

Imuno-Hemato Soro de Coombs

Reagente contendo uma mistura de anticorpos contra imunoglobulinas humana (anti-IgG policlonal) e fatores do complemento (anti-C3d monoclonal) para a realização dos testes de antiglobulina direta (teste de Coombs direto) e de antiglobulina indireta (teste de Coombs indireto) em tubo por técnica de aglutinação.

Imuno-Hemato Soro de Coombs

Reagent containing a mixture of antibodies against human immunoglobulin (polyclonalanti-IgG) and complement factors (monoclonal anti-C3d) to test direct antiglobulin (Coombs test) and indirect antiglobulin (indirect Coombs test) in tube through agglutination technique.

Reactivo que contiene una mezcla de anticuerpos contra la inmunoglobulina humana (polyclonal anti-IgG) y factores de complemento (monoclonal anti-C3d) para prueba de antiglobulina directa (prueba de Coombs) y antiglobulina indirecta (prueba de Coombs indirecto) en el tubo mediante técnica de aglutinación.

[REF]	1058010-D - 10ml
[REF]	1058050-D - 50ml
[REF]	1058100-D - 100ml

	WAMA Diagnóstica
	Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT
	CEP 13573-470 - São Carlos - SP - Brasil
	Fone 55 16 3377.9977 / Fax 55 16 3377.9970
	www.wamadiagnostica.com.br
	SAC 0800 772 9977

PORTUGUÊS

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Coombs, Mourant e Race, após alguns anos (1945) do descobrimento dos anticorpos anti-Rh, descreveram o teste de antiglobulina, que utiliza o soro de antioglobulina humana, preparado em coelhos, para detectar anticorpos Rh "incompletos". Hoje, o teste é utilizado para detectar a sensibilização in vivo das hemácias, ajudando no diagnóstico da doença hemolítica do recém-nascido e da anemia hemolítica autoimune, tornando-se, provavelmente, o teste mais universalmente aplicado em imuno-hematologia. Geralmente, os anticorpos envolvidos em reações transfusionais são de dois tipos, ou seja, completos e incompletos. Os completos aglutinam glóbulos vermelhos em meio salino e os incompletos sensibilizam células vermelhas sem aglutinação. Geralmente anticorpos de classe IgM e anticorpos IgG do tipo IgG1 e IgG3 fixam complemento. Assim, a lise celular, in vivo, é mediada através do sistema complemento.

O soro anti-humano de Coombs é utilizado em dois tipos de testes, o direto e o indireto. No direto, a globulina anti-humana é usada para detectar anticorpos adsorvidos às células vermelhas in vivo, e, portanto, anticorpos ligados aos glóbulos vermelhos do paciente; sendo utilizado no estudo da doença hemolítica do recém-nascido de mães Rh negativas, na investigação de anemias hemolíticas autoimunes, na hemólise induzida por drogas e nas reações hemolíticas pós-transfusionais. No teste indireto, a globulina anti-humana é usada para detectar anticorpos adsorvidos às células vermelhas do sangue in vitro, e, portanto, anticorpos livres no soro ou plasma; sendo utilizado na pesquisa e identificação de anticorpos irregulares e nos testes de compatibilidade.

O ***Imuno-HEMATO* SORO DE COOMBS** da **WAMA** é um soro de amplo espectro, anti-gama e não gama globulina humana, caracterizado por uma mistura de anticorpos contra imunoglobulinas e fatores do complemento, preparado por imunização de coelhos por IgG humana completa purificada (anti-IgG policlonal) e por cultura in vitro de hibridoma de rato (linhagem celular Bric-8) secretando anticorpo monoclonal anti-C3, de classe IgM (anti-C3d monoclonal). O reagente é de cor verde.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O procedimento do ensaio é baseado no princípio da aglutinação, onde células vermelhas lavadas de indivíduo com anticorpos ou fatores do complemento adsorvidos à sua superfície (Coombs Direto) ou anticorpos livres (Coombs Indireto) aglutinarão na presença da globulina anti-humana poliespecífica (Soro de Coombs), indicando um resultado positivo. O teste é considerado negativo quando não aparece aglutinação.

