes. Las células no sensibilizadas no aglutinarán (ver Limitaciones).

SIGNIFICADO CLÍNICO

En 1945 Coombs, Mourant y Race descubrieron el uso de la anti-globulina humana para la detección de anticuerpos no aglutinantes de los hematies. En 1957, Dacie y col. mostraron que los anticuerpos de un suero de anti-globulina eran directamente contra ciertos componentes del complemento. Los reactivos anti-globulina humana detectan tanto moléculas de anticuerpos no aglutinantes, como moléculas de complemento ligados a los hematies siguiendo reacciones antígeno-anticuerpo *in vivo* o *in vitro*.

REACTIVOS

Los reactivos Spinreact Anti-globulina humana poliespecífica contienen anti-IgG derivadas de conejo, cuya actividad inespecífica ha sido eliminada por absorción y IgM monoclonal de ratón anti-C3d, clon BRIC-8. Los anticuerpos son diluidos en una solución tamponada que contiene albúmina bovina. Cada reactivo es suministrado en la dilución óptima para su utilización en todas las técnicas aquí recomendadas sin necesidad de diluciones o adiciones suplementarias. Ver el lote y caducidad de cada referencia en la etiqueta del vial.

Reactivo	Color	Colorante utilizado
Antiglobulina humana verde	Verde	Tartracina y azul patentado

PRECAUCIONES

- Los reactivos son sólo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Si el vial del reactivo está roto o agrietado, descartar inmediatamente su contenido.
- No utilizar reactivos caducados. (ver la etiqueta de vial).
- No utilizar reactivos que presenten precipitados.
- La manipulación del reactivo debe realizarse con la apropiada indumentaria de protección, tales como guantes desechables y bata de laboratorio.
- Los reactivos han sido filtrados a través de cápsulas de 0.2 µm para reducir la carga biológica. Una vez abierto el vial, el contenido debe permanecer viable hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando no haya una marcada turbidez la cual podría ser indicativa de deterioración o contaminación del reactivo.
- Los reactivos contienen < 0.1% de azida sódica. La azida sódica puede ser tóxica, si se ingiere y puede reaccionar con cobre o plomo de las tuberías y formar azidas metálicas explosivas. En caso de eliminación del producto, hacerlo con abundante agua del grifo.
- Ningún método puede garantizar que los productos derivados de fuentes humanas o animales están libres de enfermedades infecciosas. Manipular y desechar con precaución los viales y su contenido.
- Para mayor información sobre la eliminación del producto o descontaminación en caso de derrame, ver las fichas de seguridad.

NOTAS

- Se recomienda la utilización de un control positivo (Anti-D débil 0.1 IU/mL) y un control negativo (suero inerte) para testar de forma paralela en cada lote de tests. Los tests deben considerarse inválidos si los controles no muestran los resultados esperados.
- Las técnicas anti-globulinas sólo pueden considerarse válidas si todos los tests negativos reaccionan positivamente con hematies sensibilizados con IgG.
- En las técnicas recomendadas un volumen es aproximadamente 40 µl utilizando el gotero suministrado.
- La utilización de los reactivos y la interpretación de los resultados deben llevarse a cabo por personal cualificado y formado de acuerdo a los requisitos del país donde los reactivos están siendo utilizados. El usuario debe determinar la idoneidad de los reactivos para otras técnicas.

CONSERVACIÓN

No congelar. Los viales de reactivo deben ser conservados a 2-8°C. Almacenamientos prolongados, a temperaturas fuera de este rango, pueden provocar una aceleración de la pérdida de reactividad.

MATERIAL NECESARIO

- Tubos de vidrio (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Centrífuga de tubos.
- Pipetas volumétricas.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0.9%, pH 7.0 ± 0.2 a 22°C ± 1°C.
- Hematies sensibilizados con IgG
- Suero de anticuerpo inerte.
- Anti-D débil.
- Baño caliente o incubador de calor seco equilibrado a 37°C ± 2°C.
- Lavador de células Coombs
- Solución lisante (LISS), ej.: REF de Spinreact. 1700080.

MUESTRAS

Las muestras deben tratarse asépticamente en EDTA para prevenir la unión *in vitro* del complemento y analizarse en 24 horas. En caso que el EDTA no esté disponible, es preferible muestras tratadas en ACD. CPD o CPDA-1, que muestras coaguladas. Si sólo se dispone de muestras coaguladas, no refrigerar antes de analizar. Todas las muestras de sangre deben ser lavadas con PBS al menos dos veces antes de realizar el test.

PROCEDIMIENTO

A. Técnica anti-globulina directa (DAT)

- Lavar 4 veces en PBS los hematies a testar, cuidando de decantar la solución salina entre lavados y resuspendiendo el botón celular tras cada lavado. Tras el último lavado, decantar completamente la solución salina.
- Añadir 2 volúmenes de anti-globulina humana a cada botón celular.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente por aglutinación.

B. Técnica anti-globulina indirecta (NISS IAT)

- Preparar una suspensión al 2-3% de hematies lavados en PBS.
- Depositar en un tubo identificado: 2 volúmenes del suero a testar y 1 volumen de la suspensión de hematies a testar.

