

*Para uso Profesional de Diagnóstico In Vitro.*

## **INTRODUCCIÓN**

El ensayo antiglobulina indirecto ayuda al reconocimiento de un suero Ab; se realiza por incubación "in vitro" de células rojas normales con el suero desconocido. A continuación, los RBC de ensayo se lavan en disolución salina y se añade globulina anti-humana: La aglutinación indica la presencia de un Ab (Adsorbido a partir del suero desconocido) que recubre las células. Este ensayo puede dar positivo en presencia de un grupo sanguíneo Ab imprevisto, o cuando hay presentes Abs circulantes en anemias hemolíticas autoinmunes. El ensayo (de Coombs) antiglobulina directo detecta el Abs que recubre las células rojas del paciente. Las células rojas lavadas se tratan con globulina antihumana y se observa la posible aglutinación. El ensayo se realiza en la sangre del cordón umbilical de bebés en los que se sospecha que tiene la enfermedad hemolítica del recién nacido causada por el Ab materno. Este ensayo se utiliza también para investigar anemias. Si es positivo, sugiere la presencia de una anemia hemolítica autoinmune. Este reactivo ha sido preparado mezclando anti-IgG policlonal (producido por la inmunización de conejos con IgG purificado completamente humano) con Anti-C3d monoclonal obtenido por cultivo "in Vitro" de un hibridoma de ratón que segrega inmunoglobulina IgM. La concentración final de proteína fue ajustada a un valor entre 0.8% y 1.2% p/v con albúmina de suero bovino. El reactivo se tiñó de verde mediante una mezcla de Azul patente y Tartazina Ariavit y fue esterilizado por filtración, y contiene 0.08 – 0.12% p/v de azida sódica.

## **ALMACENAMIENTO**

NO CONGELE LOS REACTIVOS. Conservar entre 2-8°C. Si se guarda a temperaturas que estén fuera de estos límites, podrá reducirse la reactividad del producto. Utilizar la cuenta gotas suministrados y evitar que se contaminen. El reactivo debe utilizarse tal como se suministra sin diluciones o adiciones.

## **ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

El lavado inadecuado de las células rojas durante el ensayo de globulina anti-humana puede causar la neutralización del reactivo de globulina anti-humana. Tras la fase de lavado, debe tenerse cuidado de eliminar correctamente la disolución salina residual: un exceso de disolución salina diluirá el reactivo y reducirá su eficacia. Ningún ensayo individual es capaz de detectar todos los anticuerpos clínicamente significativos. El suero de ensayo para la selección o identificación no deberá guardarse durante más de 24 horas a 4°C o un mes a -20°C, con el fin de detectar anticuerpos retenidos complementariamente. El suero almacenado a -20°C o a una temperatura inferior durante períodos más prolongados perderá la actividad complementaria y podrá volverse anti-complementario. Con el suero almacenado pueden conseguirse resultados óptimos si se utiliza una técnica de sensibilización en dos etapas. Las células rojas específicamente recubiertas conC#d para controlar el anti-complemento pueden prepararse "In Vitro". No utilizar el reactivo si presenta signos de turbidez o si hay precipitado, gel o partículas.

## **Centrifugación:**

Obsérvese que las condiciones de centrifugación recomendadas se indican como rcf (fuerza de centrifugado relativa). Se ruega consultar al fabricante de la centrífuga para disponer del equivalente en rpm. El control de calidad de este reactivo ha sido realizado usando células LAVADAS. Para técnicas en tubo, este reactivo ha sido formulado y validado usando tubos de vidrio. Todos los reactivos para la determinación del grupo sanguíneo de origen humano o animal están exentos de agentes infecciosos. Deben tomarse las precauciones necesarias durante la utilización y desecho de los recipientes y su contenido.