APRESENTAÇÃO DO KIT

[REF**]** **1058010-D – 10ml**

- Soro de Coombs (1 x 10 ml)
- Instruções para uso

[REF]	1058050-D – 50ml
[REF]	1058100-D – 100ml

[REF**]** **1058100-D – 100ml**

- Soro de Coombs (10 x 10 ml)
- Instruções para uso

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REATIVOS

• **SORO DE COOMBS (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, cloreto de sódio e albumina bovina. 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. De acordo com o anticoagulante utilizado as amostras deveriam ser testadas dentro dos seguintes prazos:	
• Heparina ou Oxalato de Sódio	: 2 dias
• EDTA ou Citrato de Sódio	: 14 dias
• ACD ou CPD	:28 dias

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

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

PROCEDIMENTO

Independente da técnica adotada deixar o reagente e as amostras atingir a temperatura ambiente antes de iniciar os testes.

I.PROVA DIRETA DA GLOBULINA ANTI-HUMANA (COOMBS DIRETO)

- Preparar uma suspensão a 5% de hemácias lavadas a ser testada 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 salina. Outros volumes podem ser usados).
- Em um tubo de ensaio 10 x 75 mm ou 12 x 75 mm marcado pipetar 50 µl da suspensão de hemácias a 5%.
- 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 (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.

II. PROVA INDIRETA DA GLOBULINA ANTI-HUMANA (COOMBS INDIRETO)

1. 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 incubar a 37 °C por 15-30 minutos.
- Retirar o tubo do Banho-Maria, completar 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 (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.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS (COOMBS DIRETO E INDIRETO)

REAÇÃO POSITIVA: visível aglutinação dos eritrócitos.

REAÇÃO NEGATIVA: ausência de aglutinação dos eritrócitos.

III.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 compatiáveis 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.

ESPECIFICIDADE DO TESTE

O desempenho do ***Imuno-HEMATO Soro de Coombs*** foi avaliada em 86 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 Soro de Coombs 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 Soro de Coombs reproduz de maneira satisfatória os resultados com as amostras testadas mesmo em diferentes condições.

LIMITAÇÕES DE USO

- Resultados falsos 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 antígeno 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.

- Recomenda-se utilizar hemácias e soros frescos, de preferência não refrigerados.
- A lavagem insuficiente dos eritrócitos pode causar falsos resultados negativos pela presença de globulinas séricas livres, neutralizando o Soro de Coombs.
- Recomenda-se usar sempre um controle positivo e negativo para controle da qualidade da técnica.

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 Soro de Coombs*** 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

ENGLISH

SUMMARY

Coombs, Mourant and Race, a few years after the discovery of anti-Rh antibodies(1945) , described the antiglobulin test, which uses human antiglobulin serum, prepared in rabbits, to detect "incomplete" Rh antibodies Today the test is used to detect in vivo sensitization of erythrocytes, helping in the diagnosis of newborn hemolytic disease and autoimmune hemolytic anemia, making it possibly the most widely used test in immunohaematology.

Generally the antibodies involved in transfusion reactions are of two types, complete and incomplete. The complete antibodies agglutinate red blood in saline solution and the incomplete sensitize red cells without agglutination. Usually IgM antibodies, and IgG1 and IgG3 types of IgG antibodies fix the complement. Thus, the cellular lysis, in vivo, is mediated through the complement system.

The anti-human globulin serum (Coombs reagent) is used in two types of tests: direct and indirect. In the direct, the anti-human globulin is used for detecting antibodies adsorbed to red blood cells in vivo, and, therefore, antibodies bound to red blood cells of the patient, which is used in the study of hemolytic disease of the newborn in negative Rh mothers, in the research of autoimmune hemolytic anemias, in drug induced hemolysis, and in post-transfusion hemolytic reactions. In the indirect test, the anti-human globulin is used for detecting antibodies adsorbed onto the red blood cells in vitro, and, therefore, free antibodies in serum or plasma, which is used in the research and identification of irregular antibodies and compatibility test.

The ***Imuno-HEMATO SORO DE COOMBS*** from **WAMA** is a serum of broad spectrum, human antigama and non gamma globulin, characterized by a mixture of antibodies against immunoglobulins and complement factors, prepared by immunization of rabbits with purified human IgG (polyclonal anti-IgG) and by in vitro culture of mouse hybridoma (cell line Bric-8) secreting anti-C3 monoclonal antibody, IgM class (monoclonal anti-C3d). The reagent is green in color.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The procedure of the test is based on the principle of agglutination, where washed red blood cells from individual with antibodies or complement factors adsorbed to their surface (Coombs) or antibody-free (Indirect Coombs) will agglutinate in the presence of anti-human globulin Serum poly specific (Coombs), indicating a positive result. The test is considered negative when no agglutination appears.