- Mezclar minuciosamente e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- Lavar 4 veces los hematies en PBS cuidando de decantar la solución salina entre lavados y resuspendiendo el botón celular tras cada lavado. Tras el último lavado, decantar completamente la solución salina.
- Añadir 2 volúmenes de anti-globulina humana a cada botón celular.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente por aglutinación.
- Técnica anti-globulina indirecta LISS (LISS IAT)**
 - Preparar una suspensión al 1.5 - 2% de hematies a testar lavados en solución lisante.
 - Depositar en un tubo identificado: 2 volúmenes del suero a testar y 2 volúmenes de la suspensión de hematies a testar.
 - Mezclar minuciosamente e incubar a 37°C durante 15 minutos.
 - Seguir los pasos 4 a 7 de la técnica (NISS IAT)

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo:** La aglutinación de los hematies a testar constituye un resultado positivo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la presencia IgG y/o complemento (C3) en los hematies a testar.
- Negativo:** La ausencia de aglutinación de los hematies a testar constituye un resultado negativo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento de la técnica, indica la ausencia en hematies de IgG y/o complemento (C3) en los hematies a testar.

Estabilidad de las reacciones

- Las etapas de lavado deben completarse sin interrupción alguna y la centrifugación y lectura debe realizarse inmediatamente tras la adición del reactivo. Los retrasos pueden suponer la disociación de los complejos antígeno-anticuerpo, causando falsos negativos o resultados positivos débiles.
- Los resultados, de tests realizados a otras temperaturas de las aquí recomendadas, deben ser interpretados con cautela.

LIMITACIONES

- Los hematies que resultan positivos por DAT debido a un recubrimiento de IgG, no pueden ser tipados por las técnicas Anti-globulina Indirectas.
- Un DAT positivo por sensibilización con complemento puede no reflejar la fijación *in vivo* de complemento, si las células a atestar provienen de una muestra coagulada refrigerada.
- Lavados inadecuados en técnicas anti-globulina indirectas pueden neutralizar el reactivo anti-globulina humana.
- Tras completar la fase de lavado, el exceso de fase salina residual puede diluir la anti-globulina humana, reduciendo su potencia.
- Un resultado negativo por técnicas anti-globulina directa no excluye necesariamente un diagnóstico clínico del Síndrome hemolítico ABO del Recién Nacido o Anemia Hemolítica Autoinmune. Tampoco no descarta de HDN, especialmente si se sospecha de incompatibilidad ABO.
- Puede también ocurrir falsos resultados positivos o negativos debido a:
 - Contaminación de los materiales del test
 - Conservación inadecuada, concentración celular, tiempo o temperatura de incubación
 - Centrifugación inapropiada o excesiva
- El usuario es responsable del funcionamiento de los reactivos en cualquier otro método distinto de los mencionados aquí.
- Cualquier desviación de las técnicas, aquí detalladas, debería ser validada antes de su utilización⁹.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Los reactivos han sido caracterizados para todos los procedimientos aquí mencionados.
- Préviamente a su liberación, cada lote de Spinreact Anti-globulina humana es testado a través de las técnicas recomendadas frente a un panel de hematies Anti-D, Anti-K y Anti-Fy^a, a fin de comprobar la adecuada reactividad.
- La potencia anti-IgG y anti-C3d ha sido testada frente al estándar de referencia de potencia mínima, Anti-AHG 96/666, procedente del *National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC)*.
- La potencia anti-C3d está demostrada en tests que emplean células recubiertas con C3.
- La presencia de aglutininas contaminantes heteroespecíficas o de anticuerpos anti-C4d ha sido excluida en tests que emplean hematies de todos los grupos ABO y células recubiertas con C4.
- No se ha establecido la reactividad de cualquier Anti-IgM, Anti-IgA o Anti-componentes de cadena ligera, que pudieran estar presentes.
- El Control de Calidad de los reactivos se llevó a cabo utilizando hematies lavados dos veces en PBS, previa utilización.
- Los reactivos cumplen las recomendaciones de la última versión de las Guías para los Servicios de transfusión de sangre del Reino Unido.

BIBLIOGRAFÍA

- Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh antibodies. *Brit J Exp Pathol*. 1945; 26:255.
- Wright MS, Issitt PD. Anti-complement and the indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1979; 19:688-694.
- Howard JE, Winn LC, Gottlieb CE, Grumet FC, Garratty G, Petz LD. Clinical significance of the anti-complement components of anti-globulin antisera. *Transfusion* 1982; 22:269.
- Howell P, Giles CM. A detailed serological study of five anti-Jk^a sera reacting by the antiglobulin technique. *Vox Sang*. 1983; 45: 129-138.
- Issitt PD, Smith TR. Evaluation of antiglobulin reagents. A seminar on performance evaluation. Washington, DC. American Association of Blood Banks. 1976; 25-73.
- 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.
- The anti-complement reactivity low ionic methods as published by FDA. Recommended Methods for Anti-Human Globulin Evaluation (revision October 1984).
- Dynan PK. Evaluation of commercially available low ionic strength salt (LISS) solutions. *Med Lab Sci* (1981) 381: 13-20.
- Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in anti-human globulin (AHG) tests: optimum conditions and quality control. *Haematologia* 1988; 21(1): 3-16.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
- 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.

PRESENTACIÓN

Anti globulina humana (Coombs)	Ref: 1700051	10 ml
--------------------------------	--------------	-------

Qualitative test for determination of human anti-Ig G and anti-C3d on red blood cells.

IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

When used by the recommended techniques, the reagents will react with immunoglobulins and/or complement attached to the red cell surface, resulting in agglutination (clumping) of adjacent sensitised cells. Cells not sensitised will not be agglutinated (See **Limitations**).

CLINICAL SIGNIFICANCE

In 1945, Coombs, Mourant and Race described the use of anti-human globulin serum for detecting red cell-bound non-agglutinating antibodies. In 1957, Dacie et al showed that the antibodies present in antiglobulin sera were directed against certain components of complement. Anti-human globulin reagents detect non-agglutinating antibody molecules as well as molecules of complement attached to red cells following *in vivo* or *in vitro* antigen-antibody reactions.

REAGENTS

Spinreact Polyspecific Anti-Human Globulin Elite Clear and Anti-Human Globulin Elite Green reagents contain anti-IgG derived from rabbits with non-specific activity removed by absorption and mouse monoclonal IgM anti-C3d, Clone BRIC-8. The antibodies are diluted in a buffered solution containing bovine albumin. Each reagent is supplied at optimal dilution, for use with all the recommended techniques stated below without need for further dilution or addition. For lot reference number and expiry date see **Vial Label**.

Reagent	Colour	Dye Used
Anti-Human Globulin Green	Green	Patent Blue and Tartrazine

PRECAUTIONS

- The reagents are intended for *in vitro* diagnostic use only.
- If a reagent vial is cracked or leaking, discard the contents immediately.
- Do not use the reagents past the expiration date (see **Vial Label**).
- Do not use the reagents if a precipitate is present.
- Protective clothing should be worn when handling the reagents, such as disposable gloves and a laboratory coat.
- The reagents have been filtered through a 0.2 µm capsule to reduce the bio-burden. Once a vial has been opened the contents should remain viable up until the expiry date as long as there is no marked turbidity, which can indicate reagent deterioration or contamination.
- The reagents contain < 0.1% sodium azide. Sodium azide may be toxic if ingested and may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal flush away with large volumes of water.
- No known tests can guarantee that products derived from human or animal sources are free from infectious agents. Care must be taken in the use and disposal of each vial and its contents.
- For information on disposal of the reagent and decontamination of a spillage site see **Material Safety Data Sheets**, available on request.

NOTES

- It is recommended a positive control (weak Anti-D 0.1 IU/ml) and a negative control (an inert serum) be test in parallel with each batch of tests. Tests must be considered invalid if controls do not show expected results.
- The antiglobulin techniques can only be considered valid if all negative tests react positively with IgG sensitised red cells.
- In the techniques, here mentioned, one volume is approximately 40µl when using the vial dropper provided.
- Use of the reagents and the interpretation of results must be carried out by properly trained and qualified personnel in accordance with requirements of the country where the reagents are in use. User must determine the suitability of the reagents for use in other techniques.

STORAGE

Do not freeze. Reagent vials should be stored at 2 - 8°C on receipt. Prolonged storage at temperatures outside this range may result in accelerated loss of reagent reactivity.

MATERIAL REQUIRED

- Glass test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- Test tube centrifuge.
- Volumetric pipettes.
- Phosphate Buffered Saline (PBS): NaCl 0.9%, pH 7.0 ± 0.2 at 22°C ± 1°C.
- IgG sensitised red cells.
- Inert antibody Serum.
- Weak anti-D.
- Water bath or dry heat incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Coombs cell washer.
- Low Ionic Strength Solution (LISS), i.e.: Spinreact's REF. 1700080.

SAMPLE

Samples should be drawn aseptically into EDTA to prevent *in vitro* complement binding and tested within 24 hours. If EDTA is unavailable, samples drawn into ACD, CPD or CPDA-1 are preferable to clotted ones. If only clotted samples are available, do not refrigerate them before testing. All blood samples should be washed at least twice with PBS before being tested.

PROCEDURE

A. Direct Antiglobulin Technique (DAT)

- Wash test red cells 4 times with PBS, taking care to decant saline between washes and resuspend each cell button after each wash. Completely decant saline after last wash.
- Add 2 volumes of Anti-Human Globulin to each dry cell button.
- Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
- Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination

B. Indirect Antiglobulin Technique (NISS IAT)

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in a labelled test tube: 2 volumes of test serum and 1 volume of test red cell suspension.
- Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
- Wash test red cells 4 times with PBS, taking care to decant saline between washes and resuspend each red cell button after each wash. Completely decant saline after last wash.
- Add 2 volumes of Anti-Human Globulin to each dry cell button.
- Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
- Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination

C. LISS Indirect Antiglobulin Technique (LISS IAT)

- Prepare a 1.5-2% suspension of washed test red cells in LISS.
- Place in a labelled test tube: 2 volumes of test serum and 2 volumes of test red cell suspension.
- Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
- Follow steps 4 to 7 of **NISS IAT** above.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

Positive: Agglutination of test red cells constitutes a positive test result and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the presence of IgG and/or complement (C3) on the test red cells.

Negative: No agglutination of the test red cells constitutes a negative result and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the absence of IgG and/or complement (C3) on the test red cells.

