

| | | |
|--------------------------------------|--|--|
| Inserir o nome do Laboratório | Procedimento Operacional Padrão ANTI-HUMANO | Página 1 de 5 POPIMUNOHEMATOLOGIAxxx/xx |
|--------------------------------------|--|--|

Finalidade

Soro Antiglobulina humana (AGH) para pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) teste da antiglobulina direta (TAD) e provas de compatibilidade.

Princípio de Ação

A imunização de coelhos com antiglobulina e complemento produzem a antiglobulina humana e anticomplemento humano. No teste da antiglobulina as células são lavadas sucessivamente para remoção das globulinas não ligadas às células, as lavagens são necessárias para impedir a neutralização da antiglobulina humana através da molécula anti IgG C3d não ligada. A globulina poli-específica humana adicionada nas células lavadas causarão aglutinação se as células estiverem sensibilizadas com imunoglobulina ou complemento. Células não sensibilizadas não aglutinarão com a globulina anti-humana.

Reagente Utilizado - Apresentação

Composição: a anti-imunoglobulina - anti IgG C3d poliespecífica é preparada pela injeção em 2 colônias de coelhos, uma com anti IgG humano purificado e outra com componentes purificados de complemento humano. O soro obtido de cada coelho é testado para especificidade e reatividade para depois serem misturados e adsorvidos, a fim de remover anticorpos hetero-específicos. O "pool" é diluído com salina tamponada contendo albumina bovina e 0,1% de azida sódica como conservante.

Apresentação: 1 x 10ml.

Estabilidade

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo quando conservados de acordo com a temperatura recomendada. Evitar a contaminação do produto durante o uso para não afetar a sua estabilidade.

Armazenamento

- A temperatura de armazenamento deverá ser entre 2º a 8ºC.
- Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.
- Não congelar.

Cuidados Especiais

- Não utilizar o produto após a data de vencimento;
- Não reutilizar os frascos vazios;
- O reagente contém azida de Sódio que pode reagir com cobre e chumbo dos encaamentos formando sais explosivos. No descarte, diluir com grande quantidade de água para impedir a formação destes compostos.
- Os materiais de origem biológica devem ser considerados como potencialmente infectantes. Devem ser estabelecidos métodos adequados para manuseio e descarte equivalentes aos utilizados no descarte das amostras.

Materiais Necessários não Fornecidos

Procedimento Manual

- Tubos de ensaio;
- Salina 0,85%;
- Pipetas sorológicas;
- Centrífuga;
- Ponteiras;
- Relógio.

Amostra

- As hemácias obtidas de coágulo podem ser tipadas em 5 dias após sangria. As amostras coletadas em EDTA ou Heparina devem ser tipadas em até 48 horas. Se a demora para a execução do teste for inevitável, hemácias de sangue coagulado e as colhidas em EDTA ou heparina devem ser separadas do soro/plasma, lavadas e ressuspendidas em solução preservativa de glóbulos. Estocar a 2º-8ºC por no máximo 20 dias. O armazenamento prolongado de hemácias antes da execução do teste pode causar deterioração de antígenos e resultar em reações mais fracas.

Preparo do paciente

Não é necessário nenhum preparo especial do paciente para a coleta da amostra. O sangue deve ser colhido com técnica asséptica, com ou sem anticoagulante e o soro separado o mais breve possível para realização dos testes.

Preparo do Reagente de Trabalho

O reagente é fornecidos prontos para uso.

Procedimento de Teste

➤ Teste da Antiglobulina Direto:

Aplicações:

Na pesquisa de anticorpos já fixados às hemácias, como ocorrem em:

- Anemia Hemolítica Adquirida Autoimune
- Doença Hemolítica de Recém Nascido
- Pacientes que tenham recebido transfusões incompatíveis

Procedimento:

- 1- Colocar em um tubo de ensaio uma gota de suspensão de eritrócitos a 5% em solução fisiológica 0,85% ou no próprio soro
- 2- Lavar as hemácias dos tubos 3 vezes com solução fisiológica 0,85%, e após a última lavagem remover completamente a salina secando bem as bordas do tubo.
- 3- Adicionar 2 gotas do Soro Anti-Humano Ebram para cada tubo. Misturar bem.
- 4- Centrifugar por 15 segundos a 3400 rpm (900 – 1000g) ou 1 minuto a 1000 rpm (100 – 125g)
- 5- Ressuspender suavemente o botão de hemácias, agitando delicadamente o tubo, observando a presença ou não de aglutinação.
- 6- Graduar e registrar os resultados.