KIT PRESENTATION

[REF**]** **1058010-D - 10ml**

- Coombs Serum (1 x 10 ml)
- Instructions for use

[REF**]** **1058050-D - 50ml**

- Coombs Serum (5 x 10 ml)
- Instructions for use

[REF]	1058100-D - 100ml
[REF]	1058100-D - 100ml

REAGENT PREPARATION AND STABILITY

• **COOMBS SERUM (1):** ready for use. Stable at 2 – 8 °C until expiration date printed on the bottle. Improper Storage affects the effectiveness of the reagent. Contains sodium azide < 0.095% (w/v) as a preservative, sodium chloride and bovine serum albumin. DO NOT FREEZE. For in vitro diagnostic use only.

Note: The kit has the same performance after first use, and is stable until the expiration date described on the label if it is kept in the indicated temperature (2-8 °C).

SPECIMENS

Use fresh blood sample. Avoid hemolyzed samples.

If it is not possible to perform the tests after collection, the sample must be kept refrigerated at 2 – 8 °C. In accordance with the anticoagulant used, the samples should be tested within the following time limits:

- Heparin or Sodium Oxalate
- EDTA or Sodium Citrate
- ACD or CPD

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Test Tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm)
- Micropipette of 50 µl, 100 µl and 1000 ul and tips.
- Centrifuge
- Physiological saline Solution 0.85 or 0.9%
- Water Bath
- Container for material disposal.

PROCEDURE

Regardless of the technique used, let the reagent and the sample reach room temperature before starting the tests.

I. ANTI-HUMAN GLOBULIN TEST (DIRECT COOMBS)

- Prepare a suspension in 5% of washed erythrocytes to be tested 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 of saline into a 12 x 75 mm test tube. Other volumes can be used).
- In a labeled 10 x 75 mm or 12 x 75 mm test tube, pipette 50 µl of 5% erythrocytes suspension.
- Complete the tube with physiological saline solution and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- Decant the supernatant by inverting the tube, resuspend the erythrocyte pellet and complete again with physiological saline solution. Repeat this procedure 3 times.
- After the last wash, decant the supernatant completely, inverting the tube and drying the edge with filter paper.
- Pipette 100 µl (2 drops) of Coombs Sera (1).
- Mix by gentle agitation and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- Gently resuspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination.

II. INDIRECT ANTI-HUMAN GLOBULIN TEST (INDIRECT COOMBS)

- Prepare a suspension in 5% of washed erythrocytes compatible with the patient serum (usually from type O, positive Rh), 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 of saline into a 12 x 75 mm test tube. Other volumes can be used). There is commercial RBCs to perform the test.
- In a labeled 10 x 75 mm or 12 x 75 mm test tube, pipette 50 µl of 5% erythrocytes suspension.
- Pipette in the same tube 100 µl of the serum to be tested.
- Mix by gentle agitation and incubate at 37 ° C for 15-30 minutes.
- Remove the tube from the Water-Bath, complete with physiological saline solution and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- Decant the supernatant by inverting the tube, resuspend the erythrocyte pellet and complete again with physiological saline solution. Repeat this procedure 3 times.
- After the last wash, decant the supernatant completely, inverting the tube and drying the edge with filter paper.
- Pipette 100 µl (2 drops) of Coombs Sera (1).
- Mix by gentle agitation and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- Gently resuspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination.

INTERPRETATION OF RESULTS (DIRECT AND INDIRECT COOMBS)

POSITIVE REACTION: Visible agglutination of erythrocytes.

NEGATIVE REACTION: Absence of agglutination of erythrocytes.

III.SURVEY OF IRREGULAR ANTIBODIES IN INDIRECT ANTI-HUMAN GLOBULIN (INDIRECT COOMBS)

Its purpose is to detect antibodies of blood groups capable of causing hemolytic reactions. It is carried out in 4 phases: the 1st, 2nd, and 3rd stages are more efficient in the detection of IgM, while the 4th phase detects IgG.

1ST PHASE: Saline solution at Room Temperature

- Prepare a suspension in 5% of washed erythrocytes compatible with the patient serum (usually from type O, positive Rh), 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 of saline into a 12 x 75 mm test tube. Other volumes can be used). There is commercial RBCs to perform the test.
- In a labeled 10 x 75 mm or 12 x 75 mm test tube, pipette 50 µl of 5% erythrocytes suspension.
- Pipette in the same tube 100 µl of the serum to be tested.
- Mix by gentle agitation and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- Gently re suspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination and/or hemolysis.

2ND PHASE: Protein Environment at Room Temperature

- Pipette in the same tube referred to above 100 µl (2 drops) of Bovine Albumin at 22% (1).
- Mix by gentle agitation and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- Gently re suspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination and/or hemolysis.

3RD PHASE: Protein Environment at 37°C

- Incubate the tube at 37°C for 15-30 minutes.
- Centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- Gently re suspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination and/or hemolysis.

4TH PHASE: Human Antiglobulin (Indirect Coombs)

- Complete the tube with physiological saline solution and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- Decant the supernatant by inverting the tube, resuspend the erythrocyte pellet and complete again with physiological saline solution. Repeat this procedure 3 times.
- After the last wash, decant the supernatant completely, inverting the tube and drying the edge with filter paper.
- Pipette 100 µl (2 drops) of **SORO DE COOMBS** from **WAMA**.
- Mix by gentle agitation and centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.
- 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.

TEST SPECIFICITY:

The performance of the ***Imuno-HEMATO Soro de Coombs*** was evaluated in 86 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 Soro de Coombs*** repeated satisfactorily the results with the samples to be tested under the same conditions.

b. Inter-Assay Precision

10 semples 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 Soro de Coombs*** repeated satisfactorily the results with the samples to be tested even under different conditions.

LIMITATIONS OF USE

- False 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.
- It is recommended to use fresh RBCs and sera, preferably not chilled.
- The inadequate washing of erythrocytes can cause false negative through the presence of free serum globulins, neutralising the Coombs serum.
- It is recommended to always use a positive and negative control for the quality control of the technique.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The reagents should be kept between 2 - 8 °C.
- The expiry date refers to the last day of the month indicated on the labels of the vial and of the kit box.
- Avoid exposing the reagents to high temperatures and direct sunlight.

- Do not freeze the reagent, as this may cause irreversible damage.
- The ***Imuno-HEMATO Soro de Coombs*** 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.
- 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.
- Allow the reagents to reach the room temperature (20 -25°C) before starting the test.
- The reagents must be capped immediately after use.
- Do not use the reagent after the expiration date.
- 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.
- 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.
- Discard the material following local regulations.
- 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.

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.

WARRANTY

WARRANTY

IMPORTANCIA CLÍNICA

Coombs, Mourant, y Raza, pocos años después del descubrimiento de lo anticuerpos anti-Rh (1945), describen la prueba de antiglobulina humana, que utiliza suero antiglobulina humano, preparado en conejos, para detectar anticuerpos Rh "incompletos". Hoy el examen se utiliza para detectar la sensibilización in vivo de los eritrocitos, ayudando en el diagnóstico de la enfermedad hemolítica neonatal y la anemia hemolítica autoinmune, por lo que es, posiblemente, la prueba más ampliamente utilizado en inmunohaematología.

En general, los anticuerpos implicados en reacciones transfusionales son de dos tipos, completo e incompleto. Los anticuerpos completos aglutinan los glóbulos rojos en solución salina y los incompletos sensibilizan los glóbulos rojos sin aglutinación. Generalmente anticuerpos de clase IgM, y anticuerpos IgG de tipo IgG1 e IgG3 fijan el complemento. Por lo tanto, la lisis celular, en vivo, está mediada por el sistema de complemento.