Stability of the reactions

- Washing steps should be completed without interruption and tests centrifuged and read immediately after addition of the reagent. Delays may result in dissociation of antigen-antibody complexes, causing false negative or weak positive results.
- Caution should be exercised in the interpretation of results of tests performed at temperatures other than those **recommended**.

LIMITATIONS

- Red cells that have a positive DAT due to a coating of IgG cannot be typed by the **Indirect Antiglobulin Techniques**.
- A positive DAT due to complement sensitisation may not reflect *in vivo* complement fixation if test cells are from a refrigerated clotted specimen.
- Inadequate washing of red cells in the indirect antiglobulin techniques may neutralise the anti-human globulin reagent.
- Following completion of the wash phase excess residual saline may dilute the anti-human globulin, reducing its potency.
- A negative direct antiglobulin test result does not necessarily preclude clinical diagnosis of ABO Haemolytic Disease of the Newborn or Auto Immune Haemolytic Anaemia. It also does not necessarily rule out HDN, especially if ABO incompatibility is suspected. False positive or false negative results may also occur due to:
 - Contamination of test materials
 - Improper storage, cell concentration, incubation time or temperature
 - Improper or excessive centrifugation
- The user is responsible for the performance of the reagents by any method other than those here mentioned.
- Any deviations from the techniques here recommended should be validated prior to use.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- The reagents have been characterised by all the procedures here described.
- Prior to release, each lot of Spinreact's Anti-Human Globulin is tested, by the techniques here mentioned, against red cells coated with Anti-D, Anti-K and Anti-Fy^a to check suitable reactivity.
- The anti-IgG and anti-C3d potencies have been tested against the following minimum potency reference standard obtained from National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC): Anti-AHG reference standard 96/666
- Anti-C3d potency is demonstrated in tests employing cells coated with C3.
- The presence of contaminating heterospecific agglutinins or antibodies to C4d has been excluded in tests employing red cells of all ABO groups and cells coated with C4d.
- The reactivity of any Anti-IgM, Anti-IgA or Anti-light chain components that might be present has not been established.
- The Quality Control of the reagents was performed using red cells that had been washed twice with PBS prior to use.
- The reagents comply with the recommendations contained in the latest issue of the Guidelines for the UK Blood Transfusion Services.

BIBLIOGRAPHY

- Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh antibodies. *Brit J Exp Pathol.* 1945; 26:255.
- Wright MS, Issitt PD. Anti-complement and the indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1979; 19:688-694.
- Howard JE, Winn LC, Gottlieb CE, Grumet FC, Garratty G, Petz LD. Clinical significance of the anti-complement components of anti-globulin antisera. *Transfusion* 1982; 22:269.
- Howell P, Giles CM. A detailed serological study of five anti-Jk^a sera reacting by the antiglobulin technique. *Vox Sang.* 1983; 45: 129-138.
- Issitt PD, Smith TR. Evaluation of antiglobulin reagents. A seminar on performance evaluation. Washington, DC. American Association of Blood Banks. 1976; 25-73.
- 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.
- The anti-complement reactivity low ionic methods as published by FDA. Recommended Methods for Anti-Human Globulin Evaluation (revision October 1984).
- Dynan PK. Evaluation of commercially available low ionic strength salt (LISS) solutions. *Med Lab Sci* (1981) 381: 13-20.
- Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelbreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in anti-human globulin (AHG) tests: optimum conditions and quality control. *Haematologia* 1988; 21(1): 3-16.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
- 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.

PACKAGING

Anti - human Globulin (Coombs)	Ref: 1700051	10 ml
--------------------------------	--------------	-------

Détermination qualitative de l'anti-Ig G et l'anti-C3d humains dans les hématies

IVD

A conserver à 2-8°C.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

En utilisant les techniques recommandées, les réactifs réagiront à l'immunoglobuline et/ou à des compléments liés aux surfaces des hématies et provoqueront l'agglutination des cellules sensibilisées adjacentes. Les cellules non sensibilisées ne produiront pas d'agglutination (voir Limitations).

SIGNIFICATION CLINIQUE

En 1945, Coombs, Mourant et Race ont découvert que l'antiglobuline humaine pouvait être utilisée pour détecter les anticorps non agglutinants des hématies. En 1957, Dacie et col. ont montré que les anticorps d'un sérum d'antiglobuline allaient directement contre certains composants du complément. Les réactifs antiglobuline humaine détectent aussi bien les molécules d'anticorps non agglutinants que les molécules de compléments liés aux hématies en suivant les réactions antigène-anticorps *in vivo* ou *in vitro*.

RÉACTIFS

Les réactifs Spinreact Anti-globuline humaine polyspécifique contiennent des anti-IgG dérivant du lapin dont l'activité non spécifique a été éliminée par absorption et de l'IgM monoclonal de souris anti-C3d, clone BRIC-8. Les anticorps sont dilués dans une solution tamponnée qui contient de l'albumine bovine. Chaque réactif est fourni dans la dilution maximale afin qu'il puisse être utilisé avec toutes les techniques que nous recommandons, sans besoin de dilutions ni d'additions supplémentaires. Se reporter au lot et à la date de péremption de chaque référence, inscrits sur l'étiquette du flacon.

Réactif	Couleur	Colorant utilisé
Antiglobuline humaine verte	Vert	Tartrazine et bleu breveté

PRÉCAUTIONS

- Les réactifs sont uniquement destinés à un usage diagnostique *in vitro*.
- Si le flacon du réactif est cassé ou fêlé, jeter immédiatement son contenu.
- Ne pas utiliser de réactifs périmés. (voir l'étiquette du flacon).
- Ne pas utiliser de réactifs qui présentent des précipités.
- La manipulation du réactif doit être réalisée avec un vêtement de protection approprié : gants jetables et blouse de laboratoire.
- Les réactifs ont été filtrés à travers des capsules de 0,2 µm pour réduire leur charge biologique. Une fois que le flacon est ouvert, le contenu restera viable jusqu'à la date de péremption à condition qu'aucune turbidité marquée n'apparaisse, celle-ci pouvant indiquer la détérioration ou contamination du réactif.
- Les réactifs contiennent < 0,1 % d'azide de sodium. L'azide de sodium peut être toxique, en cas d'ingestion et peut réagir avec le cuivre ou le plomb des tuyauteries et former des composés explosifs. En cas d'élimination du produit, laisser couler longtemps l'eau du robinet.
- Aucune méthode ne peut garantir que les produits provenant de sources humaines ou animales sont exempts de maladies infectieuses. Manipuler et jeter avec précaution les flacons et leur contenu.
- Pour de plus amples informations sur l'élimination du produit ou la décontamination en cas de déversement, consulter les fiches de sécurité.

NOTES

- Il est recommandé d'utiliser un contrôle positif (Anti-D faible 0,1 IU/mL) et un contrôle négatif (sérum inerte) pour tester parallèlement chaque série d'essais. Les essais doivent être considérés comme non valables si les contrôles ne présentent pas les résultats attendus.
- Les techniques à l'antiglobuline ne sont considérées comme valables que si tous les essais négatifs réagissent de manière positive avec des hématies sensibilisées à l'IgG.
- Dans les techniques que nous recommandons, un volume équivalent environ à 40µl quand on utilise le compte-gouttes fourni.
- L'utilisation des réactifs et l'interprétation des résultats doivent être réalisées par un personnel qualifié et formé en accord avec les réglementations en vigueur de chaque pays. L'utilisateur doit déterminer si le réactif convient pour une utilisation avec d'autres techniques.

CONSERVATION

Ne pas congeler. Les flacons de réactif doivent être conservés à 2-8°C. Des stockages prolongés à des températures non comprises dans cette plage peuvent accélérer la perte de réactivité.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- Tubes en verre (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Centrifugeuse de tubes.
- Pipettes volumétriques.
- Tampon phosphate salin (PBS) : NaCl 0,9%, pH 7,0 ± 0,2 à 22°C ± 1°C.
- Sérum à anticorps inerte.
- Anti-D faible.
- Bain chaud ou incubateur de chaleur sèche équilibré à 37°C ± 2°C.
- Lavage de cellules Coombs.
- Solution (LISS), ex. : RÉF de Spinreact. 1700080.

ÉCHANTILLONS

Les échantillons doivent être traités, dans des conditions d'asepsie, dans de l'EDTA afin de prévenir l'union *in vitro* du complément et réaliser l'analyse dans les 24 heures. Si l'on ne dispose pas d'EDTA, il vaut mieux employer des échantillons traités dans de l'ACD, CPD ou CPDA-1, que des échantillons coagulés. Si l'on ne dispose que d'échantillons coagulés, ne pas réfrigérer avant l'analyse. Tous les échantillons de sang doivent être lavés avec du PBS au moins deux fois, avant de réaliser l'essai.

PROCÉDURE

A. Technique du test direct à l'antiglobuline (TDA)

- Laver 4 fois les hématies dans du PBS en veillant à ce que la solution saline décante entre les lavages et en remettant en suspension le bouton cellulaire après chaque lavage. Après le dernier lavage, décanter complètement la solution saline.
- Ajouter 2 volumes d'antiglobuline humaine à chaque bouton cellulaire.
- Mélanger soigneusement et centrifuger les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et un temps alternatifs adaptés.
- Remettre en suspension soigneusement le bouton cellulaire, puis lire de manière macroscopique par agglutination.

B. Technique du test indirect à l'antiglobuline (NISS TIA)

- Préparer une suspension à 2-3 % d'hématies lavées dans du PBS.
- Déposer sur un tube identifié : 2 volumes du sérum pour l'essai et 1 volume de la suspension d'hématies pour l'essai.
- Mélanger minutieusement et incubé à 37°C pendant 15 minutes.

- Laver 4 fois les hématies dans du PBS en veillant à ce que la solution saline décante entre les lavages et en remettant en suspension le bouton cellulaire après chaque lavage. Après le dernier lavage, décanter complètement la solution saline.
- Ajouter 2 volumes d'antiglobuline humaine à chaque bouton cellulaire.
- Mélanger soigneusement et centrifuger les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et un temps alternatifs adaptés.
- Remettre en suspension soigneusement le bouton cellulaire, puis lire de manière macroscopique par agglutination.

