

Procedimiento cualitativo para la potenciación de las interacciones antígeno-anticuerpo

IVD

Conservar a 2 - 8°C.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Utilizando las técnicas recomendadas, el reactivo no afectará al primer estado de hemaglutinación (absorción del anticuerpo), pero potenciará el segundo estado (aglutinación) permitiendo que los hematíes recubiertos de anticuerpos se junten mejor entre ellos que en un medio salino sin aditivos (ver limitaciones).

SIGNIFICADO CLÍNICO

La Albúmina Serológica fue reconocida en 1945 por Diamond como potenciadora de ciertas interacciones antígeno-anticuerpo. Desde entonces, se han utilizado extensamente métodos para la detección o cuantificación de anticuerpos que emplean albúmina serológica. También se ha demostrado que la albúmina serológica puede potenciar la sensibilidad del test indirecto de antiglobulina para algunas especificidades del anticuerpo.

REACTIVOS

La Albúmina Serológica 22-30% está preparada a partir de una mezcla de suero de albúmina bovina y tampón salino. La cantidad de polímero de la Albúmina Bovina Serológica (BSA) ha sido incrementada naturalmente mediante un proceso de modificación. No se añade a ninguna preparación de BSA potenciadores artificiales de la avidez o de la aglutinación de elevado peso molecular. Ninguno de los reactivos de BSA contiene capilato de sodio. 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.

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 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.
- El BSA se ha obtenido de ganado vigilado libre de sospecha clínica de padecer Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE) y que no ha sido alimentado con pienso que tuviera proteína derivada de rumiante.
- Los reactivos contienen menos de 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.
- Para mayor información sobre la eliminación del producto o descontaminación en caso de derrame, ver las fichas de seguridad.

NOTAS

- Los hematíes sensibilizados *in vitro* o *in vivo* con autoanticuerpos pueden aglutinar espontáneamente a concentraciones de albúmina serológica tan bajas como 6%. Por lo tanto es esencial establecer rutinariamente tests de control en los cuales se mezclan los hematíes con sólo la solución apropiada de albúmina serológica.
- Las técnicas antiglobulina sólo pueden considerarse válidas si todos los tests negativos reaccionan positivamente con hematíes sensibilizados con IgG.
- En las **técnicas aquí recomendadas**, un volumen es aproximadamente 40µl 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.

El reactivo se mantiene estable hasta 7 días si se conserva a temperaturas que no excedan los 30°C.

MATERIAL NECESARIO

- Anti-globulina humana o anti-IgG.
- Lavador de células Coombs.
- Tubos de vidrio (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Hematíes sensibilizados con IgG.
- Suero AB Inerte.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0.9%, pH 7.0 ± 0.2 at 22°C ± 1°C
- Centrífuga de tubos.
- Pipetas volumétricas
- Baño caliente o incubador de calor seco equilibrado a 37°C ± 2°C.

MUESTRAS

Para el tipo de antígenos debe utilizarse muestras de sangre recogidas con o sin anticoagulante. Si el test no se realiza de inmediato, conservar las muestras a 2-8°C. Las muestras en EDTA o citrato deben ser tipadas en 48 horas. Las muestras recogidas en ACD, CPD o CPDA-1 pueden ser testadas hasta 35 días desde su retirada. Todas las muestras de sangre deben ser lavadas con PBS al menos dos veces antes de realizar el test. Todas las muestras de sangre que muestren evidencias de lisis pueden dar lugar a resultados no fiables.

PROCEDIMIENTO

A. Técnica de Albúmina Inmediata

- Preparar una suspensión, de hematíes a testar lavados al 2-3%, en PBS.
- Añadir en un tubo identificado: 2 volúmenes del suero, de la suspensión de hematíes y de la Albúmina Serológica 22%.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Examinar si existe presencia de hemólisis en el sobrenadante, entonces resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente por aglutinación.

B. Técnica de Albúmina a temperatura ambiente

- Preparar una suspensión, de hematíes a testar lavados, al 2-3% en PBS.
- Añadir en un tubo identificado: 2 volúmenes de suero, 1 volumen de suspensión de

hematíes y 2 volúmenes de Albúmina Serológica 22%.

- Mezclar minuciosamente e incubar a 18-25°C durante 5-30 minutos.
- Centrifugar todos los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Examinar si existe presencia de hemólisis en el sobrenadante, entonces resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente por aglutinación.