Interpretação

| Teste da Antiglobulina Direto / Coombs Direto | |
|---|----------|
| Aglutinação | Positivo |
| Ausência de Aglutinação | Negativo |

➤ Teste da Antiglobulina Indireto:

Aplicações:

- Provas de compatibilidade pré-transfusional
- Pesquisa de anticorpos no soro de gestantes
- Identificação de anticorpos utilizando hemácias com antígenos desconhecidos
- Titulação de anticorpos
- Pesquisa de variantes fracas do antígeno D

Procedimento:

- 1- Colocar em um tubo de ensaio uma gota de suspensão de eritrócitos a 5% escolhidas para teste, previamente preparada em solução fisiológica 0,85%.
- 2- Adicionar duas gotas do soro a ser utilizado no teste
- 3- Adicionar duas gotas de Albumina Bovina Ebram. Misture bem .
- 4- Incubar em Banho-Maria durante 15 - 30 minutos a 37°C
- 5- Lavar as hemácias dos tubos 3 vezes com solução fisiológica 0,85%, e após a última lavagem remover completamente a salina secando bem as bordas do tubo.
- 6- Adicionar 2 gotas do Soro Anti-Humano Ebram para cada tubo. Misturar bem.
- 7- Centrifugar por 15 segundos a 3400 rpm (900 – 1000g) ou 1 minuto a 1000 rpm (100 – 125g)
- 8- Ressuspender suavemente o botão de hemácias, agitando delicadamente o tubo, observando a presença ou não de aglutinação.
- 9- Graduar e registrar os resultados.

Interpretação

| Teste da Antiglobulina Indireta / Coombs Indireto | |
|--|----------|
| Aglutinação | Positivo |
| Ausência de Aglutinação | Negativo |

➤ **Teste de Compatibilidade “Maior”Pré-Transfusional**

Aplicação:

Este teste visa à detecção, sem prejuízo da sensibilidade e precisão de todos os anticorpos de grupo sanguíneos clinicamente significativos e capazes de causar uma reação hemolítica pós-transfusional em receptores de sangue. Este teste evidenciará também incompatibilidade em que as hemácias do doador podem ser destruídas seletivamente, sem sinais ou sintomas visíveis das reações hemolíticas transfusionais.

Procedimento:

1- Pesquisa de anticorpos salinos (à temperatura ambiente)

- Em um tubo de ensaio colocar duas gotas do soro do receptor
- Adicionar uma gota de suspensão a 5% em solução fisiológica 0,85%de hemácias do doador
- Centrifugar por 15 segundos a 3400 rpm ou 1 minuto a 1000 rpm
- Ressuspender suavemente o botão de hemácias, agitando delicadamente o tubo, observando a presença ou não de aglutinação.
- Graduar e registrar os resultados.

2- Pesquisa de anticorpos albuminosos (à temperatura ambiente)

- Adicionar ao mesmo tubo, duas gotas de Albumina Bovina Ebram
- Centrifugar por 15 segundos a 3400 rpm ou 1 minuto a 1000 rpm
- Ressuspender suavemente o botão de hemácias, agitando delicadamente o tubo, observando a presença ou não de aglutinação.
- Graduar e registrar os resultados.

3- Pesquisa de anticorpos albuminosos (à temperatura de 37°C)

- Incubar o tubo em Banho-Maria durante 15 - 30 minutos a 37°C
- Centrifugar por 15 segundos a 3400 rpm ou 1 minuto a 1000 rpm
- Ressuspender suavemente o botão de hemácias, agitando delicadamente o tubo, observando a presença ou não de aglutinação.
- Graduar e registrar os resultados.

4- Pesquisa de anticorpos bloqueadores

- Lavar as hemácias do tubo 3 vezes com solução fisiológica, e após a última lavagem remover completamente a salina secando bem as bordas do tubo.
- Adicionar 2 gotas do Soro Anti-Humano Ebram para cada tubo. Misturar bem.
- Centrifugar por 15 segundos a 3400 rpm ou 1 minuto a 1000 rpm
- Ressuspender suavemente o botão de hemácias, agitando delicadamente o tubo, observando a presença ou não de aglutinação.
- Graduar e registrar os resultados.

Interpretação

Se não ocorrer aglutinação em nenhuma das fases, o sangue pode ser considerado compatível

➤ **Teste de Compatibilidade “Menor”Pré-Transfusional**

Aplicação:

Este teste vem completar a prova anterior e tem como objetivo detectar anticorpos presentes no plasma do doador, os quais, se transfundidos, poderam causar destruição dos glóbulos do receptor.

