



Suero Anti-humano

(poliespecífico)

(Anti-IgG policlonal + anti-C3d monoclonal)
Para realizar Pruebas Antiglobulina (Coombs) Directa o Indirecta

SIGNIFICACION CLINICA

Las experiencias descritas por Coombs, Mourant y Race en 1945 establecieron que las Pruebas Antiglobulina Humana resultaban los mejores métodos para detectar anticuerpos sensibilizantes pero no directamente aglutinantes. Originalmente, se hacía referencia a antígenos del sistema Rh pero experiencias posteriores probaron el valor de estas pruebas en la detección de anticuerpos en casi todos los grupos sanguíneos de importancia clínica, siendo empleadas actualmente en los siguientes casos:

Prueba Antiglobulina Indirecta

- Screening de suero de donantes y pacientes para anticuerpos irregulares.
- Pruebas de compatibilidad previas a la transfusión.
- Fenotipo de glóbulos rojos.
- Identificación y titulación de anticuerpos encontrados en suero o eluatos.

Prueba Antiglobulina Directa

- Diagnóstico de laboratorio de anemia hemolítica y enfermedad hemolítica del recién nacido.
- Investigación de reacciones dudosas en una transfusión.
- Investigación de enfermedades autoinmunes que involucran la unión de inmunoglobulinas y/o fracciones del complemento a los glóbulos rojos.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El agregado de Suero Anti-humano (poliespecífico) a glóbulos rojos cubiertos de inmunoglobulinas y/o fragmentos de complemento produce una aglutinación de los glóbulos rojos visible macroscópicamente.

REACTIVO PROVISTO

Suero Anti-humano (poliespecífico): mezcla de anti-IgG policlonal (producido por inmunización de conejos con IgG humana purificada) con anti-C3d monoclonal obtenido por cultivo de línea celular BRIC-8 de hibridoma murino secretoras de IgM. El reactivo contiene colorante verde (que no afecta las propiedades del reactivo) y < 1 g/l de azida sódica como conservante.

REACTIVOS NO PROVISTOS

- Reactivos para la determinación de grupos sanguíneos. De acuerdo a la técnica a emplear puede requerirse adicionalmente:
 - Solución fisiológica.
 - Buffer fosfato (PBS) pH 7,0 ± 0,2.
 - Solución fisiológica de baja fuerza iónica (LISS).

INSTRUCCIONES PARA SU USO

El reactivo está listo para usar. No debe diluirse.

PRECAUCIONES

El Reactivo Provisto es para uso diagnóstico "in vitro" y está destinado a uso profesional por personal calificado con comprobada competencia en inmunohematología. No utilizar el reactivo fuera de la fecha de vencimiento. La azida puede reaccionar con las cañerías de plomo o cobre generando compuestos explosivos. Al eliminar el reactivo, se debe dejar correr grandes cantidades de agua. Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica. El reactivo y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El Reactivo Provisto es estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar ni exponer a temperaturas elevadas.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Desechar el reactivo si se observa contaminación del mismo. No debe utilizarse si presenta turbidez, presencia de partículas o precipitado.

MUESTRA

Glóbulos rojos

a) Recolección: la sangre debe ser obtenida asépticamente, con o sin anticoagulante.

b) Aditivos: pueden emplearse como anticoagulantes: EDTA, heparina, ACD (ácido cítrico, citrato, dextrosa), CPD (citrato, fosfato, dextrosa) o CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrosa, adenina). Puede utilizarse Anticoagulante W de Wiener lab.

c) Sustancias interferentes conocidas: las muestras contaminadas o con hemólisis marcada no deben utilizarse.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: las muestras deben ser analizadas lo antes posible. Si el análisis no se realiza en el momento, las muestras deberán conservarse entre 2-10°C. Si se utilizó heparina o EDTA, la tipificación debe llevarse a cabo dentro de las 48 horas de obtenida la muestra. Las muestras obtenidas con ACD, CPD o CPDA-1 pueden ser ensayadas hasta los 35 días de extraídas. Si se emplean coágulos, deberá efectuarse la tipificación dentro de los 7 días de obtenida la muestra. Los

coágulos no deben ser refrigerados antes de las pruebas directas. Cuando se efectúan pruebas antiglobulina directas, la sangre debe ser preferentemente fresca (menos de 24 horas de la extracción).