C. Técnica de Albúmina a 37°C

- Preparar una suspensión, de hematíes a testar lavados, al 2-3% en PBS.
- Añadir en un tubo identificado: 2 volúmenes de suero, 1 volumen de suspensión de hematíes y 2 volúmenes de Albúmina Serológica 22%.
- Mezclar minuciosamente e incubar a 37°C durante 15-60 minutos.
- Centrifugar todos los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Examinar si existe presencia de hemólisis en el sobrenadante, entonces resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente por aglutinación.

D. Técnica antiglobulina indirecta (IAT)

- Seguir los pasos 1 hasta 3 del método anterior.
- Lavar los hematíes 4 veces con PBS, decantando cuidadosamente entre lavados la fase salina y resuspender cada botón celular después de cada lavado. Decantar completamente la fase salina después del último lavado.
- Añadir 2 volúmenes de anti-globulina humana a cada botón celular seco.
- 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.

E. Técnica de Titulación de Anticuerpos

- Preparar una suspensión de hematíes a testar lavados al 2-3% en Albúmina Serológica 22% de Spinreact.
- Preparar diluciones dobles del suero a testar en suero AB inerte.
- Añadir 1 volumen de la suspensión de hematíes a 1 volumen de cada dilución.
- Mezclar minuciosamente e incubar a 37°C durante 15-60 minutos.
- 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.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo:** La aglutinación de los hematíes a testar constituye un resultado positivo dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test.
- Negativo:** La ausencia de aglutinación de los hematíes a testar constituye un resultado negativo dentro de las limitaciones aceptadas.

Estabilidad de las reacciones

- Los resultados de los tubos deben leerse inmediatamente después de la centrifugación.
- Las etapas de lavado deben completarse sin interrupción alguna y la centrifugación y lectura debe realizarse inmediatamente tras la adición de la antiglobulina humana. 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 hematíes que resultan positivos por DAT debido a un recubrimiento de IgG, no pueden ser tipados a través de la técnica Antiglobulina Indirecta.
- Pueden aparecer falsos resultados positivos debido a que una pequeña proporción de muestras de suero presentan aglutininas para la albúmina.
- La eficacia del reactivo de albúmina debe ser controlada a través de su uso.
- La Albúmina Serológica no potenciará la reactividad de todos los anticuerpos de los grupos sanguíneos.
- La Albúmina Serológica no debe usarse como control negativo para reactivos de grupaje sanguíneo con IgG potenciados.
- 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.
 - Introducción de suero humano/globulinas gamma en el test.
- El usuario es responsable del funcionamiento de los reactivos en cualquier otro método distinto de los mencionados como **técnicas aquí detalladas**.
- Cualquier desviación de las **técnicas aquí recomendadas** debería ser validada antes de su utilización.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Los reactivos han sido caracterizados para todos los procedimientos aquí mencionados.
- Previamente a su liberación, se ha demostrado que cada lote de Albúmina Serológica 22 y 30% potencia la aglutinación de los anticuerpos Rh y otros, cuando se usa de acuerdo a las técnicas aquí recomendadas.
- La especificidad de cada lote se asegura en un sistema de anticuerpos libres con hematíes que poseen antígenos de los grupos sanguíneos más frecuentes.
- El Control de Calidad de los reactivos se llevó a cabo utilizando hematíes lavados 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

- Widman FK. Technical Manual, 9 Edition. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1985; Chapter 2.
- Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6 Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2.
- Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8 Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter 7.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3 Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Fourth Edition 2000, Section 3.
- 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

Albúmina Bovina 30%	Ref.:1700071	10mL
Albúmina Bovina 22%	Ref.:1700072	10mL

Qualitative procedure for antigen-antibody interactions enhancement

IVD

Store 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

When used by the recommended techniques, the reagent will not affect the first stage of haemagglutination (antibody uptake) but it will enhance the second stage (agglutination) by allowing the antibody-coated red cells to come closer together than they would in a saline medium without additives (see **Limitations**).

CLINICAL SIGNIFICANCE¹

Serological albumin was first recognised as a potentiator of certain antigen-antibody interactions in 1945 by Diamond. Since then, methods employing serological albumin have been widely used for the detection or quantitation of antibodies. Serological albumin has also been shown to enhance the sensitivity of the indirect antiglobulin test for some antibody specificities.

REAGENTS

Spinreact 22% and 30% Serological Albumin are prepared from a mixture of bovine serum albumin, and buffered saline. The polymer content of the Polymer Enhanced BSA is increased naturally by a process modification. No artificial avidity enhancers or high molecular weight agglutination potentiators are added to any BSA preparation. None of the BSA reagents do contain sodium caprylate. Each BSA reagent is supplied at optimal dilution for use with all the recommended techniques stated below without the need for further dilution or addition. For lot reference number and expiry date see **Vial Labels**.

