

Test Coombs Indirect si Direct**Identificarea produsului: 50531****INTRODUCERE**

Serul antiglobulinic uman polispecific se utilizeaza in mod curent pentru depistarea si identificarea alloanticorpilor, probe de compatibilitate si test Coombs Direct.

Rolul cel mai important al serului antiglobulinic uman polispecific este de a detecta prezenta imunoglobulinelor de tip IgG. Importanta fractiunii anti-complement este discutabila, avand in vedere ca anticorpilor detectabili numai prin capacitatea lor de a fixa complementul sunt destul de rari. Totusi activitatea anti-C3d este importanta pentru testul Coombs Direct, in investigarea anemiilor hemolitice autoimune. In general, un test Coombs Direct pozitiv indica faptul ca hematiile sunt sensibilizate *"in vivo"* de imunoglobuline si/sau de complement.

Microtuburile cartelei-ID "LISS/Coombs" contin ser antiglobulinic uman polispecific pentru realizarea testului Coombs Direct si a testului Coombs Indirect utilizat in depistarea si identificarea anticorpilor iregulari, probe de compatibilitate.

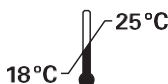
Pentru testul Coombs Indirect, se elimina etapa foarte complicata de spalare a hematiilor. Aceasta se datoreaza pipetarii in microtub a suspensiei de hematii inaintea serului/plasmei, ceea ce creeaza o bariera deasupra suspensiei de gel, evitandu-se astfel neutralizarea serului antiglobulinic de catre proteinele serice IgG.

Cartela-ID "LISS/Coombs" este indicata pentru Testul Coombs Direct, pentru probe de compatibilitate, pentru depistarea si identificarea anticorpilor iregulari cu hematii - test "ID-DiaCell" si "ID-DiaPanel".

REACTIVI

Cartela-ID "LISS/Coombs" cu 6 microtuburi ce contin ser antiglobulinic uman polispecific (anti-IgG de iepure si anti-C3d monoclonal - n° clona C139-9), in suspensie de gel.

Agent conservant: < 0,1% NaN₃.



Nu se stocheaza in apropierea unei surse de caldura, de climatizare sau de ventilatie.

Stabilitate: a se vedea data de expirare inscrisa pe eticheta.

REACTIVI SUPLIMENTARI NECESARI

- ID-Diluent 2: LISS modificat pentru suspensia hematiilor.
- ID-DiaCell, ID-DiaPanel: hematii test.

(a se vedea instructiunile de utilizare corespondente)

MATERIALE NECESARE

- ID-Distribuitoare
- ID-Pipeta
- ID-Conuri pentru pipeta
- ID-Tuburi (eprubete) pentru prepararea dilutiilor
- ID-Stativ de lucru
- ID Incubator 37 °C
- ID-Centrifuga 6, 12 sau 24

ESANTIOANE DE TESTAT

Pentru rezultate optime, este indicat ca determinarea sa fie facuta pe sange proaspat recoltat sau conform procedurilor locale referitoare la criteriile de acceptare ale esantioanelor. Este de preferat ca sangele sa fie prelevat pe anticoagulant tip citrat, EDTA sau CPD-A. Poate fi folosit si sange recoltat fara anticoagulant.

Cand este necesara utilizarea serului in locul plasmei, inainte de testare, serul trebuie sa fie bine clarificat prin centrifugare la 1500 g, timp de 10 minute, pentru a evita reziduurile de fibrina care ar putea interfera cu reactia.

PREPARAREA ESANTIOANELOR

a) Suspensii de hematii pentru Test Coombs Direct sau autocontrol

Se prepara o dilutie a hematiilor de 0,8% in ID-Diluent 2 dupa cum urmeaza:

Inainte de utilizare, ID-Diluentul 2 se aduce la temperatura camerei.