Las muestras de sangre de donantes pueden ser analizadas hasta su fecha de vencimiento.

Los sueros deben conservarse no más de 24 horas a 2-10°C o 1 mes a -20°C. Sueros almacenados a -20°C o menos por períodos prolongados pierden la actividad del complemento. Las pruebas antiglobulínicas directas deben realizarse en eritrocitos frescos obtenidos con EDTA para evitar la sensibilización "in vitro" con factores del complemento.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Centrifuga
- Baño de agua a 37°C
- Tubos de hemólisis

PROCEDIMIENTO

Este reactivo ha sido estandarizado según los procedimientos detallados a continuación; su desempeño en el uso mediante otras técnicas no puede ser garantizado.

I- PRUEBA ANTIGLOBULINA INDIRECTA (en solución salina de fuerza iónica normal)

- 1) En un tubo de hemólisis colocar 2 gotas del suero a probar.
- 2) Agregar 1 gota de suspensión de glóbulos rojos a probar al 3%, lavados 3 veces y resuspendidos en PBS. El gotero provisto dispensa un volumen de 50 ± 5 ul. Es importante que se mantenga la relación reactivo:células en todos los sistemas de ensayo.
- 3) Mezclar e incubar a 37°C durante 30-60 minutos.
- 4) Lavar los glóbulos 3 veces con PBS. Asegurarse de remover la mayor cantidad posible de solución salina al final de cada lavado, de manera de obtener un botón celular "seco". Descartar completamente el sobrenadante luego del último lavado.
- 5) Agregar 2 gotas de Suero Anti-humano (poliespecífico) al botón de células. Mezclar perfectamente y centrifugar durante 15 segundos a 1.000 g.
- 6) Agitar suavemente el tubo a fin de deshacer el botón celular y observar macroscópicamente. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa. Tener en cuenta que agitaciones demasiado vigorosas pueden dar lugar a lecturas negativas de un aglutinado débil (falso negativo).
- 7) Los resultados negativos deben confirmarse por adición de glóbulos rojos sensibilizados con IgG débiles (Control de Coombs).

II- PRUEBA ANTIGLOBULINA INDIRECTA (en solución fisiológica de baja fuerza iónica).

El empleo de esta solución permite reducir el tiempo de incubación a 15 minutos.

Los glóbulos rojos deben lavarse 2 veces con PBS y una vez con LISS. Finalmente preparar con esta solución una suspensión de glóbulos rojos al 3%.

- 1) Colocar en un tubo de hemólisis 1 gota de suero a probar.
- 2) Agregar 1 gota de glóbulos rojos a probar al 3% en LISS.
- 3) Mezclar e incubar a 37°C durante 15 minutos en baño de agua.
- 4) Lavar los glóbulos 3 veces con PBS. Asegurarse de remover la mayor cantidad posible de solución salina al final de cada lavado, de manera de obtener un botón celular "seco". Descartar completamente el sobrenadante luego del último lavado.
- 5) Agregar 2 gotas de Suero Anti-humano (poliespecífico) al botón de células. Mezclar perfectamente y centrifugar durante 15 segundos a 1.000 g.
- 6) Agitar suavemente el tubo a fin de deshacer el botón celular y observar macroscópicamente. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa. Tener en cuenta que agitaciones demasiado vigorosas pueden dar lugar a lecturas negativas de un aglutinado débil (falso negativo).
- 7) Los resultados negativos deben confirmarse por adición de glóbulos rojos sensibilizados con IgG débiles (Control de Coombs).

III- PRUEBA ANTIGLOBULINA DIRECTA

Se emplea para demostrar la absorción "in vivo" de IgG y/o fracciones del complemento en la superficie de los glóbulos rojos.

- 1) Preparar una suspensión de glóbulos rojos a probar en PBS al 3%.
- 2) En un tubo de hemólisis colocar 1 gota de esta suspensión.
- 3) Lavar los glóbulos 3 veces con PBS. Asegurarse de remover la mayor cantidad posible de solución salina al final de cada lavado, de manera de obtener un botón celular "seco". Descartar completamente el sobrenadante luego del último lavado.
- 4) Agregar 2 gotas de Suero Anti-humano (poliespecífico) al botón de células. Mezclar perfectamente y centrifugar durante 15 segundos a 1.000 g.
- 5) Agitar suavemente el tubo a fin de deshacer el botón celular y observar macroscópicamente. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa. Tener en cuenta que agitaciones demasiado vigorosas pueden dar lugar a lecturas negativas de un aglutinado débil (falso negativo).
- 6) Los resultados negativos deben confirmarse por adición de glóbulos rojos sensibilizados con IgG débiles (Control de Coombs).

