

# Imuno-Hemato Albumina Bovina 22%

Reagente para aumentar a reatividade dos anticorpos e reduzir o tempo de execução dos testes de antiglobulina humana indireta (Teste de Coombs Indireto).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reactivo para aumentar la reactividad de los anticuerpos y reducir el tiempo de ejecución de la prueba de antiglobulina indirecta (test de Coombs indirecto).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

**[**REF **]** **1057010-D** - 10ml

**[**REF **]** **1057050-D** - 50ml

**[**REF **]** **1057100-D** - 100ml

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

## PORTUGUÊS

**IMPORTÂNCIA CLÍNICA**

O sistema Rh foi descoberto por Wiener, Landsteiner e Levine em 1940 quando faziam estudos de sensibilização Em meio salino (NaCl 0,85%), ions positivos de sódio (Na+) são atraídos para junto das hemácias, criando uma camada dupla de cargas positivas, que gera uma forte repulsão interglobular. A nuvem de íons positivos que envolve cada hemácia torna-se menos densa à medida que se distancia da hemácia. A diferença de potencial elétrico criada entre a camada dupla de ions positivos (Na+) próxima da hemácia e o meio com ions de sódio e cloro em equilíbrio (neutro), é chamada “Potencial Zeta”. A força de repulsão entre as hemácias, em meio salino, depende do valor do potencial Zeta.

A aglutinabilidade de um sistema é maior quanto mais baixo for o valor do potencial Zeta. Pollack relacionou os termos da sua expressão, de acordo com a seguinte equação:

*Z* = 



γ
D
√
μ


{\displaystyle Z={\frac {\gamma }{D{\sqrt {\mu }}}}}

onde:

γ = carga elétrica da hemácia

D = constante dielétrica

μ = força iônica do meio

Esta equação mostra que as reduções do potencial Zeta aumentam a aglutinabilidade do sistema, ou até mesmo promovem a aglutinação das hemácias em suspensão se o potencial Zeta crítico (Zc) é atingido.

Como o potencial Zeta crítico (Zc) da suspensão de hemácias sensibilizadas por anticorpos anti-RhD de classe IgM é superior, em valor absoluto, ao da própria suspensão em NaCl 0,85%, estes anticorpos são ditos “aglutinantes”. Ao contrário, o potencial Zeta crítico (Zc) na presença de anticorpos anti-RhD de classe IgG, sendo inferior ao da suspensão em NaCl 0,85%, não ocorre aglutinação das hemácias e estes anticorpos são ditos “não aglutinantes”.

O teste da antiglobulina humana ou teste de Coombs representa a forma mais importante de aglutinação artificial em imunohematologia. Por um procedimento imunológico, essa reação nos permite revelar a presença de anticorpos "não aglutinantes" na membrana eritrocitária.

A sensibilidade do Teste de Coombs Indireto pode ser aumentada por procedimentos que modificam a primeira etapa da reação, ou seja, da fixação dos anticorpos durante a incubação. Um dos procedimentos mais utilizados é a adição de albumina bovina a 22% ao meio.

A adição de albumina bovina a 22% aumenta a constante dielétrica (D) do meio de suspensão e baixa o valor do potencial Zeta (Z), favorecendo a aglutinação das hemácias. Favorece, também, a fixação inicial dos anticorpos à membrana eritrocitária pela dissipação de ions positivos próximos à membrana.

O ***Imuno-HEMATO ALBUMINA BOVINA 22%*** da **WAMA** é uma solução para potencializar a sensibilidade do teste de gamaglobulina humana, Coombs indireto, na detecção de anticorpos anti-Rh (D) “incompletos”, podendo ser utilizado em testes de compatibilidade, na identificação e triagem de anticorpos. O uso da albumina bovina também permite a redução do tempo de realização do teste.

**PRINCÍPIO DO MÉTODO**

O procedimento do ensaio é baseado no princípio da aglutinação, onde células vermelhas possuindo o antígeno correspondente aglutinarão na presença do anticorpo específico dirigido contra o antígeno. O uso da albumina bovina a 22% amplificará a sensibilidade do teste.

**APRESENTAÇÃO DO KIT**

**[**REF **]** **1057010-D – 10ml**

1. Albumina Bovina a 22% (1 x 10 ml)

2. Instruções para uso

**[**REF **]** **1057050-D – 50ml**

1. Albumina Bovina a 22% (5 x 10 ml)

2. Instruções para uso

**[**REF **]** **1057100-D – 100ml**

1. Albumina Bovina a 22% (10 x 10 ml)

2. Instruções para uso

**PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REATIVOS**

• **ALBUMINA BOVINA 22% (1)**: pronto para uso. Estável entre 2 – 8 °C até a data de vencimento impressa na etiqueta do frasco. Armazenamento inadequado prejudica a eficácia do reagente. Contém azida sódica < 0,095% (w/v) como conservante. Fornecido em frascos conta-gotas com volume de 50 µl por gota. **NÃO CONGELAR**. Somente para uso in vitro.

Obs.: O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização, e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que mantido na temperatura indicada (2- 8°C).