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 BSA has been obtained from a closed herd in the female line since 1980, in which no animal has been clinically suspected of having Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), and which has not been fed rations containing ruminant derived protein during that period.
- 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.
- For information on disposal of the reagents and decontamination of a spillage site see **Material Safety Data Sheets**, available on request.

NOTES

- Red cells sensitised with an *in vitro* or *in vivo* autoantibody may agglutinate spontaneously in concentrations of serological albumin as low as 6%. It is therefore essential to routinely set up control tests in which the test red cells are mixed with the appropriate serological albumin solution alone.
- The antiglobulin techniques can only be considered valid if all negative tests react positively with IgG sensitised red cells.
- In the **Recommended Techniques** one volume is approximately 40µl when using the vial dropper provided.
- The use of the reagents and the interpretation of results must be carried out by properly trained and qualified personnel in accordance with the requirements of the country where the reagents are in use.
- The 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. Reagent will remain stable for up to 7 days when subjected to temperatures not exceeding 30°C.

MATERIAL REQUIRED

- Anti-human globulin or anti-IgG.
- Coombs cell washer.
- Glass test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- IgG sensitised red cells.
- Spinreact Inert AB serum.
- Phosphate Buffered Saline (PBS): NaCl 0.9%, pH 7.0 ± 0.2 at 22°C ± 1°C
- Test tube centrifuge.
- Volumetric pipettes.
- Water bath or dry heat incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.

SAMPLES

Blood samples should be drawn aseptically into EDTA and tested within 48 hours. If EDTA is unavailable, samples drawn into ACD, CPD or CPDA-1 are acceptable and may be tested up to 35 days from the date of withdrawal. All blood samples should be washed at least twice with PBS before being tested.

PROCEDURE

A. Albumin Immediate Spin Technique

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in a labelled test tube: 2 volumes each of test serum, test red cell suspension and 22% Serological Albumin.
- Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
- Examine supernatant for haemolysis, then gently resuspend cell button and examine macroscopically for agglutination.

B. Albumin Room Temperature Saline Phase Technique

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in a labelled test tube: 2 volumes test serum, 1 volume test cell suspension

and 2 volumes 22% Serological Albumin.

- Mix thoroughly and incubate at 18-25°C for 5-30 minutes.
- Centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
- Examine supernatant for haemolysis, then gently resuspend cell button and examine macroscopically for agglutination.

C. Albumin 37°C Technique

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in a labelled test tube: 2 volumes test serum, 1 volume test cell suspension and 2 volumes 22% Serological Albumin.
- Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15-60 minutes.
- Centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
- Examine supernatant for haemolysis, then gently resuspend cell button and examine macroscopically for agglutination.

D. Indirect Antiglobulin Technique (IAT)

- Follow steps 1 to 3 of Albumin 37°C Technique above.
- 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.

E. Antibody Titration Technique

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in Spinreact 22% Serological Albumin.
- Prepare doubling dilutions of test serum in inert AB serum.
- Add 1 volume of test red cell suspension to 1 volume of each dilution.
- Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15-60 minutes.
- Centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
- Gently resuspend each cell button and read macroscopically for agglutination.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

- Positive:** Agglutination of test red cells constitutes positive test result within accepted limitations of the test procedure.
- Negative:** No agglutination of the test red cells constitutes negative test result within accepted limitations.

Stability of the reactions

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

LIMITATIONS

- Red cells with a positive DAT due to a coating of IgG cannot be typed by the indirect antiglobulin technique.
- False positive results may occur due to the fact that agglutinins to albumin are found in a small proportion of serum samples.
- The efficacy of albumin reagent is to be controlled throughout their use.
- Serological Albumin will not enhance the reactivity of all blood group antibodies.
- Serological Albumin should not be used as negative controls for potentiated IgG blood grouping reagents.
- False positive or false negative results may occur due to:
 - Contamination of test materials
 - Improper storage, cell concentration, incubation time or temperature
 - Improper or excessive centrifugation
 - Introduction of human serum/gamma globulins into test
- The user is responsible for the performance of the reagents by any methods other than those mentioned in the **Recommended Techniques**.
- Any deviations from the **Recommended Techniques** should be validated prior to use.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- The reagents have been characterised by the procedures mentioned in the **Recommended Techniques**.
- Prior to release, each lot of Spinreact 22% and 30% Serological Albumin have been shown to enhance agglutination of Rh and other antibodies when used according to **Recommended Techniques**.
- Each lot is tested to assure specificity in an antibody-free system with red cells known to possess the most frequently inherited blood group antigens.
- The Quality Control of the reagents was performed using red cells that had been washed 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

- Widman FK. Technical Manual, 9 Edition. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1985; Chapter 2.
- Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6 Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2.
- Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8 Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter 7.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3 Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Fourth Edition 2000, Section 3.
- 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

Bovine Albumin 30%	Ref.:1700071	10mL
Bovine Albumin 22%	Ref.:1700072	10mL

Procédure qualitative pour le renforcement des interactions antigène-anticorps

IVD

Conserver à 2 - 8°C.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

En utilisant les techniques recommandées, le réactif n'affectera pas le premier état de l'hémoagglutination (absorption de l'anticorps), mais il favorisera le second état (agglutination) permettant que les hématies recouvertes d'anticorps se rassemblent mieux entre elles que dans un milieu salin sans additifs (voir restrictions).

SIGNIFICATION CLINIQUE

L'albumine sérologique a été reconnue en 1945 par Diamond comme favorisant certaines interactions antigène-anticorps. Depuis lors, des méthodes ont été largement utilisées pour détecter ou quantifier des anticorps qui utilisent l'albumine sérologique. Il a également été démontré que l'albumine sérologique peut favoriser la sensibilité du test indirect d'antiglobuline pour certaines spécificités de l'anticorps.

RÉACTIFS

L'albumine sérologique 22-30% est préparée à partir d'un mélange d'albumine bovine et d'un tampon salin. La quantité de polymère de l'albumine bovine sérologique (BSA) a été naturellement augmentée par un processus de modification. Aucun stimulant de l'avidité ou de l'agglutination de poids moléculaire élevé n'est ajouté à aucune préparation de BSA. Aucun des réactifs de BSA ne contient de caprylate de sodium. Chaque réactif est fourni dans la dilution optimale pour être utilisé dans toutes les techniques recommandées ici sans besoin de dilutions ou d'ajouts supplémentaires. Voir le lot et l'expiration de chaque référence sur l'étiquette du flacon.

PRÉCAUTIONS

1. Les réactifs sont uniquement pour un usage en diagnostic *in vitro*.
2. Si le flacon du réactif est cassé ou fissuré, jeter immédiatement son contenu.
3. Ne pas utiliser de réactifs arrivés à échéance (voir l'étiquette du flacon).
4. Ne pas utiliser de réactifs qui présentent des précipités.
5. La manipulation du réactif doit être effectuée avec les vêtements de protection appropriés, tels que des gants jetables et une blouse de laboratoire.
6. Les réactifs ont été filtrés à travers des capsules de 0.2 µm pour réduire la charge biologique. Une fois le flacon ouvert, le contenu doit rester viable jusqu'à la date d'échéance, à condition qu'il n'y ait pas une nette turbidité qui pourrait être le signe d'une détérioration ou d'une contamination du réactif.
7. Le BSA a été obtenu sur un bétail surveillé n'étant pas soupçonné cliniquement de souffrir d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et qui n'a pas été nourri par des aliments contenant une protéine issue de ruminant.
8. Les réactifs contiennent moins de 0,1% d'azote de sodium. L'azote de sodium peut être toxique, si elle est ingérée et peut réagir avec le cuivre ou le plomb des tuyauteries et former des azobates métalliques explosives. En cas d'élimination du produit, le faire avec beaucoup d'eau du robinet.
9. Pour plus d'information sur l'élimination du produit ou la décontamination en cas d'écoulement, voir les fiches de sécurité.

REMARQUES

1. Les hématies sensibilisées *in vitro* ou *in vivo* avec auto-anticorps peuvent s'agglutiner spontanément vers des concentrations d'albumine sérologique aussi faibles que 6%. Par conséquent, il est essentiel d'établir régulièrement de tests de contrôle où les hématies sont mélangées avec uniquement la solution appropriée d'albumine sérologique.
2. Les techniques antiglobuline peuvent uniquement être considérées valables si tous les tests négatifs réagissent positivement avec les hématies sensibilisées avec IgG.
3. Dans les techniques recommandées ici, un volume est d'environ 40µl en utilisant le compte-gouttes fourni.
4. L'utilisation des réactifs et l'interprétation des résultats doivent être effectués par un personnel qualifié et formé conformément aux exigences du pays dans lequel les réactifs sont utilisés.
5. L'utilisateur doit déterminer l'adéquation des réactifs pour d'autres techniques.