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La observación de aglutinación (con cualquiera de las técnicas empleadas) en presencia del **Suero Anti-humano (poliespecífico)** indica la presencia de IgG o componentes del complemento en la membrana del glóbulo rojo; la reacción es positiva.

Si no se observa aglutinación, la reacción es negativa.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Debe realizarse un control de los reactivos al comienzo de cada jornada de trabajo con glóbulos rojos sensibilizados

con IgG, como por ejemplo, Glóbulos R1r sensibilizado con Anti-Rh (D) débil.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Reacciones falsas positivas y falsas negativas pueden ocurrir por las siguientes causas:

- Contaminación química o bacteriana de la muestra u otros materiales empleados para la prueba.
- Lavado inadecuado de las células. Los pasos de lavado deben completarse lo antes posible y sin interrupción. Retrasos en completar los pasos de lavado o en la lectura pueden ocasionar la disociación del complejo antígeno-anticuerpo obteniendo resultados falsos negativos o positivos débiles.
- Todo resto de solución lavadora puede diluir el reactivo más allá de la concentración óptima de funcionamiento. Por lo tanto es importante remover la mayor cantidad del líquido de lavado al finalizar dicho proceso.
- Tiempo o temperatura de incubación inadecuados.
- Tiempo o velocidad de centrifugación inadecuados.
- Concentración inadecuada de glóbulos rojos.
- Agitación excesiva para despegar los glóbulos rojos aglutinados.
- Luego de agregar el reactivo Anti-globulina humana, los ensayos deben ser centrifugados y leídos inmediatamente. Los eritrocitos positivos en una prueba antiglobulínica directa no deben utilizarse para una prueba antiglobulínica indirecta. Los reactivos han sido estandarizados para detectar inmunoglobulinas humanas y fragmentos C3 unidos a los glóbulos rojos. No son aptos para detectar anticuerpos de otro origen.

PRESENTACION

- 1 x 10 ml (Cód. 1443156)

BIBLIOGRAFIA

- Coombs, R.R.A.; Mourant., A.E. and Race, R.R. - Lancet, ii:15, 1945.
- Garratty G, Petz LD. "The significance of red cell bound complement components in the development of standards and quality assurance for the anti-complement components of antiglobulin sera". Transfusion 19, 1976.
- Wright MS, Issitt PD. Anticomplement and the indirect antiglobulin test. Transfusion 19:688-694, 1979.
- Moore BPL. - Serological and immunological methods of the Canadian Red Cross Blood Transfusion Service. 8th ed. Toronto: Hunter Rose, 1980.
- Lachman PJ, Pangburn MK, Oldroyd RG. Breakdown of C3 after complement activation. J Exp Med 156:205-216, 1982.
- Howell P, Giles CM. - A detailed serological study of five anti-JK sera reacting by the antiglobulin technique. - Vox Sang 45:129-138, 1983.
- Issitt PD Applied blood group serology. 3rd ed. Miami: Montgomery Scientific, 1985.
- Voak D, Downie DM, Moore BPL et al. Quality control of anti-human globulin test: use of replicate test to improve performance. Bio Bull 1:41-52, 1986.
- ISBT/ICSH Working Party. International reference polyspecific antihuman globulin reagents. Vox Sang 53:241-247, 1987.
- Walker RH, ed. Technical manual. 11th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1993.

SIMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

Representante autorizado en la Comunidad Europea

Uso diagnóstico "in vitro"

Contenido suficiente para <n> ensayos

Fecha de caducidad

Límite de temperatura (conservar a)

No congelar

Riesgo biológico

Volumen después de la reconstitución

Contenido

Número de lote

Elaborado por:

Nocivo

Corrosivo / Cáustico

Irritante

Consultar instrucciones de uso

Calibrador

Control

Control Positivo

Control Negativo

Número de catálogo

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Disp. N°: 2503/91

Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina