



ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2), ANTI-A,B (ABO3) ANTI-D (RH1) IgM I, ANTI-D (RH1) IgM II, ANTI-D (RH1) TOTEM, ANTI-D (RH1) IgG, ANTI-DCE (RH1,2,3), NEG CONTROL Y GROUPAKIT

AMBITO DE USO

Estos reactivos son productos médicos destinados al diagnóstico in vitro (PMDIV) para uso profesional. Están diseñados para analizar muestras biológicas humanas.

ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2) y ANTI-A,B (ABO3) se utilizan para realizar la prueba globular para la determinación del grupo sanguíneo ABO. Permiten determinar la presencia de antígenos eritrocitarios A y/o B en la superficie de los hematíes humanos.

ANTI-D (RH1) IgM I, ANTI-D (RH1) IgM II, ANTI-D (RH1) TOTEM y ANTI-D (RH1) IgG se utilizan para la determinación del grupo sanguíneo RH1. Permiten determinar la presencia del antígeno D (RH1) en la superficie de los hematíes humanos.

ANTI-DCE (RH1,2,3) permite detectar la presencia de al menos uno de los antígenos eritrocitarios: D (RH1), C (RH2) o E (RH3).

NEG CONTROL se deberá utilizar cuando se determine el grupo sanguíneo

ABO RH1. Carece de toda actividad de anticuerpo. Utilizado en las mismas condiciones que el reactivo en cuestión, permite interpretar el resultado obtenido con él.

PRINCIPIO

La técnica manual en placa o en tubo utilizada se basa en el principio de la hemato-aglutinación. Cuando los hematíes que se van a analizar llevan un cierto antígeno se aglutinan en presencia del reactivo que contiene el correspondiente anticuerpo:

- bien con la técnica de hemato-aglutinación directa desde el momento en que entran en presencia del reactivo que contiene el anticuerpo (de tipo IgM),

- o bien con la técnica de hemato-aglutinación indirecta: prueba con antiglobulina en caso de que se utilice un anticuerpo de tipo IgG. La reacción se realiza en dos etapas. Los hematíes que se van a analizar se ponen en contacto con los anticuerpos de tipo IgG. Los anticuerpos se fijan a los hematíes portadores del correspondiente antígeno. Tras el lavado, la adición de la antiglobulina ANTI-IgG "MAESTRIA IgG" provoca la aglutinación de los hematíes sensibilizados portadores del correspondiente antígeno.

La determinación del grupo ABO es posible cuando se ponen en evidencia los antígenos A y/o B en la superficie de los hematíes humanos y simultáneamente se determina la presencia o ausencia del anticuerpo anti-A y/o anti-B en el plasma. Por lo tanto, es necesario comprobar los antígenos eritrocitarios mediante el uso de los reactivos anti-A, anti-B y anti-A,B conocidos (prueba globular) y confirmar después este resultado comprobando la presencia de los correspondientes anticuerpos en el plasma de la sangre que se está analizando con ayuda de los hematíes A1, B y en caso necesario, de los hematíes A2 y O (prueba plasmática).

Para determinar el grupo sanguíneo RH1 es necesario utilizar el reactivo ANTI-D (RH1) y el reactivo NEG CONTROL.

COMPOSICION

Estos reactivos están preparados a partir de anticuerpos monoclonales que están en un medio conservador. Los anticuerpos monoclonales, producidos por DIAGAST, provienen del sobrenadante de cultivos *in vitro* de hibridomas de origen murino o humano. El reactivo NEG CONTROL producido por DIAGAST no contiene ningún anticuerpo. Los reactivos contienen azida de sodio (< 0.1%), arsenito de sodio (0.02%) y albúmina bovina.

Están envasados en frascos provistos de un cuentagotas calibrado y además forman parte del contenido de la caja GROUPAKIT.

La caja GROUPAKIT (Ref. DIAGAST: 70888) se compone de un frasco de ANTI-A (ABO1), un frasco de ANTI-B (ABO2), un frasco de ANTI-A,B (ABO3), un frasco de ANTI-D (RH1) IgM I y un frasco de NEG CONTROL.

Para ver la descripción de los reactivos remitirse a la última página.

PRECAUCIONES

Es aconsejable llevar guantes y gafas protectoras, y manipular con cuidado las muestras de origen humano. Todos los recipientes que hayan estado en contacto con estas muestras deberán manipularse como productos potencialmente infecciosos. Las medidas especiales de protección y las condiciones de eliminación y de desinfección deberán respetar las normativas locales.

No se utilizarán los reactivos dañados o que presenten fugas.

CONSERVACION

Estos reactivos se deberán conservar entre +2° C y +8° C. Su comportamiento en las técnicas indicadas está garantizado desde la primera vez que se use hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta. Después de dicha fecha no deberán utilizarse. Es aconsejable que se dejen el mínimo tiempo posible fuera de la nevera así como que se evite dejarlos a la temperatura del laboratorio entre dos usos.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS

- Solución salina isotónica (NaCl 0.9%).
- Estufa o baño maría a 37°C.
- Tubos de ensayo de cristal de 10 ó 12 x 75 mm, porta-tubos.
- Agitador mezclador.
- Placa de opalina.
- Pipetas automáticas de precisión ajustables.
- Centrífuga con una fuerza relativa de 100 - 1200 g.
- Muestras de sangre de control con fenotipos garantizados: A, B, O, RH1 y RH-1, RH2 y RH-2, RH3 y RH-3, como HEMA CQI (Ref. DIAGAST: ver catálogo).

- Hematíes sensibilizados con IgGs.

- Control negativo "NEG CONTROL" (Ref. DIAGAST: ver catálogo).