**AMOSTRAS**

Usar amostra de sangue fresco. Evitar amostras hemolizadas.

Se não for possível realizar os testes após a coleta, a amostra deve ser conservada refrigerada entre 2 – 8°C.

O armazenamento prolongado da amostra pode causar deterioração do antígeno e resultar em classificação incorreta.

**MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO**

- Tubos testes (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm)
- Micropipeta de 50µl, 100µl e 1000µl, e ponteiros
- Centrífuga
- Solução salina fisiológica 0,85 ou 0,9%
- Banho Maria
- Recipiente para descarte de material.

**PROCEDIMENTO**

**I. PESQUISA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM PROVA INDIRETA DA GLOBULINA ANTI-HUMANA (COOMBS INDIRETO)**

Seu objetivo é o de detectar anticorpos dos grupos sanguíneos capazes de causar reações hemolíticas. É realizada em 4 fases: a 1ª, 2ª e 3ª fases são mais eficientes na detecção de IgM, enquanto a 4ª fase detecta IgG.

**1ª FASE: Meio Salino à Temperatura Ambiente**

- Preparar uma suspensão a 5% de hemácias compatíveis com o soro do paciente (geralmente do grupo “O”, Rh positivo), as quais deverão ser lavadas em solução salina isotônica (lavar as hemácias 3 vezes em salina a 0,85% ou 0,9% e, em um tubo de ensaio 12 x 75 mm, pipetar 50 µl das hemácias lavadas + 1 ml de salina. Outros volumes podem ser usados). Há hemácias comerciais para a realização do teste.
- Em um tubo de ensaio 10 x 75 mm ou 12 x 75 mm marcado, pipetar 50 µl da suspensão de hemácias a 5%.
- Pipetar no mesmo tubo 100 µl do soro a ser testado.
- Homogeneizar através de leve agitação e centrifugar a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) por 1 minuto.
- Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação e/ou hemólise.

**2ª FASE: Meio Protéico à Temperatura Ambiente**

- Pipetar no mesmo tubo acima 100 µl (2 gotas) de Albumina Bovina a 22% (1).
- Homogeneizar através de leve agitação e centrifugar a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) por 1 minuto.
- Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação e/ou hemólise.

**3ª FASE: Meio Protéico à Temperatura de 37°C**

- Incubar o tubo a 37°C por 15-30 minutos.
- Centrifugar a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) por 1 minuto.
- Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação e/ou hemólise.

**4ª FASE: Antiglobulina Humana (Coombs Indireto)**

- Completar o tubo com solução salina fisiológica e centrifugar a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) por 1 minuto.
- Decantar o sobrenadante por inversão do tubo, ressuspender o sedimento de hemácias e completar novamente com a solução salina fisiológica. Repetir esse procedimento por 3 vezes.
- Após a última lavagem, decantar completamente o sobrenadante, invertendo o tubo e enxugando a borda com papel de filtro.
- Pipetar 100 µl (2 gotas) do SORO DE COOMBS da WAMA.
- Homogeneizar através de leve agitação e centrifugar a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) por 1 minuto.
- Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação.

**INTERPRETAÇÃO DO TESTE:**

**TESTE POSITIVO**: presença de aglutinação e/ou hemólise em uma ou mais fases do teste, caracterizando presença de anticorpos irregulares.

**TESTE NEGATIVO**: ausência de aglutinação e/ou hemólise em todas as fases do teste, caracterizando ausência de anticorpos irregulares.

**II. TITULAÇÃO DE ANTICORPOS EM MEIO PROTÉICO**

- Preparar uma suspensão a 5% de hemácias contendo o antígeno cujo anticorpo se pretende titular, as quais deverão ser lavadas em solução salina fisiológica (lavar as hemácias 3 vezes em salina a 0,85% ou 0,9% e, em um tubo de ensaio 12 x 75 mm, pipetar 50 µl das hemácias lavadas + 1 ml de ALBUMINA BOVINA 22%. Outros volumes podem ser usados).
- Numerar tubos de ensaio 12 x 75 mm, conforme o quadro abaixo.
- Pipetar em cada tubo, a partir do 2º tubo, 100 µl (2 gotas) da ALBUMINA BOVINA 22%.
- Pipetar 100 µl do soro, cujo anticorpo se pretende titular, nos tubos 1 e 2. Usando uma ponteira descartável, homogeneizar a solução do tubo 2 e transferir 100 µl do homogeneizado para o tubo 3. Repetir o procedimento até o tubo 10, sempre usando uma ponteira para cada diluição.
- Pipetar 100 µl da suspensão de hemácias a 5% em ALBUMINA BOVINA 22% em cada tubo.
- Homogeneizar através de leve agitação e incubar a 37°C por 15 minutos.
- Centrifugar a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) por 1 minuto.
- Ressuspender delicadamente o botão de hemácias de cada tubo e examinar a presença ou não de aglutinação. Anotar os resultados.
- Nos tubos cuja aglutinação for fraca (1+) ou ausente, realizar o teste da Antiglobulina Humana (vide 4ª Fase da Prova de Compatibilidade).

No. Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Albúmina	4+	3+	2+	1+	½+	0	0	0	0	0
Antiglobulina	-	-	-	3+	2+	1+	½+	0	0	0
TÍTULO	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512

Diagrama de um teste de Coombs indireto. O teste é realizado em 4 fases: a 1ª, 2ª e 3ª fases são mais eficientes na detecção de IgM, enquanto a 4ª fase detecta IgG.

**INTERPRETAÇÃO DO TESTE:**

O título do anticorpo será a maior diluição que apresentar aglutinação no teste da Antiglobulina Humana (Teste de Coombs Indireto). No quadro acima o título seria de 1:64.

**ESPECIFICIDADE DO TESTE**

O desempenho do ***Imuno-HEMATO*** Albumina Bovina foi avaliada em 91 amostras colhidas com os anticoagulantes recomendados. A avaliação demonstrou especificidade de 100% de cada reagente quando comparados com os resultados de um Kit utilizado no mercado.

**Coefficiente de Variação (inter ensaio / intra ensaio) / Limite de Aplicação:**
**a. Precisão Intra-Ensaio**
Foram selecionadas 2 amostras do controle de qualidade (2 negativas) para realizar o teste de repetibilidade. Foram feitas 20 repetições do teste com mesmo operador no mesmo dia. De acordo com os testes realizados, foi verificado que o kit ***Imuno-Hemato Albumina Bovina 22%*** repetiu de maneira satisfatória os resultados com as amostras testadas nas mesmas condições.

**b. Precisão Inter-Ensaio**
Foram selecionadas 10 amostras do controle de qualidade (10 negativas) para realizar o teste de reprodutibilidade; foram realizados 03 testes com as mesmas amostras em dias e operadores diferentes e com mesmo lote. De acordo com os testes realizados, foi verificado que o kit ***Imuno-Hemato Albumina Bovina 22%*** reproduz de maneira satisfatória os resultados com as amostras testadas mesmo em diferentes condições.

**LIMITAÇÕES DE USO**

- Resultados falso-positivos e negativos podem ocorrer por contaminação dos materiais do ensaio, concentração inadequada das suspensões de células, tempo de incubação ou temperatura inadequados, ou por erros de procedimento.
- Os tempos de centrifugação mencionados são meras sugestões. Um tempo de centrifugação adequado deve ser determinado por cada laboratório, e será aquele que produz a mais forte reação do anticorpo com o antígeno nas reações positivas, mas também que permita a ressuspensão fácil do botão de hemácias.

- Reações mais fracas podem ser observadas com sangue armazenado do que com sangue fresco.
- Armazenamento inadequado prejudica a eficácia do reagente.
- Os procedimentos descritos são para uso com o soro de Coombs da WAMA. A princípio, soro de Coombs de outros fabricantes pode ser usado, mas o Laboratório deve seguir os procedimentos desses fabricantes. Também o Laboratório deve seguir procedimentos de validação aprovados para demonstrar a compatibilidade desses produtos.

**PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS**

- Os reagentes devem ser conservados entre 2 – 8 °C.
- A data de validade corresponde ao último dia do mês assinalado nos rótulos dos frascos e da caixa do kit.
- Deve ser evitado expor os reagentes a temperaturas elevadas, bem como diretamente ao sol.
- Não congelar nenhum reagente, pois isto causará deterioração irreversível.
- O ***Imuno-HEMATO ALBUMINA BOVINA 22%*** da **WAMA**, embora seja derivado de fonte animal, não se pode afirmar que esteja isento de agentes infecciosos. Portanto, recomenda-se tratar todos os reagentes como materiais potencialmente infecciosos, bem como ter o mesmo cuidado no descarte destes materiais.
- Como se emprega azida sódica como conservante dos reagentes, o descarte dos reativos deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, pois esta pode reagir com chumbo ou cobre formando sais altamente explosivos. Além disso, a azida é tóxica quando ingerida.
- Deixar os reagentes adquirir a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de iniciar os testes.
- Os reagentes devem ser tampados imediatamente após o uso.
- Não usar reagentes após a data de validade.
- Os procedimentos informados são apenas para testes manuais. Ao usar instrumentos automáticos ou semiautomáticos, deve ser seguido o procedimento que está contido no manual do operador fornecido pelo fabricante do instrumento.
- Descartar o material conforme regulamentações locais.
- Utilizar a Boas Práticas de Laboratórios (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

**TERMO DE GARANTIA**

A **WAMA Diagnóstica** garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A **WAMA** e seus distribuidores não se responsabilizarão por falhas no desempenho do kit sob essas condições.