## **REACTIVOS NECESARIOS**

1. Reactivo de globulina anti-humana poliespecífico –suministrado–.
2. Anti-Rh débil
3. Células recubiertas de IgG
4. Disolución salino-fosfato (10Mm) NaCl 0.15 M tamponizada a PH 6.8 – 7.2 (a 20°C) con fosfato.
5. LISS-Disolución de baja fuerza iónica – NaCl 0.03M tampón Na2HPO4 0.003M de PH 6.7 y glicina 0.24 M
6. EDTA – K2H2 EDTA 4.45%, disolución de NaOH 0.3% de PH 7.0 –7.4
7. Suero fresco como reserva de complemento. Esta deberá separarse de las células rojas inmediatamente después de la venesección y guardarse durante un máximo de 24 horas a 4°C o un mes a -20°C. El suero deberá estar exento de anticuerpos atípicos.
8. Un control negativo adecuado, p. Ej. Control de calidad suero AB.

## **ENSAYO DE ANTIGLOBULINA INDIRECTO PARA SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS**

### **A. Técnica en Tubo - Fuerza iónica normal**

1. Preparar una suspensión al 3% de células rojas en una disolución salina tamponizada con fosfato.
2. Poner 100 microlitros de suero en un tubo adecuado.
3. Agregar en un segundo tubo 100 microlitros del control negativo.
4. Añadir en cada tubo 50 microlitros de suspensión de células.
5. Mezclar bien e incubar entre 36°C y 38°C durante 45 minutos.
6. Lavar las células al menos tres veces con la disolución salina tamponizada con fosfato.
7. Usando el cuentagotas suministrado, agregar dos gotas de Reactivo de globulina anti-humana poliespecífico.
8. Mezclar bien y centrifugar los tubos a 130 rcf durante 60 segundos, o durante un período y rcf adecuados.
9. Volver a suspender cuidadosamente el depósito de células y observar macroscópicamente la posible aglutinación y si fuera necesario, al microscopio.

### **B. Técnica en Tubo - Baja Fuerza Iónica.**

1. Preparar una suspensión al 1.5% de células rojas lavadas en LISS, lavando las células dos veces en PBS y una vez más en LISS. Volver a suspender las células al 1.5% en LISS.
2. Poner 100 microlitros de suero en un tubo adecuado.
3. Añadir en un segundo tubo 100 microlitros de control negativo.
4. Añadir en cada tubo un volumen igual de la suspensión de células.
5. Mezclar bien e incubar entre 36°C y 38°C durante 15 minutos.
6. Lavar las células tres veces como mínimo con la disolución salina tamponizada con fosfato.
7. Usando el cuentagotas suministrado, añadir dos gotas de reactivo de globulina anti-humana poliespecífico.
8. Mezclar bien y centrifugar los tubos a 130 rcf durante 60 segundos o durante un período y rcf adecuados.
9. Volver a suspender cuidadosamente el depósito de células y observar macroscópicamente la posible aglutinación y si fuera necesario, al microscopio.

### **C. Técnica en Tubo - EDTA Dos etapas.**

#### **ETAPA 1**

1. Preparar una suspensión al 3% de células rojas lavadas en una disolución salina tamponizada con fosfato.
2. Inactivar el complemento residual en el suero a ensayar añadiendo 4mg. de EDTA por 1 ml de suero.
3. Poner 100 microlitros de suero inactivado en un tubo adecuado.
4. Añadir en un segundo tubo 100 microlitros de suero AB.
5. Añadir en cada tubo 50 microlitros de una suspensión de células.
6. Mezclar bien e incubar entre 36°C y 38°C durante 60 minutos.
7. Lavar las células tres veces con la disolución salina tamponizada con fosfato.
8. Agregar 1 volumen de suero fresco como reserva de complemento.
9. Mezclar bien e incubar entre 36°C y 38°C durante 15 minutos.

## **ETAPA 2**

1. Lavar las células al menos tres veces con la disolución salina tamponizada con fosfato.
2. Usando el cuentagotas suministrado, añadir dos gotas de reactivo de globulina anti-humana poliespecífico.
3. Mezclar bien y centrifugar los tubos a 13 rcf durante 60 segundos, o durante un período y rcf adecuados.
4. Volver a suspender cuidadosamente el depósito de células rojas y observar macroscópicamente la posible aglutinación y si fuera necesario, al microscopio.