1. Se distribuie 1,0 ml ID-Diluent 2 intr-o eprubeta curata.

2. Se adauga 10 ml sediment eritrocitar si se omogenizeaza usor.

Suspensia de hematii poate fi utilizata imediat.

b) Suspensii de hematii pentru probe de compatibilitate

Se prepara o dilutie a hematiilor de 0,8% in ID-Diluent 2. Cand se utilizeaza sangele total din segmentul pilot al pungii de sange, se pipeteaza 20 µl de sange in 1,0 ml ID-Diluent 2.

Suspensia de hematii poate fi utilizata imediat.

c) Plasma sau ser pentru Testul Coombs Indirect

Daca esantioanele nu se testeaza imediat, dupa separare, se stocheaza la 2 – 8 °C pentru maximum 48 ore sau la -20 °C pentru o perioada mai mare de 48 de ore, sau conform normelor si bunelor practici locale.

METODA DE TESTARE

Nu se utilizeaza cartele care prezinta semne de uscare, bule de aer in coloana de gel, sigiliul de aluminiu deteriorat, picaturi de gel sau de supernatant in partea superioara a microtubului sau pe partea interioara a foliei de aluminiu.

I. Testul Coombs Direct

1. Se identifica microtuburile alese din cartela-ID cu datele primitorului sau donatorului.

2. Se indeparteaza folia de aluminiu ce sigileaza microtuburile identificate, tinand cartela in pozitie verticala.
3. Se pipeteaza 50 µl din suspensia de hematii in microtubul corespunzator.
4. Se centrifugheaza 10 minute cartela-ID in ID-Centrifuga.
5. Citirea si inregistrarea rezultatelor.

II. Depistarea anticorpilor iregulari (Test Coombs Indirect)

Se utilizeaza hematiile test (gata de utilizare) ID-DiaCell.

Inainte de utilizare, se aduc la temperatura camerei ID-Hematiile test si esantioanele.

1. Se identifica microtuburile alese din cartela-ID cu datele primitorului sau donatorului.
2. Se indeparteaza folia de aluminiu ce sigileaza microtuburile identificate, tinand cartela in pozitie verticala.
3. Se pipeteaza 50 µl din fiecare hematie test in microtuburile marcate corespunzator hematiilor test.
4. In cazul in care este inclus si autocontrolul, se pipeteaza 50 µl din suspensia eritrocitara a esantionului de testat in microtubul corespunzator.
5. Se pipeteaza in fiecare microtub 25 µl din serul sau plasma primitorului/donatorului.
6. Se incubeaza cartela-ID, 15 minute la 37 °C in ID-Incubator.
7. Se centrifugheaza cartela-ID, 10 minute in ID-Centrifuga.
8. Citirea si inregistrarea rezultatelor.

III. Identificarea anticorpilor iregulari (Test Coombs Indirect)

Se utilizeaza hematii test (gata de utilizare) ID-DiaPanel.

Inainte de utilizare, se aduc la temperatura camerei ID-Hematiile test si esantioanele.

1. Se identifica 2 cartele "LISS/Coombs" cu datele primitorului sau donatorului.
2. Se indeparteaza folia de aluminiu ce sigileaza microtuburile identificate, tinand cartela in pozitie verticala.
3. Se pipeteaza 50 µl din fiecare suspensie de hematie test a ID-DiaPanel, in microtuburile corespunzatoare (marcate de la 1 la 11).

4. Se pipeteaza 50 µl din suspensia eritrocitara a esantionului de testat in microtubul 12 (autocontrolul).
5. Se pipeteaza 25 µl din serul sau plasma testata in toate cele 12 microtuburi.
6. Se incubeaza cartela-ID, 15 minute la 37 °C in ID-Incubator.
7. Se centrifugheaza cartela -ID 10 minute in ID-Centrifuga.
8. Citirea si inregistrarea rezultatelor.

IV. Probe de compatibilitate (Test Coombs Indirect)

1. Se identifica microtuburile corespunzatoare ale cartelei-ID cu datele primitorului si ale donatorului (unitatea de sange).
2. Se indeparteaza folia de aluminiu ce sigileaza microtuburile identificate, tinand cartela in pozitie verticala.
3. Se pipeteaza 50 µL din suspensia eritrocitara a donatorului in microtubul corespunzator.
4. In cazul in care este inclus si autocontrolul, se pipeteaza 50 µl din suspensia eritrocitara a esantionului de testat in microtubul corespunzator.
5. Se pipeteaza 25 µl din serul sau plasma primitorului in fiecare microtub.
6. Se incubeaza cartela 15 minute la 37 °C in ID-Incubator.
7. Se centrifugheaza cartela 10 minute in ID-Centrifuga.
8. Citirea si inregistrarea rezultatelor.

INTERPRETAREA REZULTATELOR

A) Principiu

- Pozitiv:** hematiile aglutinate formeaza o linie rosie la suprafata gelului sau sunt hematii aglutinate dispersate in coloana de gel.
- Negativ:** hematiile neaglutinate sedimenteaza complet in buton compact la fundul microtubului.

B) Reactii pentru:**I. Testul Coombs Direct**

- Reactiile negative indica absenta pe hematii a anticorpilor IgG detectabili sau a fractiunii C3d a complementului.
- Reactiile pozitive (de la $\pm$ la ++++) indica faptul ca hematiile esantionului de testat sunt sensibilizate (anticorpi IgG sau/si C3d sunt fixati pe hematii).

II. Depistarea anticorpilor iregulari

- Reactiile negative indica absenta in serul sau plasma pacientului/dona-torului a unor anticorpi iregulari detectabili.
- Reactiile pozitive indica prezenta unor anticorpi iregulari. Se noteaza rezultatele obtinute pe lista de antigene prezenta in cutia de conditionare a hematiilor test ID-DiaCell I-II sau ID-DiaCellII-II-III. Se verifica daca numarul de lot al hematiilor test utilizate corespunde cu numarul de lot inscris pe lista de antigene.
- In cele mai multe cazuri, in functie de tipul reactiei si configuratia anti-genica, se poate indica specificitatea anticorpului prezent. Se procedeaza la teste suplimentare pentru identificarea anticorpilor.
- Reactiile pozitive cu anumite hematii test si cu autocontrolul negativ indica prezenta unui anticorp specific (a se vedea Observatii).
- Reactiile pozitive cu toate hematiile test si cu un autocontrol pozitiv sunt cauzate probabil de reactii non-specifice.
- Reactiile pozitive cu toate hematiile test si cu un autocontrol pozitiv, dar cu una sau mai multe hematii test avand o reactie pozitiva de intensitate mai mare decat cea prezentata de autocontrol, pot indica prezenta unui anticorp mascat iar esantionul pacientului trebuie investigat si prin alte teste.

III. Identificarea anticorpilor iregulari

- Reactiile pozitive indica prezenta unor anticorpi iregulari. Se noteaza rezultatele obtinute pe lista de antigene prezenta in cutia de conditionare a hematiilor test "ID-DiaPanel". Se verifica daca numarul de lot al hematiilor test utilizate corespunde cu numarul de lot inscris pe lista de antigene.

- In cele mai multe cazuri, in functie de tipul reactiei si configuratia antigenica, avem posibilitatea de a identifica specificitatea anticorpului prezent. Autocontrolul trebuie sa prezinte o reactie negativa.
- Reactiile pozitive cu toate hematiile test si un autocontrol negativ pot indica prezenta unui alloanticorp cu specificitate pentru un antigen cu inalta frecventa.
- Reactiile pozitive cu toate hematiile test si un autocontrol pozitiv sunt cauzate probabil de reactii non-specifice.
- Reactiile pozitive cu toate hematiile test "ID-DiaPanel" si cu un autocontrol pozitiv, dar cu una sau mai multe hematii test care arata o reactie pozitiva de intensitate mai mare decat cea prezentata de autocontrol, pot indica prezenta unui anticorp mascat iar esantionul pacientului trebuie investigat si prin alte teste.