El suero anti-globulina humana (Coombs reactivo) se utiliza en dos tipos de pruebas: directa e indirecta. En el directo, la globulina anti-humana se utiliza para la detección de anticuerpos adsorbido a los glóbulos rojos in vivo, y, por lo tanto, los anticuerpos unidos a las células rojas del paciente, que se utiliza en el estudio de enfermedad hemolítica del recién nacido en madres Rh negativas, en la investigación de las anemias hemolíticas autoinmunes, de hemólisis inducida por drogas, y en reacciones pós transfusión hemolíticas. En la prueba indirecta, el ancicuepor anti-globulina humana se utiliza para la detección de anticuerpos adsorbidos en los glóbulos rojos de la sangre in vitro, y, por lo tanto, los anticuerpos libres en suero o plasma, que es utilizado en la investigación y la identificación de anticuerpos irregulares y pruebas de compatibilidad.

La prueba **Imuno-HEMATO SORO DE COOMBS** de **WAMA** es un suero de amplio espectro, antigama humana y no gamma globulina humana, caracterizada por una mezcla de anticuerpos contra las inmunoglobulinas y factores de complemento, preparado por la inmunización de conejos con IgG humana purificada (anti-IgG policlonal) y por cultivo in vitro de híbridomas de ratón (línea celular Bric-8) que secretan anticuerpo monoclonal anti-C3, clase IgM (anti-C3 monoclonal). El reactivo es de color verde.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El procedimiento de la prueba se basa en el principio de aglutinación, donde lavan los glóbulos rojos de individuo con anticuerpos o factores de complemento adsorbidos en su superficie (Coombs) o de anticuerpos libre (Coombs indirecto) se aglutinan en presencia de suero anti-globulina humana poli específico (Coombs), lo que indica un resultado positivo. La prueba se considera negativa cuando no aparece ninguna aglutinación.

PRESENTACIÓN DEL KIT

[REF] 1058010-D - 10ml

- Suero de Coombs (1 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

[REF] 1058050-D - 50ml

- Suero de Coombs (5 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

[REF] 1058100-D - 100ml

- Suero de Coombs (10 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE REACTIVOS

•SUERO DE COOMBS (1): listo para su utilización. Estable a 2 - 8 °C hasta que fecha de vencimiento impresa en el envase. Almacenamiento inadecuado afecta a la eficacia del reactivo. Contiene azida de sodio < 0,095 % (w/v) como conservante, cloruro de sodio y albúmina sérica bovina. 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 vencimiento descripta 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. De acuerdo con el anticoagulante usado, las muestras deben ser probados en los siguientes plazos:

- Heparina y Oxalato de Sodio : 2 Días
- EDTA y Citrato de Sodio : 14 Días
- ACD y CPD : 28 días.

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

Independientemente de la técnica empleada, deje que el reactivo y la muestra alcance la temperatura ambiente antes de comenzar las pruebas.

I. PRUEBA ANTI-GLOBULINA HUMANO (COOMBS DIRECTO)

- Preparar una suspensión en 5% de eritrocitos lavados para ser sometidas a ensayo 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 solución salina en un tubo de ensayo 12 x 75 mm. Otros volúmenes pueden ser utilizados).
- En un tubo de ensayo etiquetado de 10 x 75 mm o 12 x 75 mm , pipetas 50 µl de suspensión de eritrocitos a 5%.
- Complete el tubo con solución salina fisiológica y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- Decantar el sobrenadante invirtiendo el tubo, resuspenda el sedimento de eritrocitos y complete de nuevo con solución salina fisiológica. Repita este procedimiento 3 veces.
- Después del último lavado, decantar el sobrenadante completamente, invirtiendo el tubo y secando la borda con papel de filtro.
- Pipetear 100 µl (2 gotas) de Coombs Sera (1).
- Mezclar por agitación suave y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación.

II. PRUEBA ANTI GLOBULINA HUMANO INDIRECTA (COOMBS INDIRECTO)

- 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 (lavan 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 , pipetas 50 µl de suspensión de eritrocitos a 5%.
- Pipeta en el mismo tubo 100 µl del suero a ser probado.
- Homogeneizar por agitación suave e incubar a 37° C por 15-30 minutos.
- Retire el tubo del baño maría, complete con solución salina fisiológica y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- Decantar el sobrenadante invirtiendo el tubo, resuspenda el sedimento de eritrocitos y complete de nuevo con solución salina fisiológica. Repita este procedimiento 3 veces.
- Después del último lavado, decantar el sobrenadante completamente, invirtiendo el tubo y secando la borda con papel de filtro.
- Pipetear 100 µl (2 gotas) de Coombs Sera (1).
- Mezclar por agitación suave y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS (COOMBS DIRECTO E INDIRECTO)

REACCIÓN POSITIVA: Aglutinación de los eritrocitos visible

REACCIÓN NEGATIVA: Ausencia de aglutinación de los eritrocitos.

III. 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 4 ª 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 (lavan 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 , pipetas 50 µl de suspensión de eritrocitos a 5%.
- Pipeta 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.
- Re suspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación y/o hemólisis.

3ª fase: Ambiente Proteico a 37°C

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

4ª fase: Antiglobulina Humana (Coombs indirecto)

- Complete el tubo con solución salina fisiológica y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- Decantar el sobrenadante invirtiendo el tubo, resuspenda el sedimento de eritrocitos y complete de nuevo con solución salina fisiológica. Repita este procedimiento 3 veces.
- Después del último lavado, decantar el sobrenadante completamente, invirtiendo el tubo y secando la borda con papel de filtro.
- Pipetear 100 µl (2 gotas) de SORO DE COOMBS de WAMA.
- Mezclar por agitación suave y se centrifugue a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.
- 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.

ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA:

El rendimiento de ***Imuno-HEMATO Soro de Coombs*** fue evaluada en 86 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 los mismo operador en mismo día.

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

LIMITACIONES DE USO

- Resultados falsos puede 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.
- Se recomienda el uso de glóbulos rojos y sueros frescos, preferiblemente no refrigerados.

- El lavado inadecuado de los eritrocitos puede causar falso negativo a través de la presencia de globulinas séricas libres, neutralizando el suero de Coombs.
- Se recomienda utilizar siempre un control positivo y negativo para el control de calidad de la técnica.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Los reactivos deben conservarse entre 2—8 °C.
- La fecha de caducidad se refiere al último día del mes indicado en las etiquetas del frasco y de la caja del kit.
- Evite la exposición de los reactivos a altas temperaturas y la luz solar directa.
- No congele el reactivo, ya que esto puede causar daños irreversibles.
- La ***Imuno-HEMATO Soro de Coombs 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 que pueden ser infecciosas, así como que tenga a su cargo el cuidado de deshacerse de estos materiales.
- 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.
- Dejar que los reactivos adquieran la temperatura ambiente (20—25 °C) antes de iniciar los tests.
- Los reactivos deben taparse inmediatamente después de su uso.
- No utilice el reactivo después de la fecha de caducidad.
- 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.
- Desechar el material siguiendo regulaciones locales.
- Utilice las Buenas 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 estea 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

WARRANTY

WARRANTY

- Levine, P.: The discovery of Rh haemolytic disease. Vox Sanguinis 47: 187-190, 1984.
- Jones, J., Scott, M.M. and Voak, D.: Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. Transfusion Medicine, 5: 171-184, 1995.
- Avent, N.D. and Reid, M.E.: The Rh blood group system: a review. Blood, 95: 375-387, 2000.
- Zallen, D. T., Christie, D. A. and Tansey, E. M.: The Rhesus Factor and Disease Prevention. Witness Seminar held by the Wellcome Trust Centre for the History of Medicine at UCL, London, June, 2003.
- Scott, M. L.: The complexities of the Rh system. Vox Sanguinis, 87: 58-62, 2004.
- Westhoff, C. M.: The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. Transfusion, 44: 1663-1673, 2004.
- 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.
- Westhoff, C.M.: The structure and function of the Rh antigen complex. Seminars in Hematology, 44: 42-50, 2007.

WARRANTY

SIMBOLOGIA / SIMBOLS / SIMBOLOGIA		
	O conteúdo é suficiente para (n) testes Quantity sufficient for (n) tests O contenido es suficiente para (n) testes	Número do lote Lot Number Número del lote
	Data limite de utilização Expiry Date Fecha de la caducidad	Número do catálogo Catalog Number Número del catálogo
	Produto diagnóstico <i>in vitro</i> In vitro diagnostic Produto diagnóstico <i>in vitro</i>	Limite de temperatura Temperature Limite de temperatura
	Consultar instruções para uso Refer to user's instructions Consultar las instrucciones para el uso	Proteger do calor Keep away from sunlight Proteger del calor
	Representante Europeu European Representative Representante Europeu	Fabricado por Manufactured by Fabricado por