### **D. Ensayo en Microplaca - Fuerza iónica normal**

1. Preparar una suspensión al 3% de células rojas lavadas en una disolución salina tamponizada con fosfato.
2. Poner 70 microlitros de suero en la cubeta de una microplaca de cubetas V.
3. Añadir 35 microlitros de la suspensión de células al 3% (deberán hacerse controles positivos y negativos adecuados).
4. Agitar la placa para mezclar los reactivos e incubar durante 45 minutos entre 36°C y 38°C.
5. Centrifugar la placa a 100 rcf durante 1 minuto o durante un período y rcf adecuados.
6. Retirar el líquido sobrenadante y agitar la placa.
7. Lavar la placa 5 veces en la disolución salina tamponizada con fosfato.
8. Usando el cuentagotas suministrado añadir en cada cubeta 2 gotas de reactivo de globulina anti-humana poliespecífico.
9. Agitar la placa y centrifugar a 100 rcf durante 60 minutos o durante un período y rcf adecuados.
10. Inclinar la placa a un ángulo de 45 grados y observar hasta que el control negativo haya escurrido y el control positivo permanezca en forma de depósito en la cubeta en V.

### **E. Ensayo en microplaca - Baja fuerza iónica.**

1. Preparar una suspensión al 3% de células rojas lavadas en una disolución salina tamponizada con fosfato.
2. Poner 35 microlitros de suero en la cubeta de una microplaca de cubetas V.
3. Añadir 35 microlitros de una suspensión de células al 3% en LISS (debe hacerse un control + y - adecuado).
4. Agitar la placa para mezclar los reactivos e incubar durante 15 minutos entre 36°C y 38°C.
5. Centrifugar la placa a 100 rcf durante 1 minuto o a una rcf y tiempo adecuados.
6. Retirar el sobrenadante y agitar la placa.
7. Lavar la placa 5 veces en la disolución salina tampón de fosfato.
8. Usando el cuentagotas suministrado agregar en cada cubeta 2 gotas de reactivo de globulina anti-humana poliespecífica.
9. Centrifugar la placa a 100 rcf durante 60 minutos o durante un período y rcf adecuados.
10. Inclinar la placa a un ángulo de 45 grados y observar hasta que el control negativo haya fluido y el control positivo permanezca en forma de botón en la cubeta en V.

### **F. Ensayo de anti - Globulina directo.**

1. Las muestras de sangre obtenidas mediante el ensayo de antiglobulina directo deberán recogerse en recipientes que contienen EDTA como anticoagulante.
2. Preparar una suspensión al 3% de células rojas en una disolución salina tamponizada con fosfato.
3. Poner 50 microlitros de suero en un tubo adecuado.
4. Lavar las células tres veces con una disolución salina tamponizada con fosfato.
5. Usando el cuentagotas suministrado, agregar dos gotas de reactivo de globulina anti-humana poliespecífico.
6. Mezclar bien y centrifugar los tubos a 130 rcf durante 60 segundos, o durante un período y rcf adecuados.
7. Volver a suspender cuidadosamente el depósito de células rojas y observar macroscópicamente y microscópicamente cuando sea necesario la posible aglutinación.
8. Incubar todos los ensayos negativos o débilmente positivos durante 5 minutos a temperatura ambiente (límites entre 18°C y 22°C) volver a centrifugar los ensayos y volver a examinar la posible aglutinación.

## **CONTROL DE CALIDAD**

1. Control de la sensibilidad global de la técnica antiglobulina indirecta adjuntando un anticuerpo IgG débil en cada lote de ensayos.
2. Añadir células recubiertas con anticuerpo IgG a todos los ensayos de antiglobulina directos e indirectos negativos.
3. Se deberá utilizar un control negativo adecuado.

### **LIMITACIONES DE LA PRUEBA**

Las células rojas VI de tipo D y ciertas células rojas D no serán aglutinadas directamente por este reactivo. Pueden producirse resultados falsamente positivos o negativos debido a la contaminación de los materiales de ensayo o cualquier desviación de las técnicas recomendadas.