CONSERVATION

Ne pas congeler. Les flacons de réactif doivent être conservés à 2-8°C. Des stockages prolongés, à des températures en dehors de cette plage, peuvent provoquer une accélération de la perte de réactivité. Le réactif est maintenu stable jusqu'à 7 jours s'il est conservé à des températures qui ne dépassent pas 30°C.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- Antiglobuline humaine ou anti-IgG.
- Laveur de cellules Coombs.
- Tubes en verre (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Hématies sensibilisées avec IgG.
- Sérum AB inerte.
- Tampon phosphate salin (PBS) : NaCl 0.9%, pH 7.0 ± 0.2 à 22°C ± 1°C
- Centrifugeuse de tubes.
- Pipettes volumétriques
- Bain chaud ou incubateur de chaleur sèche équilibré à 37°C ± 2°C.

ÉCHANTILLONS

Pour le classement des antigènes il faut utiliser des échantillons de sang collecté avec ou sans anticoagulant. Si le test n'est pas réalisé immédiatement, conserver les échantillons à 2-8°C. Les échantillons en EDTA ou citrate doivent être définis en 48 heures. Les échantillons collectés en ACD, CPD ou CPDA-1 peuvent être testés jusqu'à 35 jours à compter de leur retrait. Tous les échantillons de sang doivent être lavés avec un PBS au moins deux fois avant de réaliser le test. Tous les échantillons de sang qui montrent des preuves de lyse peuvent entraîner des résultats non fiables.

PROCÉDURE

A. Technique d'albumine immédiate

1. Préparer une suspension d'hématies à tester lavées à 2-3% avec un PBS.
2. Ajouter dans un tube identifié : 2 volumes de sérum, de la suspension d'hématies et de l'albumine sérologique 22%
3. Mélanger soigneusement et centrifuger les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et temps alternatifs adéquats.
4. Examiner s'il existe une présence d'hémolyse dans le surnageant, remettre alors soigneusement en suspension le bouton cellulaire et lire macroscopiquement par agglutination.

B. Technique d'albumine à température ambiante

1. Préparer une suspension d'hématies à tester lavées à 2-3% avec un PBS.
2. Ajouter dans un tube identifié : 2 volumes de sérum, 1 volume de suspension d'hématies et 2 volumes d'albumine sérologique 22%

3. Mélanger soigneusement et incubé à 18-25°C pendant 5-30 minutes.
4. Centrifuger tous les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et temps alternatifs adéquats.
5. Examiner s'il existe une présence d'hémolyse dans le surnageant, remettre alors soigneusement en suspension le bouton cellulaire et lire macroscopiquement par agglutination.

C. Technique d'albumine à 37°C

1. Préparer une suspension d'hématies à tester lavées à 2-3% avec un PBS.
2. Ajouter dans un tube identifié : 2 volumes de sérum, 1 volume de suspension d'hématies et 2 volumes d'albumine sérologique 22%
3. Mélanger soigneusement et incubé à 37°C pendant 15-60 minutes.
4. Centrifuger tous les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et temps alternatifs adéquats.
5. Examiner s'il existe une présence d'hémolyse dans le surnageant, remettre alors soigneusement en suspension le bouton cellulaire et lire macroscopiquement par agglutination.

D. Technique antiglobuline indirecte (IAT)

1. Continuer les étapes 1 à 3 de la méthode précédente.
2. Laver les hématies 4 fois avec un PBS en décantant soigneusement entre les lavages la phase saline et remettre alors soigneusement en suspension chaque bouton cellulaire après chaque lavage. Décanter complètement la phase saline après le dernier lavage.
3. Ajouter 2 volumes d'antiglobuline humaine à chaque bouton cellulaire sec.
4. Mélanger soigneusement et centrifuger les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et temps alternatifs adéquats.
5. Remettre soigneusement en suspension le bouton cellulaire et lire macroscopiquement par agglutination.

E. Technique de niveau des anticorps

1. Préparer une suspension d'hématies à tester lavées à 2-3% dans de l'albumine sérologique 22% de Spinreact.
2. Préparer de doubles dilutions du sérum à tester en sérum AB inerte.
3. Ajouter 1 volume de la suspension d'hématies à 1 volume de chaque dilution.
4. Mélanger soigneusement et incubé à 37°C pendant 15-60 minutes.
5. Centrifuger tous les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et temps alternatifs adéquats.
6. Remettre soigneusement en suspension le bouton cellulaire et lire macroscopiquement par agglutination.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. **Positif** : L'agglutination des hématies à tester constitue un résultat positif dans les limites acceptées pour la procédure du test.
2. **Négatif** : L'absence d'agglutination des hématies à tester constitue un résultat positif dans les limites acceptées.