## ENGLISH

**SUMMARY**

The Rh system was discovered by Wiener, Landsteiner and Levine in 1940 when they were studying sensitization. In saline solution (NaCl 0.85%), positive ions of sodium (Na+) are attracted to the erythrocytes, creating a double layer of positive charges, which generates a strong interglobular repulsion. The cloud of positive ions that involves each erythrocyte becomes less dense as it moves away from the erythrocyte. The difference of electric potential created between the double layer of positive ions (Na+) next erythrocyte and the middle with ions of sodium and chlorine in equilibrium (neutral), is called "Zeta Potential". The force of repulsion between the erythrocytes, in saline, depends on the value of the Zeta potential. The agglutinability of a system is greater the lower the value of the Zeta potential. Pollack has enlisted the terms of its expression, according to the following equation:

*Z* = 



γ
D
√
μ


{\displaystyle Z={\frac {\gamma }{D{\sqrt {\mu }}}}}

where:

γ = electric charge of erythrocyte

D = dielectric constant

μ = ionic strength of the medium

This equation shows that the reductions in Zeta potential increase the agglutinability of system, or even promote the agglutination of erythrocytes in suspension if the critical Zeta potential (Zc) is reached.

As the critical Zeta potential (Zc) of suspension of sensitized red blood cells by anti RhD antibodies of IgM class is greater, in absolute value, the suspension itself in NaCl 0.85 %, these antibodies are called "binders". In contrast, the critical Zeta potential (Zc) in the presence of IgG anti-RhD antibodies, being lower than the suspension in 0.85% NaCl, no agglutination of erythrocytes occurs and these antibodies are called "non binders". The human antiglobulin test or Coombs test represents the most important way of artificial agglutination in immunohematology. By an immunological procedure, this reaction allows us reveal the presence of "non-binding" antibodies in the erythrocyte membrane. The sensitivity of the Indirect Coombs Test can be increased by procedures that modify the first step of the reaction, i.e. the setting of antibodies during incubation. One of the most used procedures is the addition of bovine serum albumin at 22%. The addition of 22% bovine albumin increases the dielectric constant (D) of suspension

medium and lowers the Zeta potential value (Z), favoring the agglutination of erythrocytes. Also favors the initial fixation of antibodies to erythrocyte membrane by the dissipation of positive ions near the membrane.

The **Imuno-HEMATO ALBUMINA BOVINA 22%** from **WAMA** is a solution to enhance the sensitivity of the human gamma globulin test, indirect Coombs, in the detection of "incomplete" anti-Rh (D) antibodies, and can be used in tests of compatibility, the identification and screening of antibodies. The use of bovine albumin also allows the time reduction for the completion of the test.

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

The procedure of the test is based on the principle of agglutination, where red blood cells possessing the corresponding antigen will agglutinate in the presence of specific antibody directed against the antigen. The use of 22% bovine serum albumin will amplify the sensitivity of the test.

**KIT PRESENTATION**

**[**REF **]** **1057010-D – 10ml**

1. 22% Bovine Albumin (1 x 10 mL)

2. Instructions for use

**[**REF **]** **1057050-D – 50ml**

1. 22% Bovine Albumin (5 x 10 mL)

2. Instructions for use

**[**REF **]** **1057100-D – 100ml**

1. 22% Bovine Albumin (10 x 10 mL)

2. Instructions for use

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

Reagent to increase the reactivity of the antibodies and reduce the execution time of the indirect human antiglobulin test (indirect Coombs Test).

**4TH PHASE: Human Antiglobulin (Indirect Coombs)**

12. Complete the tube with physiological saline solution and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.

13. Decant the supernatant by inverting the tube, resuspend the erythrocyte pellet and complete again with physiological saline solution. Repeat this procedure 3 times.

14. After the last wash, decant the supernatant completely, inverting the tube and drying the edge with filter paper.

15. Pipette 100 µl (2 drops) of **SORO DE COOMBS from WAMA**.

16. Mix by gentle agitation and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.

17. Gently resuspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination.

**TEST INTERPRETATION:**

**POSITIVE TEST:** presence of agglutination and/or hemolysis in one or more phases of the test, characterizing presence of irregular antibodies.

**NEGATIVE TEST:** absence of agglutination and/or hemolysis in all phases of the test, characterizing absence of irregular antibodies.

**II. TITRATION OF ANTIBODIES IN PROTEIC MEDIUM**

1. Prepare a suspension in 5% erythrocytes containing antigen whose antibody is intended to titrate, which should be washed in physiological saline solution (wash the cells 3 times in 0.85% or 0.9% saline solution, pipette 50 µl of washed erythrocytes + 1 mL de 22% BOVINE ALBUMIN into a 12 x 75 mm test tube. Other volumes can be used).

2. Number 12 x 75 mm test tubes, according to the table below.

3. Pipet into each tube, starting from the 2nd tube, 100 µl (2 drops) of 22% bovine albumin.

4. Pipette 100 µl of serum, whose antibody is intended to titrate, into tubes 1 and 2. Using a disposable pipette tip, homogenize the solution of tube 2 and transfer 100 µl of the homogenate to tube 3. Repeat the procedure until the tube 10, always using a pipette tip for each dilution.

5. Dispense 100 µl of the suspension of 5% erythrocytes into 22% bovine albumin in each tube.

6. Mix by gentle agitation and incubate at 37°C for 15 minutes.

7. Centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.

8. Gently resuspend the button of erythrocytes of each tube and examine for the presence of agglutination. Record the results.

9. Tubes whose agglutination is weak (1+) or absent, perform the Human Antiglobulin test (see Phase 4 of compatibility Test).

<b>Tube No.</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Albumin</b>	4+	3+	2+	1+	½+	0	0	0	0	0
<b>Antiglobulin</b>	-	-	-	3+	2+	1+	½+	0	0	0
<b>TITER</b>	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16 AM	1:32 AM	1:64	1:128	1:256	1:512

**INTERPRETATION OF THE TEST:**
The titer of the antibody will be the highest dilution that shows agglutination in the Human Antiglobulin Test (Indirect Coombs). In table above the title would be 1:64.

**TEST SPECIFICITY:**

The performance of the ***Imuno-HEMATO*** Albumina Bovina 22% was evaluated in 91 samples collected with the recommended anticoagulants. The evaluation showed 100% specificity for each reagent when compared with the results of a Kit used on the market.

**Coefficient of Variation (inter / intra assay test) / Application Limit:**

**a.Intra-Assay Precision**

2 samples were selected from quality control (2 negative) to perform the repeatability test. 20 repetitions of the test was done by the same operator on the same day.

According to the tests carried out, it was verified that the kit ***Imuno-Hemato Albumina Bovina 22%*** repeated satisfactorily the results with the samples to be tested under the same conditions.

**b.Inter-Assay Precision**

10 samples were selected from quality control (10 negatives) to perform the test of reproducibility; 3 tests were performed with the same samples in different days and technicians and with same lot.

According to the tests carried out, it was verified that the kit ***Imuno-Hemato Albumina Bovina 22%*** repeated satisfactorily the results with the samples to be tested even under different conditions.

**LIMITATIONS OF USE**

- False-positive and negative results can occur due to contamination of the test materials, inadequate concentration of suspensions of cells, inadequate incubation time or temperature, or errors of procedure.
- The centrifugation times mentioned are recommendations. A appropriate centrifugation time must be determined by each laboratory, and will be the one that produces the strongest reaction of the antibody with the antigen in positive reactions, and will also to allow for easy resuspension of RBC buttons.
- Weaker reactions will occur more frequently with stored blood than with fresh blood.
- Improper Storage affects the effectiveness of the reagent.
- The described procedures are for use with the Coombs sera of **WAMA**. As a principle, Coombs sera from other manufacturers may be used, but the Laboratory must follow the

procedures of these manufacturers. Also the laboratory must follow approved validation procedures to demonstrate the compatibility of these products.

**PRECAUTIONS AND WARNINGS**

1. The reagents should be kept between 2 - 8 °C.

2. The expiry date refers to the last day of the month indicated on the labels of the vial and of the kit box.

3. Avoid exposing the reagents to high temperatures and direct sunlight.

4. Do not freeze the reagent, as this may cause irreversible damage.

5. The ***Imuno-HEMATO ALBUMINA BOVINA 22%*** from **WAMA**, though derived from animal source, cannot assume to be free of infectious agents. Therefore, it is recommended to treat all reagents as potentially infectious, as well as having the care in disposing of these materials.

6. Because there is sodium azide as a preservative in the reagents, the disposal of reagents must be followed by large volumes of water to prevent azide buildup in pipes, because this can react with lead or copper, forming highly explosive salts. Furthermore, the azide is toxic when ingested.

7. Allow the reagents to reach the room temperature (20 -25°C) before starting the test.

8. The reagents must be capped immediately after use.

9. Do not use the reagent after the expiration date.

10. The procedures are only for manual testing. When using automatic or semi-automatic instruments, procedure contained in the operator's manual provided by the instrument manufacturer must be followed.

11. Discard the material following local regulations.

12. Use the Good Laboratory Practices (GLPs) in storage, handling and disposal of materials.

**WARRANTY**

**WAMA Diagnóstica** guarantees the exchange of the diagnostic kit, provided it is within the expiration date and is proven by its technical support that there were no technical mistakes in the execution, handling and storage of this product. **WAMA** and its distributors are not liable for failures on the performance of the kits under these conditions.

## ESPAÑOL

**IMPORTANCIA CLÍNICA**

El sistema Rh fue descubierto por Wiener, Landsteiner y Levine en 1940 cuando estudiaban sensibilización. En solución salina (0,85% NaCl), iones positivos de sodio (Na+) son atraídos por los eritrocitos, creando una doble capa de cargas positivas, lo que genera una fuerte repulsión interglobular. La nube de iones positivos que envuelve cada eritrocito se vuelve menos denso cuando se aleja del eritrocito. La diferencia de potencial eléctrico entre la doble capa de iones positivos (Na+) junto a eritrocitos y el medio con los iones de sodio y cloro en equilibrio (punto muerto), se denomina "Potencial Zeta". La fuerza de repulsión entre los eritrocitos, en la salina, depende del valor del potencial zeta.

La capacidad de aglutinación de un sistema es mayor cuanto menor sea el valor del potencial zeta. Pollack ha contratado los términos de su expresión, de acuerdo con la siguiente ecuación.