IV. Proba de compatibilitate

- Reactia negativa indica compatibilitate intre primitor si donator.
- Reactia pozitiva indica o incompatibilitate intre primitor si donator, datorita prezentei unor anticorpi in serul/plasma primitorului, cu specificitate fata de antigenele donatorului. Alte investigatii suplimentare sunt necesare pentru identificarea specificitatii anticorpului.

OBSERVATII

Conform Bunelor Practici de Laborator, sensibilitatea tehnicilor mentionate trebuie validata cu anticorpi cu potentia cunoscuta. Reactivul de referinta Bio-Rad anti-D permite efectuarea controalelor regulate pentru toate tehnicile de determinare a anticorpilor iregulari (a se vedea prospectul de utilizare corespunzator).

LIMITE

- a. Cartele care prezinta bule in coloana de gel sau picaturi in partea superioara a microtubului sau pe partea interioara a foliei de aluminiu, trebuie centrifugate inainte de utilizare.
- b. Anumite medicamente pot provoca un Test Coombs Direct pozitiv.
- c. Anumite stari patologice au fost descrise ca fiind cauza unor Teste Coombs pozitive.
- d. Hematiile care prezinta poliaگلutinabilitate "in vivo" sau "in vitro" datorita expunerii criptoantigenului T, pot reactiona cu toate antiserurile de origina umana. In acest caz sunt necesare investigatii suplimentare.
- e. Contaminarea bacteriana sau de alta natura poate provoca reactii fals pozitive sau fals negative.
- f. Reziduurile de fibrina din suspensia de hematii pot bloca unele din hematiile neaglutinate. Apare astfel o linie fina roz la suprafata gelului, in timp ce majoritatea hematiilor neaglutinate se gasesc sedimentate la fundul microtubului, dupa centrifugare.
- g. Este esentiala respectarea stricta a metodelor de lucru si a modului de utilizare al echipamentelor recomandate de producator. Echipamentele trebuie verificate periodic conform Bunelor Practici de Laborator.
- h. Utilizarea pentru dilutia hematiilor a altor solutii decat ID-Diluent 2 poate modifica rezultatele.
- i. Utilizarea altor hematii test decat "ID-DiaCell" si "ID-DiaPanel" poate modifica reactiile.
- j. Concentratii prea mari sau prea mici ale suspensiilor de hematii pot provoca rezultate eronate.

CARACTERISTICI DE PERFORMANTA**Specificitate /sensibilitate**

Au fost efectuate studii de evaluare a performantei cu cartelele-ID "LISS/ Coombs". Rezultatele obtinute au demonstrat ca, caracteristicile de performanta ale fiecarei aplicatii de utilizare a cartelei sunt conforme cu domeniul de aplicabilitate si comparabile cu alte produse aprobate.

Reproductibilitate

Reproductibilitatea (repetabilitatea) intra-test si reproductibilitatea inter-teste ale cartelei-ID "LISS/Coombs" au fost evaluate in intern. Nu au fost observate rezultate fals pozitive sau fals negative. Diferentele intre reactiile esantioanelor pozitive au fost inferioare unui grad de intensitate al reactiei.

BIBLIOGRAFIE

1. Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. and Race, R.R.: Lancet 1945; 2: 15.
2. Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. and Race, R.R.: Brit. J. Exp. Path 1945; 26: 255.
3. Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.
4. Technical Manual; Roback, J.D. (ed.); 17th ed. 2012; American Association of Blood Banks.

PRODUS

Cartela-ID "LISS/Coombs"	4 x 12.....	REF 004014
	24 x 12.....	REF 004017
	60 x 12.....	REF 004016
	112 x 12.....	REF 004015

Aceste produse sunt garantate pentru proprietatile si calitatile inscrise pe eticheta si in instructiunile de utilizare. Producatorul declina orice responsabilitate ce decurge din vanzarea acestor produse pentru alte scopuri sau din utilizarea diferita fata de cea descrisa in prezentele instructiuni de utilizare.



DiaMed GmbH
Pra Rond 23
1785 Cressier FR
Schweiz



0123

Changes to the version 05.10 are
shaded gray.