Stabilité des réactions

1. Les résultats des tubes doivent être lus immédiatement après la centrifugation.
2. Les étapes de lavage doivent être effectuées sans aucune interruption et la centrifugation et lecture doit être réalisée tout de suite après avoir ajouté l'antiglobuline humaine. Les retards peuvent engendrer la dissociation des complexes antigène-anticorps, entraînant de faux négatifs ou de faibles résultats positifs.
3. Les résultats des tests réalisés à d'autres températures que celles recommandées ici, doivent être interprétés avec prudence.

LIMITES

1. Les hématies positives par DAT en raison d'un recouvrement d'IgG, ne peuvent pas être définies par les techniques d'antiglobuline directe.
2. Il peut apparaître de faux résultats positifs du fait qu'une petite proportion d'échantillons de sérum présentent des agglutinines pour l'albumine.
3. L'efficacité du réactif d'albumine doit être contrôlée à travers son utilisation.
4. L'albumine sérologique ne favorisera pas la réactivité de tous les anticorps des groupes sanguins.
5. L'albumine sérologique ne doit pas être utilisée comme contrôle négatif pour des réactifs de groupe sanguin avec IgG renforcés.
6. De faux résultats positifs ou négatifs peuvent également se produire à cause de :
 - Contamination des matériels du test.
 - Conservation inadéquate, concentration cellulaire, temps ou température d'incubation.
 - Centrifugation inappropriée ou excessive.
 - Introduction de sérum humain/globulines gamma dans le test.
7. L'utilisateur est responsable du fonctionnement des réactifs dans n'importe quelle autre méthode que celles mentionnées comme techniques détaillées ici.
8. Toute déviation des techniques recommandées ici devrait être validée avant son utilisation.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

1. Les réactifs ont été caractérisés pour toutes les procédures mentionnées ici.
2. Avant leur libération, il a été démontré que chaque lot d'albumine sérologique 22 et 30% favorise l'agglutination des anticorps Rh et autres, quand il est utilisé conformément aux techniques recommandées ici.
3. La spécificité de chaque lot est assurée dans un système d'anticorps libres avec hématies qui possèdent des antigènes des groupes sanguins les plus fréquents.
4. Le contrôle de qualité des réactifs a été effectué en utilisant des hématies lavées avec un PBS avant leur utilisation.
5. Les réactifs sont conformes aux recommandations de la dernière version des Guides pour les Services de transfusion sanguine du Royaume Uni.

BIBLIOGRAPHIE

1. Widman FK. Technical Manual, 9 Edition. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1985; Chapter 2
2. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6 Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2
3. Molison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8 Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter 7
4. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3 Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Fourth Edition 2000, Section 3.
6. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for bloodgrouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 1995, 5, 145-150.

PRÉSENTATION

Albumine bovine 30%	Réf.:1700071	10mL
Albumine bovine 22%	Réf.:1700072	10mL

Procedimento qualitativo para a potenciação das interações antígeno-anticorpo

IVD

Conservar a 2 – 8 °C.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Utilizando as técnicas recomendadas, o reagente não afetará o primeiro estado de hemaglutinação (absorção do anticorpo), mas potenciará o segundo estado (aglutinação) permitindo que as hemácias revestidas de anticorpos se juntem melhor entre si do que num meio salino sem aditivos (ver limitações).

SIGNIFICADO CLÍNICO

A Albumina Sérica foi reconhecida em 1945 por Diamond como potenciadora de determinadas interações antígeno-anticorpo. Desde essa altura, foram utilizados extensamente métodos para a deteção ou quantificação de anticorpos que utilizam albumina sérica. Também se demonstrou que a albumina sérica pode potenciar a sensibilidade do teste indireto de anti-globulina para algumas especificidades do anticorpo.

REAGENTES

A Albumina Sérica 22-30% é preparada a partir de uma mistura de soro de albumina bovina e de tampão salino. A quantidade de polímero da Albumina Sérica Bovina (BSA) foi aumentada naturalmente através de um processo de modificação. Não se adicionam potenciadores artificiais da avidéz ou da aglutinação de elevado peso molecular a nenhuma preparação de BSA. Nenhum dos reagentes da BSA contém caprilato de sódio. Cada reagente é fornecido na diluição ótima para a sua utilização em todas as técnicas aqui recomendadas, sem necessidade de diluições ou adições suplementares. Consulte o lote e o prazo de validade de cada referência no rótulo do vial.

PRECAUÇÕES

- Os reagentes destinam-se apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Se o vial do reagente estiver partido ou rachado, eliminar imediatamente o seu conteúdo.
- Não utilizar reagentes expirados (consultar o rótulo do vial).
- Não utilizar reagentes que apresentem precipitados.
- A manipulação do reagente deve ser realizada com o vestuário de proteção adequado, tal como luvas descartáveis e bata de laboratório.
- Os reagentes foram filtrados através de cápsulas de 0,2 µm para reduzir a carga biológica. Após abertura do vial, o conteúdo deve permanecer viável até ao prazo de validade, desde que não exista uma acentuada turbidez, a qual poderá ser indicativa de degradação ou contaminação do reagente.
- A BSA foi obtida a partir de gado vigiado, livre de suspeita clínica de sofrer de Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) e que não foi alimentado com ração contendo proteína derivada de ruminantes.
- Os reagentes contêm menos de 0,1% de azida sódica. A azida sódica pode ser tóxica, se ingerida e pode reagir com cobre ou chumbo das tubagens e formar azidas metálicas explosivas. No caso de eliminação do produto, elimine-o com água abundante da torneira.
- Para obter mais informações sobre a eliminação do produto ou descontaminação em caso de derrame, consulte as fichas de segurança.

NOTAS

- As hemácias sensibilizadas *in vitro* ou *in vivo* com auto-anticorpos podem aglutinar espontaneamente em concentrações de albumina sérica tão baixas como 6%. Como tal, é essencial estabelecer como rotina, testes de controlo nos quais se misturam as hemácias com apenas a solução apropriada de albumina sérica.
- As técnicas anti-globulina apenas podem ser consideradas válidas se todos os testes negativos reagirem positivamente com hemácias sensibilizadas com IgG.
- Nas **técnicas aqui recomendadas**, um volume é aproximadamente 40µl, utilizando o conta-gotas fornecido.
- A utilização dos reagentes e a interpretação dos resultados devem ser efetuados por pessoal qualificado e formado de acordo com os requisitos do país no qual os reagentes estão a ser utilizados.
- O utilizador deve determinar a idoneidade dos reagentes para outras técnicas.

CONSERVAÇÃO

Não congelar. Os vials de reagente devem ser conservados a 2-8 °C. Armazenamentos prolongados, a temperaturas fora deste intervalo, podem provocar uma aceleração da perda de reatividade. O reagente mantém-se estável até 7 dias se conservado a temperaturas que não excedam 30 °C.

MATERIAL NECESSÁRIO

- Anti-globulina humana ou anti-IgG.
- Lavador de células Coombs.
- Tubos de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Hemácias sensibilizadas com IgG.
- Soro AB Inerte.
- Tampão fosfato salino (PBS): NaCl 0,9%, pH 7,0 ± 0,2 a 22 °C ± 1 °C
- Centrifuga de tubos.
- Pipetas volumétricas
- Banho quente ou incubadora de calor seco equilibrado a 37 °C ± 2 °C.

AMOSTRAS

Para a tipagem de antígenos devem utilizar-se amostras de sangue recolhidas com ou sem anticoagulante. Se o teste não for realizado imediatamente, conserve as amostras a 2-8 °C. As amostras em EDTA ou citrato devem ser tipadas em 48 horas. As amostras recolhidas em ACD, CPD ou CPDA-1 podem ser testadas até 35 dias após a sua recolha. Todas as amostras de sangue devem ser lavadas com PBS pelo menos duas vezes antes de realizar o teste. Todas as amostras de sangue que apresentem evidências de lise podem originar resultados não fiáveis.

PROCEDIMENTO

A. Técnica de Albumina Imediata

- Preparar uma suspensão de 2-3% de hemácias a testar lavadas, em PBS.
- Adicionar num tubo identificado: 2 volumes de soro, da suspensão de hemácias e da Albumina Sérica 22%.
- Misturar minuciosamente e centrifugar os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) ou a uma força e tempo alternativos adequados.
- Verificar se existe presença de hemólise no sobrenadante. Em seguida, ressuspender cuidadosamente o agregado celular e ler macroscopicamente por aglutinação.

B. Técnica de Albumina à temperatura ambiente

- Preparar uma suspensão de 2-3% de hemácias a testar lavadas, em PBS.
- Adicionar num tubo identificado: 2 volumes de soro, 1 volume da suspensão de hemácias e 2 volumes de Albumina Sérica 22%.

- Misturar minuciosamente e incubar a 18-25 °C durante 5-30 minutos.
- Centrifugar todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) ou a uma força e tempo alternativos adequados.
- Verificar se existe presença de hemólise no sobrenadante. Em seguida, ressuspender cuidadosamente o agregado celular e ler macroscopicamente por aglutinação.

C. Técnica de Albumina a 37°C

- Preparar uma suspensão de 2-3% de hemácias a testar lavadas, em PBS.
- Adicionar num tubo identificado: 2 volumes de soro, 1 volume da suspensão de hemácias e 2 volumes de Albumina Sérica 22%.
- Misturar minuciosamente e incubar a 37 °C durante 15-60 minutos.
- Centrifugar todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) ou a uma força e tempo alternativos adequados.
- Verificar se existe presença de hemólise no sobrenadante. Em seguida, ressuspender cuidadosamente o agregado celular e ler macroscopicamente por aglutinação.

D. Técnica anti-globulina indireta (IAT)

- Seguir os passos 1 até 3 do método anterior.
- Lavar as hemácias 4 vezes com PBS, decantando cuidadosamente entre lavagens a fase salina e ressuspender cada agregado celular após cada lavagem. Decantar totalmente a fase salina após a última lavagem.
- Adicionar 2 volumes de anti-globulina humana a cada agregado celular seco.
- Misturar minuciosamente e centrifugar os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) ou a uma força e tempo alternativos adequados.
- Ressuspender cuidadosamente o agregado celular e ler macroscopicamente por aglutinação.

E. Técnica de Titulação de Anticorpos

- Preparar uma suspensão de 2-3% de hemácias a testar lavadas, em Albumina Sérica 22% da Spinreact.
- Preparar diluições duplas do soro a testar em soro AB inerte.
- Adicionar 1 volume da suspensão de hemácias a 1 volume de cada diluição.
- Misturar minuciosamente e incubar a 37 °C durante 15-60 minutos.
- Centrifugar todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) ou a uma força e tempo alternativos adequados.
- Ressuspender cuidadosamente o agregado celular e ler macroscopicamente por aglutinação..

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Positivo:** A aglutinação das hemácias a testar constitui um resultado positivo e dentro das limitações aceites para o procedimento do teste.
- Negativo:** A ausência de aglutinação das hemácias a testar constitui um resultado negativo e dentro das limitações aceites.

Estabilidade das reações

- Os resultados dos tubos devem ser lidos imediatamente após a centrifugação.
- As etapas de lavagem devem ser efetuadas sem qualquer interrupção e a centrifugação e leitura devem ser efetuadas imediatamente após a adição da anti-globulina humana. Os atrasos podem implicar a dissociação dos complexos antígeno-anticorpo, causando falsos negativos ou resultados positivos fracos.
- Os resultados dos testes realizados a temperaturas diferentes das aqui recomendadas, devem ser interpretados com cautela.

LIMITAÇÕES

- As hemácias que resultem positivas por DAT devido a um revestimento de IgG, não podem ser tipadas através da técnica de Anti-globulina Indireta.
- Podem aparecer falsos resultados positivos devido ao facto de uma pequena proporção de amostras de soro apresentarem aglutininas para a albumina.
- A eficácia do reagente da albumina deve ser controlada através da sua utilização
- A Albumina Sérica não potenciará a reatividade de todos os anticorpos dos grupos sanguíneos.
- A Albumina Sérica não deve ser utilizada como controlo negativo de reagentes de determinação de grupos sanguíneos com IgG potenciados.
- Também podem ocorrer falsos resultados positivos ou negativos devido a:
 - Contaminação dos materiais do teste.
 - Conservação inadequada, concentração celular, tempo ou temperatura de incubação.
 - Centrifugação inapropriada ou excessiva.
 - Introdução de soro humano/globulinas gema no teste.
- O utilizador é responsável pelo funcionamento dos reagentes em qualquer outro método diferente dos mencionados como **técnicas aqui detalhadas**.
- Qualquer desvio em relação às **técnicas aqui recomendadas** deverá ser validado antes da sua utilização

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

- Os reagentes foram caracterizados para todos os procedimentos aqui mencionados.
- Antes da sua libertação, demonstrou-se que cada lote de Albumina Sérica 22 e 30% potencia a aglutinação dos anticorpos Rh e outros, quando utilizada de acordo com as técnicas aqui recomendadas.
- A especificidade de cada lote é garantida num sistema de anticorpos livres com hemácias que possuem antígenos dos grupos sanguíneos mais frequentes.
- O Controlo de Qualidade dos reagentes foi efetuado utilizando hemácias lavadas em PBS, antes da sua utilização.
- Os reagentes cumprem as recomendações da última versão das Diretrizes para os Serviços de transfusão de sangue do Reino Unido.

BIBLIOGRAFIA

- Widman FK. Technical Manual, 9 Edition. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1985; Chapter 2
- Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man, 6 Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1975; Chapter 2
- Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8 Edition. Blackwell Scientific, Oxford 1987; Chapter 7
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3 Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Fourth Edition 2000, Section 3.
- 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

Albumina Bovina 30%	Ref.:1700071	10mL
Albumina Bovina 22%	Ref.:1700072	10mL