<span><i>Z</i></span>	=	<span><span>    γ<!-- γ -->  D  √<!-- √ --> μ<!-- μ -->     {\displaystyle \gamma \over D{\sqrt {\mu }}}  </span></span>
-----------------------	---	--

Donde:

γ = carga eléctrica de eritrocitos

D = constante dieléctrica

μ = fuerza iónica del medio

Esta ecuación muestra que reducciones de potencial zeta aumenta la aglutinabilidad del sistema, o incluso promover la aglutinación de eritrocitos en suspensión si se alcanza el potencial zeta (Zc).

A medida que el potencial zeta crítico (Zc) de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos anti-RhD de clase IgM es mayor, en valor absoluto, la propia suspensión en 0,85% NaCl, estos anticuerpos se denominan "aglutinantes". En contraste, el potencial Zeta crítica (Zc) en presencia de anticuerpos IgG anti - RhD, siendo más baja que la suspensión en 0,85% de NaCl, no se produce aglutinación de los eritrocitos y los anticuerpos se denominan "no carpetas"

La prueba de antiglobulina humana o prueba de Coombs representa la forma más importante de aglutinación en inmunohematología. Por un procedimiento inmunológico, esta reacción nos permite revelar la presencia de anticuerpos "non-binding" en la membrana del eritrocito.

La sensibilidad de la prueba de Coombs indirecta puede ser aumentado por los procedimientos que modifican el primer paso de la reacción, es decir, de la fijación de anticuerpos durante la incubación. Uno de los procedimientos más utilizados es la adición de albúmina de suero bovino al 22%. La adición de albúmina bovina 22% aumenta la constante dieléctrica (D) de lo medio de suspensión y reduce el potencial zeta (Z), favoreciendo la aglutinación de eritrocitos. También favorece la fijación inicial de anticuerpos a membrana de los eritrocitos por la disipación de iones positivos cerca la membrana.

La ***Imuno-HEMATO ALBÚMINA BOVINA 22%*** de **WAMA** es una solución para

mejorar la sensibilidad del test gammaglobulina humana, Coombs indirecto, en la detección de anticuerpos "incompletos" anti-Rh (D) y se pueden utilizar en las pruebas de compatibilidad, la identificación y detección de anticuerpos. El uso de albúmina bovina también permite la reducción de el tiempo necesario para la realización de la prueba.

**PRINCIPIO DEL MÉTODO**

El procedimiento del ensayo se basa en el principio de aglutinación, donde las células rojas de los individuos que poseen antígeno correspondiente en su superficie aglutinarán en presencia del anticuerpo específico dirigido contra el antígeno. Lo uso de albúmina sérica bovina 22% amplificará la sensibilidad de la prueba.

**PRESENTACIÓN DEL KIT**

**1057010-D – 10ml**

1. 22% Albúmina Bovina (1 x 10 ml)

2. Instrucciones de uso

**1057050-D – 50ml**

1. 22% Albúmina Bovina (5 x 10 ml)

2. Instrucciones de uso

**1057100-D – 100ml**

1. 22% Albúmina Bovina (10 x 10 ml)

2. Instrucciones de uso

**PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE REACTIVOS**

- 22% ALBÚMINA BOVINA (1):** Listo para usar. Estable a 2 - 8 °C hasta la fecha de caducida impresa en el envase. Almacenamiento inadecuado afecta a la eficacia del reactivo. Contiene azida de sodio < 0,095 % (p/v) con conservante. Se suministra en frascos de goteo con un volumen de 50µl por gota. NO CONGELAR. Para uso diagnóstico in vitro.

Nota: El kit mantiene el mismo rendimiento después de la primera utilización, y es estable hasta la fecha de caducidad descrita en la etiqueta, siempre que se mantenga a la temperatura indicada (2 - 8°C).

**ESPECÍMENES**

Utilice muestra de sangre fresca. Evite muestras hemolizadas.

Si no es posible realizar las pruebas después de la recolección, la muestra debe mantenerse refrigerada a una temperatura de 2 - 8 °C.

El almacenamiento a largo plazo de la muestra puede provocar el deterioro de los antígenos y resultado de clasificación incorrecta.

**MATERIAL NECESARIO, PERO NO SUMINISTRADO**

- Tubos de ensayo (10 x 75 mm o 12 x 75 mm)
- Micropipeta de 50µl, 100µl y 1000µl y puntas de pipeta.
- Centrífuga
- Solución salina fisiológica 0,85 o 0,9 %
- Baño de agua
- Recipiente para descarte de material.

**PROCEDIMIENTO**

**I. ESTUDIO DE ANTICUERPOS IRREGULARES EN ANTI-GLOBULINA HUMANA INDIRECTA (COOMBS INDIRECTO)**

Su propósito es detectar anticuerpos de grupos sanguíneos capaces de provocar reacciones hemolíticas. Se lleva a cabo en 4 fases: la 1ª, 2ª, y 3ª etapas son más eficientes en la detección de IgM, mientras que la 4ª fase detecta IgG.