Procedimento:

Executar o mesmo procedimento para o Teste de Compatibilidade “Maior” Pré- Transfusional, com as seguintes alterações:

- Usar duas gotas do doador
- Usar suspensão de hemácias do receptor a 5% em solução fisiológica 0,85%.

| | | |
|--------------------------------------|--|--|
| Inserir o nome do Laboratório | Procedimento Operacional Padrão ANTI-HUMANO | Página 4 de 5 POPIMUNOHEMATOLOGIAxxx/xx |
|--------------------------------------|--|--|

Valores de Referência

Não se aplica

Limitações do Procedimento

Resultados falsos positivos ou falsos negativos podem ocorrer por contaminação química ou por microorganismos, o tempo de incubação ou temperatura inadequados, centrifugação indevida, lavagem inadequada das hemácias ou contaminação em soro humano ou gama globulina e a armazenagem inadequada do reagente.

Interferentes

O armazenamento prolongado de hemácias antes da execução do teste pode causar deterioração de antígenos e resultar em reações mais fracas.

Sensibilidade

Não se aplica

Linearidade

Não se aplica.

Controle da Qualidade

Materiais

Identificar os materiais de controle interno e externo da qualidade, citando fabricante e número de catálogo. Referenciar POP para limpeza e secagem dos materiais utilizados.

Controle Interno

Descrever a calibração periódica de pipetas, centrífuga, e outros equipamentos utilizados, controle de temperatura ambiente e geladeiras para armazenamento dos kits.

Deve ser prática rotineira do Laboratório Clínico o uso de soro controle para checar a precisão e exatidão das dosagens.

Citar POP para controle interno.

Controle Externo

Descrever os procedimentos utilizados nas avaliações de qualidade feitas por programas de comparação entre laboratórios ou outros controles de qualidade.

Gerenciamento dos dados obtidos no Controle Interno e Externo

Definir como os dados de controle são arquivados e gerenciados.

Fazer referência ao manual ou POP de garantia da qualidade.

Significado Diagnóstico

As experiências descritas por Coombs, Mourant e Race em 1945 estabeleceram que as Provas Anti-Globulina Humana resultariam os melhores métodos para a detecção de anticorpos sensibilizantes mas não diretamente aglutinantes. O exemplo descrito originalmente fazia referência aos antígenos do sistema Rh. Experiências posteriores deram valor as provas de detecção de anticorpos em quase todos as tipagens sanguíneas com importância clínica, sendo utilizadas atualmente nos seguintes casos:

Prova Anti-Globulina Indireta - Screening de soro de doadores e pacientes para anticorpos irregulares. - Provas de compatibilidades anteriores à transfusão. - Fenótipo de glóbulos vermelhos. - Identificação e titulação de anticorpos achados no soro ou eluatos.

Prova Anti-Globulina Direta - Diagnóstico de laboratório da anemia hemolítica e doença hemolítica do recém-nascido. - Investigação de doenças duvidosas numa transfusão. - Investigação de doenças autoimunes que envolvem a ligação de imunoglobulinas e/ou frações de complemento dos glóbulos vermelhos.

Referências Bibliográficas

1. Coombs RRa, Mourant AE, and Race RR. Detection of Weak and Incomplete Rh Agglutinins: A New Test. Lancet 1945; ii:15;
2. Coombs RRa, Mourant AE, and Race RR, A New Test for the Detection of Weak and Incomplete Antibodies Brit J Exp Path 1945; 26:255;
3. Pirofsky B.A. Seminar On Problems Encountered in Pretransfusion. Testing. Washington D.C. American Association of Blood Banks 1972:59;
4. Garratty G.A. Seminar On Problems Encountered in Pretransfusion. Testing. Washington D.C. American Association of Blood Banks 1972:33;
5. Widmann FK. Ed. Technical Manual 9th ed. Washington D.D. American Association of Blood Banks 1985:91 – 100;

| | | |
|--------------------------------------|--|--|
| Inserir o nome do Laboratório | Procedimento Operacional Padrão ANTI-HUMANO | Página 5 de 5 POPIMUNOHEMATOLOGIAxxx/xx |
|--------------------------------------|--|--|

6. Issitt P. Applied Blood Group Serology 3rd ed. Miami Montgomery Scientific Publications 1985:94;
7. Widmann FK. Ed. Technical Manual 9th ed Washington D.C. American Association of Blood Banks 1985:376.

Informações do Fabricante

Ebram Produtos Laboratoriais Ltda.
Rua Júlio de Castilhos nº 500 – Belenzinho
São Paulo – SP – CEP 03059-001
Indústria Brasileira
® Marca Registrada
CNPJ: 50.657.402/0001-31
Resp. Téc.: Dra. Nadjara Novaes Longen
CRF-SP.:37.451
Nº Reg. MS: 10159820203
Departamento de Assistência ao Cliente
Telefone: (0**11) 2574-7110 | 0800 500 2424
E-mail: sac@ebram.com
www.ebram.com