

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 antiglobulina eran directamente contra ciertos componentes del complemento. Los reactivos antiglobulina 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 antiglobulinas sólo pueden considerarse válidas si todos los tests negativos reaccionan positivamente con hematies sensibilizados con IgG.
- En las técnicas 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.

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 asepticamente 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 antiglobulina 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 antiglobulina 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 antiglobulina 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 antiglobulina 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.

C. Técnica antiglobulina 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 Antiglobulina Indirectas.
- Un DAT positivo por sensibilización con complemento puede no reflejar la fijación *in vivo* de complemento, si las células a alestar provienen de una muestra coagulada refrigerada.
- Lavados inadecuados en técnicas antiglobulina indirectas pueden neutralizar el reactivo antiglobulina humana.
- Tras completar la fase de lavado, el exceso de fase salina residual puede diluir la antiglobulina humana, reduciendo su potencia.
- Un resultado negativo por técnicas antiglobulina 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 utilización.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Los reactivos han sido caracterizados para todos los procedimientos aquí mencionados.
- Préviamente a su liberación, cada lote de Spinreact Antiglobulina 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, 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.

PRESENTACIÓN

Anti globulina humana (Coombs) Ref: 1700051 10 ml