**1ª FASE: Solución salina a temperatura ambiente**

- Preparar una suspensión en 5% de eritrocitos lavados compatibles con el suero de paciente (generalmente de tipo O, Rh-positivo), que deben ser lavadas con solución salina fisiológica (lavar las células 3 veces en solución salina 0,85 % o 0,9 %, pipetear 50 µl de eritrocitos lavados + 1 ml de solución salina en un 12 x 75 mm tubo de ensayo. Otros volúmenes pueden ser utilizados). Existe RBC comerciales para realizar la prueba.
- En un tubo de ensayo etiquetado de 10 x 75 mm o 12 x 75 mm , pipetear 50 µl de suspensión de eritrocitos a 5%.
- Pipetear en el mismo tubo 100 µl del suero a ser probado.
- Mezclar por agitación suave y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- Re suspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación y/o hemólisis.

**2ª fase: Ambiente Proteico a temperatura ambiente**

- Pipetear en el mismo tubo anteriormente mencionado 100 µl (2 gotas) de albúmina bovina al 22% (1).
- Mezclar por agitación suave y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- Resuspende s suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación y/o hemólisis.

**3ª fase: Ambiente Proteico a 37°C**

9. Incubar los tubos a 37 °C por 15-30 minutos.

10. Centrifugar a 1,000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.

11. Resuspende r suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación y/o hemólisis.

**4º fase: Antiglobulina Humana (Coombs indirecto)**

12. Complete el tubo con solución salina fisiológica y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.

13. Decantar el sobrenadante invirtiendo el tubo, resuspenda el sedimento de eritrocitos y complete de nuevo con solución salina fisiológica. Repita este procedimiento 3 veces.

14.Después del último lavado, decantar el sobrenadante completamente, invirtiendo el tubo y secando la borda con papel de filtro.

15. Pipetear 100 µl (2 gotas) de **SORO DE COOMBS** de **WAMA**.

16. Mezclar por agitación suave y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.

17. Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación.

**INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA:**

**PRUEBA POSITIVA:** presencia de aglutinación y/o hemólisis en una o más fases de la prueba, caracterizando presencia de anticuerpos irregulares.

**PRUEBA NEGATIVA:** ausencia de aglutinación y/o hemólisis en todas las fases de la prueba, caracterizando ausencia de anticuerpos irregulares.

**II. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS EN MEDIO PROTEICO**

- Preparar una suspensión en eritrocitos 5% que contiene antígeno cuyo anticuerpo se destina a titular, que debe ser lavados en solución salina fisiológica (lavan las células 3 veces en solución salina 0,85 % o 0,9 %), pipetear 50 µl de eritrocitos lavados + 1 ml de ALBUMINA BOVINE 22% en un tubo de ensayo 12 x 75 mm. Otros volúmenes pueden ser utilizados).
- Numere tubos de ensayo 12 x 75 mm, de acuerdo con la tabla de abajo.
- Pipetear en cada tubo, a partir del 2º tubo, 100 µl (2 gotas) de albúmina bovina 22%.
- Pipetear 100 µl de suero, cuyo anticuerpo está destinada para titular, en los tubos 1 y 2. Utilizando una punta de pipeta desechable, homogeneizar la solución del tubo 2 y transferir 100 µl del homogeneizado al tubo 3. Repetir el procedimiento hasta el tubo 10, siempre utilizando una punta de pipeta para cada dilución.
- Pipete 100 µl de la suspección de eritrocitos al 5% en 22% albúmina bovina en cada tubo.
- Homogeneizar por agitación suave e incubar a 37º C por 15 minutos.
- Centrifugar a 1,000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación. Registre los resultados.
- Tubos cuya aglutinación es débil (1+) o ausente, realizar la prueba de antiglobulina humana (ver Fase 4 del Test de compatibilidad).

<b>No. Tubo</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Albúmina</b>	4+	3+	2+	1+	½+	0	0	0	0	0
<b>Antiglobulina</b>	-	-	-	3+	2+	1+	½+	0	0	0
<b>TÍTULO</b>	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512

**INTERPRETACIÓN DEL TEST:**

El título de anticuerpos será la mayor dilución que muestra aglutinación en la prueba de antiglobulina humana (Coombs indirecto). En la tabla anterior el título sería 1:64.

**ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA:**

El rendimiento de ***Imuno-HEMATO*** Albumina Bovina 22% fue evaluada en 91 muestras obtenidas con los anticoagulantes recomendados. La evaluación demuestra una especificidad del 100% de cada uno de los reactivos en comparación con los resultados de un Kit en el mercado.

**Coefficiente de variación (prueba inter/intra ensayo) / Límite de Aplicación:**

**a. Precisión Intraensayo**

Se seleccionaron 2 muestras de control de calidad (2 negativos) para realizar la prueba de repetibilidad. 20 repeticiones del test fueran corridas por el mismo técnico en mismo día.

De acuerdo a las pruebas realizadas, se verificó que el kit ***Imuno-Hemato Albumina Bovina 22%***, repitió satisfactoriamente los resultados con las muestras del ensayo en las mismas condiciones.

**b. Precisión Interensayo**

Se seleccionam 10 muestras de control de calidad (10 negativos) para realizar la prueba de reproducibilidad; 3 pruebas se han llevado a cabo con las mismas muestras en días y técnicos diferentes y con la misma suerte.