C. Technique du test indirect à l'antiglobuline LISS (LISS TIA)

- Préparer une suspension à 1,5-2 % d'hématies lavées dans une solution de LISS, pour l'essai.
- Déposer sur un tube identifié : 2 volumes du sérum pour l'essai et 2 volumes de la suspension d'hématies pour l'essai.
- Mélanger minutieusement et incubé à 37°C pendant 15 minutes.
- Suivre les étapes 4 à 7 de la technique (NISS TIA)

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Positif** : L'agglutination des hématies pour l'essai constitue un résultat positif ; dans les limites tolérées pour la mise en œuvre de l'essai, elle indique la présence d'IgG et/ou de complément (C3) dans les hématies pour l'essai.
- Négatif** : L'absence d'agglutination des hématies à tester constitue un résultat négatif ; dans les limites tolérées pour la mise en œuvre de l'essai, elle indique l'absence d'IgG et/ou de complément (C3) dans les hématies pour l'essai.

Stabilité des réactions

- Les étapes de lavage doivent être réalisées sans aucune interruption ; la centrifugation et la lecture doivent être réalisées sitôt le réactif ajouté. Les retards peuvent entraîner la dissociation des complexes antigène-anticorps, et produire de faux négatifs ou de faibles résultats positifs.
- Les résultats des essais réalisés à des températures distinctes de celles recommandées doivent être interprétés avec précaution.

LIMITATIONS

- Les hématies qui s'avèrent positives par TDA, en raison de la couverture de l'IgG, ne peuvent être typées par les techniques de test indirect à l'antiglobuline.
- Un TDA positif par sensibilisation avec un complément peut ne pas refléter la fixation *in vivo* de complément si les cellules pour l'essai proviennent d'un échantillon coagulé réfrigéré.
- Des lavages inadéquats avec des techniques de test indirect à l'antiglobuline peuvent neutraliser le réactif antiglobuline humaine.
- Une fois la phase de lavage terminée, l'excès de phase saline résiduelle peut diluer l'antiglobuline humaine et diminuer sa puissance.
- Un résultat négatif par des techniques de test direct à l'antiglobuline n'exclut pas nécessairement le diagnostic clinique de la maladie hémolytique ABO du nouveau-né ou de l'anémie hémolytique auto-immune. Il n'écarte pas non plus la possibilité de la maladie hémolytique du nouveau-né, notamment si une incompatibilité ABO est suspectée.
- Il peut également se produire de faux résultats positifs ou négatifs en raison de :
 - La contamination des matériaux de l'essai
 - La conservation inadéquée, la concentration cellulaire, le temps ou la température d'incubation.
 - La centrifugation inappropriée ou excessive
- L'utilisateur est responsable du fonctionnement des réactifs s'il recourt à toute autre méthode distincte de celles susmentionnées.
- Tout écart par rapport aux techniques ici recommandées doit être validé avant utilisation⁹.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

- Les réactifs ont été définis pour toutes les mises en œuvre que nous avons détaillées.
- Avant leur mise sur le marché, chaque lot de Spinreact Antiglobuline humaine est testé par le biais des techniques que nous recommandons, et avec un panel d'hématies Anti-D, Anti-K et Anti-Fy^a, afin d'assurer la réactivité adaptée.
- La puissance anti-IgG et anti-C3d a été testée par rapport au standard de référence de puissance minimale, Anti-AHG 96/666, issue du *National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC)*.
- La puissance anti-C3d est prouvée à travers des essais qui emploient des cellules recouvertes de C3.
- La présence d'agglutinines contaminantes hétérospécifiques ou d'anticorps anti-C4d a été exclue dans les essais qui emploient des hématies de tous les groupes ABO et des cellules recouvertes avec du C4.
- La réactivité de tout Anti-IgM, Anti-IgA ou Anti-composants de chaîne légère pouvant être présents n'a pas été établie.
- Le Contrôle de Qualité des réactifs a été réalisé en employant des hématies lavées deux fois dans du PBS, avant utilisation.
- Les réactifs satisfont aux recommandations de la dernière version des Guides pour les Services de transfusion de sang du Royaume-Uni.

BIBLIOGRAPHIE

- Coombs BRR, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh antibodies. *Brit J Exp Pathol*. 1945; 26:255.
- Wright MS, Issitt PD. Anti-complement and the indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1979; 19:686-694.
- Howard JE, Winn LC, Gottlieb CE, Grumet FC, Garratty G, Petz LD. Clinical significance of the anti-complement components of anti-globulin antisera. *Transfusion* 1982; 22:269.
- Howell P, Giles CM. A detailed serological study of five anti-Ik^a sera reacting by the antiglobulin technique. *Vox Sang*. 1983; 45: 129-138.
- Issitt PD, Smith TR. Evaluation of antiglobulin reagents. A seminar on performance evaluation. Washington, DC. American Association of Blood Banks. 1976; 25-73.
- 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.
- The anti-complement reactivity low ionic methods as published by FDA. Recommended Methods for Anti-Human Globulin Evaluation (revision October 1984).
- Dynan PK. Evaluation of commercially available low ionic strength salt (LISS) solutions. *Med Lab Sci* (1981) 381: 13-20.
- Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in anti-human globulin (AHG) tests: optimum conditions and quality control. *Haematologia* 1988; 21(1): 3-16.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
- 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.

PRÉSENTATION

Antiglobuline humaine (Coombs)	Réf. : 1700051	10 mL
--------------------------------	----------------	-------

Determinação qualitativa de anti-Ig G e anti-C3d em células vermelhas IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Quando usado segundo as técnicas recomendadas, o reagente reagirá com imunoglobulinas e/ou complemento ligados à superfície de células vermelhas, resultando em aglutinação (clumping) das células sensibilizadas adjacentes. Células não sensibilizadas não serão aglutinadas (ver limitações).

SIGNIFICADO CLÍNICO

Em 1945, Coombs, Mourant e Race descreveram o uso de soro antiglobulina humana para a detecção de anticorpos não aglutinantes ligados a células vermelhas. Em 1957, Dacie et al demonstraram que os anticorpos presentes no soro antiglobulina eram direcionados contra certos componentes do complemento. Os reagentes antiglobulina humana detectam moléculas de anticorpos não-aglutinantes assim como moléculas do complemento ligadas a células vermelhas seguindo reações antígeno-anticorpo *in vivo* ou *in vitro*.

REAGENTES

O reagente Spinreact Polyspecific Anti-Human Globulin Green contém anti-IgG derivado de coelhos, com atividade não específica removida por absorção, e IgM monoclonal anti-C3d derivado de rato, Clone BRIC-8. Os anticorpos são diluídos em uma solução tampão contendo albumina bovina. Cada reagente é fornecido em uma diluição ótima para ser usado com todas as técnicas recomendadas, sem a necessidade de diluição ou adição posterior. O número de referência do lote e a data de vencimento estão impressos nas etiquetas individuais dos frascos.

Reagente	Cor	Corante
Anti-Human Globulin Elite Green	verde	Azul patenteado e Tartrazina

PRECAUÇÕES

- O reagente é somente para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Se o frasco estiver rachado ou vazando, descartar o conteúdo imediatamente.
- Não utilizar reagentes fora da data de vencimento (ver etiquetas).
- Não utilizar reagentes se houver presença de precipitados.
- Durante a manipulação dos reagentes, deve-se utilizar equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas descartáveis e aventais de proteção (jalecos).
- O reagente foi esterilizado por filtração através de um filtro de 0,2 µm para reduzir a contaminação. Uma vez que o frasco for aberto, o conteúdo deve permanecer viável até a data de vencimento, desde que não haja nenhuma turbidez que indique contaminação ou deterioração.
- Este reagente possui azida sódica <0,1% que pode ser tóxica se ingerida e pode reagir com encanamentos de cobre e chumbo formando azidas explosivas. Ao descartar fluir em grandes volumes de água.
- 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 seu conteúdo.

NOTAS

- Recomenda-se que sejam testados um controle positivo (Anti-D fraco 0,1IU/mL) e um controle negativo (soro inerte) em paralelo com cada bateria de testes. O teste deve ser considerado inválido se os controles não demonstrarem os resultados esperados.
- As técnicas de antiglobulina podem ser consideradas válidas se todos os testes negativos reagirem positivamente com células vermelhas sensibilizadas por IgG.
- Nas Técnicas Recomendadas um volume corresponde a aproximadamente 40 µl, quando usando o conta-gotas fornecido com o frasco.
- 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.

CONSERVAÇÃO

Os frascos devem ser armazenados de 2-8° C. Não congelar. O armazenamento prolongado a temperaturas fora das especificações pode resultar em perda acelerada da reatividade.

MATERIAL NECESSÁRIO

- Lavadora de células Coombs
- Tubos teste de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm)
- Células vermelhas sensibilizadas com IgG – Células Controle de Coombs
- Anticorpo inerte – Spinreact Inert AB Serum
- Solução de baixa força iônica (LISS) contendo NaCl 0,03M, Na₂HPO₄ 0,003M : tampão NaH₂PO₄ pH 6,7 a 22°C ± 1°C e glicina 0,24M
- Tampão salina fosfato (PBS)-NaCl 0,9% pH 7,0 ± 0,2 a 22°C ± 1°C ou Solução Fisiológica 0,9%.
- Pipetas volumétricas
- Banho maria ou incubadora de calor seco equilibrada a 37°C ± 2°C
- Anti-D fraco – Spinreact Precise Weak Anti-D
- Centrífuga de tubos teste

AMOSTRAS

Amostras de sangue devem ser coletadas assepticamente em EDTA para prevenir a ligação do complemento *in vitro*, e testadas em 24 horas. Amostras colhidas em ACD, CPD ou CPDA-1 podem ser testadas caso não sejam disponibilizadas em EDTA. Se forem disponibilizadas somente amostras coaguladas, não refrigerar antes do teste. Todas as amostras de sangue devem ser lavadas pelo menos duas vezes com PBS ou Solução Fisiológica 0,9% antes de serem testadas.

TECNICAS RECOMENDADAS

TÉCNICA DA ANTIGLOBULINA DIRETA (DAT)

- Lavar as células vermelhas teste 4 vezes com PBS ou Solução Fisiológica 0,9%, cuidando para decantar a salina entre as lavagens e ressuspender cada base de células vermelhas após cada lavagem. Decantar completamente a salina após a última lavagem.
- Adicionar 2 volumes de Spinreact Elite Anti-Human Globulin a cada base de células.
- Homogeneizar cuidadosamente e centrifugar todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf ou por um tempo e força alternativos e adequados.
- Ressuspender suavemente o botão de células vermelhas e examinar macroscopicamente a presença de aglutinação.

TÉCNICA DA ANTIGLOBULINA INDIRETA (NISS IAT)

- Preparar uma suspensão a 2-3% de células vermelhas teste lavadas em PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
- Colocar em um tubo teste etiquetado: 2 volumes de soro teste e 1 volume de suspensão de células vermelhas teste.
- Misturar cuidadosamente e incubar a 37° C por 15 minutos.
- Lavar as células vermelhas teste 4 vezes com PBS ou Solução Fisiológica 0,9%, cuidando para decantar a salina entre as lavagens e ressuspender cada base de células vermelhas após cada lavagem. Decantar completamente a salina após a última lavagem.
- Adicionar 2 volumes de Spinreact Elite Anti-Human Globulin a cada base de células.
- Misturar cuidadosamente e centrifugar todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf ou por um tempo e força alternativos e adequados.
- Ressuspender suavemente o botão de células vermelhas e examinar macroscopicamente a presença de aglutinação.

TÉCNICA DA ANTIGLOBULINA INDIRETA LISS (LISS IAT)

- Preparar uma suspensão a 1,5-2% de células vermelhas teste lavadas em LISS.
- Colocar em um tubo teste etiquetado: 2 volumes de soro teste e 2 volumes de suspensão de células vermelhas teste.
- Misturar cuidadosamente e incubar a 37° C por 15 minutos.
- Seguir os passos 4 a 7 da técnica NISS IAT acima.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Positivo:** A aglutinação das células vermelhas teste constitui um resultado positivo e, dentro das limitações aceitas para o procedimento, indica a presença de IgG e/ou complemento (C3) nas células vermelhas teste.
- Negativo:** Nenhuma aglutinação das células vermelhas teste constitui um resultado negativo e, dentro das limitações aceitas para o procedimento, indicam a ausência de IgG e/ou complemento (C3) nas células vermelhas teste.

Estabilidade das reações

- As etapas de lavagem devem ser completadas sem interrupção e os testes devem ser centrifugados e lidos imediatamente após a adição do reagente. Atrasos podem resultar na dissociação dos complexos antígeno-anticorpo, levando a resultados falso-negativos ou positivos fracos.
- Deve-se ter cuidado na interpretação dos resultados dos ensaios realizados em temperaturas diferentes das recomendadas.

LIMITAÇÕES

- Eritrócitos com um DAT positivo devido a um revestimento de IgG não podem ser tipificados pela técnica de antiglobulina indireta.
- Um DAT positivo devido à sensibilização pelo complemento pode não refletir a fixação do complemento *in vivo* se as células teste forem provenientes de amostras coaguladas e refrigeradas.
- A lavagem inadequada das células na técnica de antiglobulina indireta pode neutralizar o reagente de antiglobulina humana.
- Um excesso de salina residual proveniente da lavagem pode diluir a antiglobulina humana, reduzindo sua potência.
- Um resultado negativo do teste de antiglobulina direta não exclui necessariamente o diagnóstico clínico de Doença Hemolítica ABO no recém-nascido ou Anemia Hemolítica Auto-imune. Também não necessariamente determina DHRN, especialmente se houver suspeita de incompatibilidade ABO.
- Resultados falso-positivos ou falso-negativos podem ocorrer devido a:
 - Contaminação do material a testar
 - Concentração celular inadequada
 - Tempo de incubação ou temperatura inadequada
 - Centrifugação inadequada ou excessiva
 - Armazenamento inadequado dos materiais de teste
 - Desvio das técnicas recomendadas

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

1.O reagente foi caracterizado pelos procedimentos mencionados nas **Técnicas Recomendadas**.

2. Antes de ser liberado, cada lote de Spinreact Elite Anti-Human Globulin Green foi testado pelas Técnicas Recomendadas contra células vermelhas revestidas com anti-D, anti-K e Anti-Fy^a para checar a reatividade adequada.

3. A potência de Anti-IgG e Anti-C3d foi testada contra um padrão de potência mínima referencial obtido do National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC).

- Anti-AHG referência 96/666.

4. A potência de anti-C3d é demonstrada em testes empregando células revestidas com C3.

5. A presença de aglutininas heteroespecíficas contaminantes ou anticorpos anti-C4d foram excluídas em testes empregando células de todos os grupos ABO e células revestidas com C4d.

6. Não foi estabelecida a reatividade de qualquer Anti-IgM, Anti-IgA ou Anti-componentes de cadeia leve que estejam presentes.

7. O controle de qualidade deste reagente foi realizado usando células vermelhas lavadas com PBS ou Solução Fisiológica 0,9% antes do uso.

8. Os reagentes estão de acordo com recomendações do último artigo "Guidelines for the UK Blood Transfusion Services".

BIBLIOGRAFIA

- Kholer G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; **256**, 495-497.
- Race RR, Sanger R. *Blood Groups in Man* 6th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
- Issitt PD. *Applied Blood Group Serology*, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- Mollison PL. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 8th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987, Chapter 7.
- Tippett P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. *Medical Laboratory Science* 1988; **45**, 88-93
- Thompson KM, Hughes-Jones NC. Production and characteristics of monoclonal anti-Rh. *Bailliere's Clinical Haematology* 1990; April
- Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. *Transfusion Medicine* 1995; **5**, 171-184
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
- 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.

APRESENTAÇÃO

Anti - human Globulin (Coombs)	Ref: 1700051	10 ml
--------------------------------	--------------	-------