De acuerdo a las pruebas realizadas, se verificó que el kit ***Imuno-Hemato Albumina Bovina 22%***, repitió satisfactoriamente los resultados con las muestras de ensayo, incluso bajo diferentes condiciones.

**LIMITACIONES DE USO**

- Resultados falso positivos y negativos pueden ocurrir debido a la contaminación de los materiales de ensayo, concentración inadecuada de las suspensiones de células, insuficiente tiempo de incubación o temperatura, o errores de procedimiento.
- Los tiempos de centrifugación mencionadas son recomendaciones. Un tiempo de

centrifugación apropiado debe ser determinado por cada laboratorio, y será el que produce la reacción más fuerte del anticuerpo con el antígeno en las reacciones positivas, y también para permitir una fácil resuspensión de botones de RBC.

- Reacciones más débiles serán más frecuentes con sangre almacenada que con sangre fresca.

- Almacenamiento inadecuado afecta a la eficacia del reactivo.

• Los procedimientos descritos son para su uso con los sueros de Coombs de **WAMA**. Como principio, suero Coombs de otros fabricantes puede ser utilizado, pero el laboratorio deben seguir los procedimientos de estos fabricantes. También el laboratorio debe seguir los procedimientos de validación aprobados para demostrar la compatibilidad de estos productos.

**PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS**

1. Los reactivos deben conservarse entre 2 – 8 °C.

2. La fecha de caducidad se refiere al último día del mes indicado en las etiquetas de frasco y de la caja del kit.

3. Evite la exposición de los reactivos a altas temperaturas y la luz solar directa.

4. No congele el reactivo, ya que esto puede causar daños irreversibles.

5. La ***Imuno-HEMATO ALBUMINA BOVINA 22%*** de **WAMA** , aunque derivados de origen animal, no puede dar por sentado que se libre de agentes infecciosos. Por lo tanto, se recomienda tratar todos los reactivos como materiales potencialmente infecciosos, así como tener cuidado al deshacerse de estos materiales.

6. Porque hay azida de sodio como conservante en los reactivos, la eliminación de los reactivos deben ser seguidos por los grandes volúmenes de agua con el fin de evitar acumulación de azida de los tubos, ya que este puede reaccionar con plomo o cobre, formando sales altamente explosivos. Por otra parte, la azida sódica es tóxico por ingestión.

7. Dejar que los reactivos adquieran la temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de iniciar los tests.

8. Los reactivos deben taparse inmediatamente después de su uso.

9. No utilice el reactivo después de la fecha de caducidad.

10. Los procedimientos son sólo para prueba manual. Al usar instrumentos automáticos o semiautomáticos, procedimiento que figura en el manual del operador proporcionado por el fabricante del instrumento debe ser seguido.

11. Desechar el material siguiendo regulaciones locales.

12. Utilice las Bases Prácticas de Laboratorio (BPL) en el almacenamiento, la manipulación y eliminación de los materiales.

**TÉRMINO DE GARANTÍA**

**WAMA Diagnóstica** garantiza el cambio del kit de diagnóstico, siempre que esté dentro de la fecha de caducidad y que ha sido probado por su apoyo técnico que no hubo errores técnicos en la ejecución, la manipulación y el almacenamiento de este producto. **WAMA** y sus distribuidores no se responsabiliza por fallas en el rendimiento de los kits en estas condiciones.

**BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA:**

- Nance, S., Garraty, G.: A new potientior of red blood cell antigen-antibody reactions. Am. J. Clin. Pathol., 87(5):633-5, 1987.
- Roy, T.C.F., Nicholson, G.S., Ala, F.A.: Blood grouping reagents. Preparationand application methods. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean series, 5,pp.87, 1993.
- Novaretti, M.C.Z., Morganti, L., Andreoli, M.A., Bellis, T., Dorhiac-Llacer, P.E., Chamone, D.A.F.: Controle de qualidade de reagentes de glóbulos vermelhos para detecção e identificação de anticorpos irregulares: experiência da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. Boletim de hematologia, 251, 1997.
- Brecher, M.E.: Technical Manual, 14 ed., Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2002.
- Westhoff, C. M.: The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. Transfusion, 44: 1663-1673, 2004.
- Standards for blood banks and transfusion services, 23 ed., Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2005.
- Moulds, M.K.: Review: monoclonal reagents and detection of unusual or rare phenotypes or antibodies. Immunohematology, 22 (2): 52-63, 2006.
- Van Kim, C., Colin, Y. and Cartron, J.: Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. Blood Reviews, 20: 93-110, 2006.

**SIMBOLOGIA / SIMBOLS / SIMBOLOGIA**

	O conteúdo é suficiente para ( n ) testes <p>Quantity sufficient for (n) tests</p> <p>O contenido es suficiente para ( n ) testes</p>		Número do lote <p>Lot Number</p> <p>Número del lote</p>
	Data limite de utilização <p>Expiry Date</p> <p>Fecha de la caducidad</p>		Número do catálogo <p>Catalog Number</p> <p>Número del catálogo</p>