- Antiglobulinas ANTI-IgG "MAESTRIA IgG" (Ref. DIAGAST: ver catálogo).

- Caja para la identificación de los D Parciales para uso en investigación:

D-SCREEN (Ref. DIAGAST: ver catálogo).

MUESTRAS, CONTROLES

MUESTRA DE SANGRE A ANALIZAR

La sangre, recogida en un anticoagulante: EDTA, heparina o citrato, en un tubo estéril y cerrado, y conservada entre +2° C y +8° C, se deberá examinar en un plazo de 48 horas siempre y cuando no se vea ninguna señal de hemólisis.

En el momento del análisis, centrifugar la muestra de sangre 3 minutos a 1200 g.

MUESTRAS DE SANGRE CON FENOTIPOS GARANTIZADOS COMO HEMA CQI

El sistema de análisis deberá validarse utilizando muestras con fenotipos garantizados:

- muestra que posea el antígeno correspondiente al anticuerpo del reactivo utilizado.

- muestra que no posea el antígeno correspondiente al anticuerpo del reactivo utilizado.

La utilización de estas muestras o de HEMA CQI permite detectar las anomalías (la manipulación, los reactivos, a los materiales o al medio) y poder tomar medidas correctivas.

NEG CONTROL

A la hora de determinar el grupo RH1, para cada una de las muestras se examinará un control realizado en las mismas condiciones cambiando el ANTI-D (RH1) por el NEG CONTROL.

Si hubiera alguna anomalía durante la determinación del grupo sanguíneo ABO, se examinará un control de la reacción realizado en las mismas condiciones y sustituyendo el reactivo utilizado para la determinación del grupo ABO por el NEG CONTROL.

PROCEDIMIENTO

a) Técnica en placa a temperatura ambiente (+ 18° C...+ 25° C) salvo para

ANTI-D (RH1) IgG

- Con ayuda del cuentagotas del frasco, colocar 1 gota de reactivo en una placa de opalina perfectamente limpia.

- Tomar 25 l de precipitado globular sin lavar y colocarlos al lado de cada una de las gotas de reactivo teniendo cuidado de que las gotas no entren en contacto.

- Mezclar la sangre y el reactivo con un movimiento en espiral realizado con el extremo de un agitador, de forma que se dibuje un círculo proporcionado de 2 a 3 cm de diámetro.

- Incubar la placa durante 30 segundos a temperatura ambiente sin agitar.

- Coger la placa y darle un movimiento de balanceo durante 3 minutos sin dejar de observar al ojo desnudo la posible aparición de aglutinaciones.

- Leer las reacciones inmediatamente.

b) Técnica directa en tubo a temperatura ambiente (+ 18° C...+ 25° C) salvo para ANTI-D (RH1) IgG

- Preparar una suspensión al 5% de hematíes en solución salina isotónica.

- Con ayuda del cuentagotas del frasco, colocar 1 gota de reactivo en un tubo.

- Añadir 50 l de suspensión globular.

- Agitar para homogenizar la mezcla y después centrifugar 1 minuto a 500 g.

- Agitar suavemente los tubos de forma que se desprege el precipitado globular realizando una lectura al ojo desnudo.

- Observar la posible aparición de aglutinaciones.

c) Técnica de prueba indirecta con antiglobulina exclusivamente para

ANTI-D (RH1) TOTEM

- Si la reacción obtenida después de la centrifugación inmediata y la lectura que se describe arriba fuera débil o negativa, agitar los tubos e incubarlos 15 minutos a + 37° C.

- Lavar 2 veces los hematíes en solución salina isotónica y tirar el líquido del último lavado.

- Añadir 50 l de antiglobulina ANTI-IgG "MAESTRIA IgG" al precipitado de hematíes. Homogenizar y después centrifugar 1 minuto a 120 g.

- Realizar la lectura como se ha indicado en el párrafo anterior.

d) Técnica de prueba indirecta con antiglobulina exclusivamente para

ANTI-D (RH1) IgG

- Preparar una suspensión al 5% de hematíes en solución salina isotónica.

- Con ayuda del cuentagotas del frasco, colocar 1 gota de reactivo en un tubo.

- Añadir 50 l de suspensión globular.

- Agitar los tubos para homogenizar la mezcla e incubar durante 15 minutos a + 37° C.

- Lavar 2 veces los hematíes en solución salina isotónica y tirar el líquido del último lavado.

- Añadir 50 l de antiglobulina ANTI-IgG "MAESTRIA IgG" al precipitado de hematíes. Homogenizar y después centrifugar 1 minuto a 120 g.

- Realizar la lectura como se ha indicado en el párrafo "b".

INTERPRETACION

- Si se ha producido una aglutinación (los hematíes se agrupan en 1 o varios bloques), la reacción es positiva y el antígeno, o al menos uno de los antígenos, correspondiente al reactivo utilizado está presente en los hematíes analizados. Si no ha habido aglutinación (los hematíes vuelven a estar en suspensión homogénea), la reacción es negativa y el antígeno no está presente en estos hematíes.



ANTI-A (ABO1), ANTI-B (ABO2), ANTI-A,B (ABO3) ANTI-D (RH1) IgM I, ANTI-D (RH1) IgM II, ANTI-D (RH1) TOTEM, ANTI-D (RH1) IgG, ANTI-DCE (RH1,2,3), NEG CONTROL Y GROUPAKIT

- La determinación del grupo ABO de un sujeto sólo puede realizarse sin ambigüedad si los resultados de la prueba globular y los de la prueba plasmática coinciden de forma exacta.

Si no coinciden, no comunicar el resultado y seguir la identificación del grupo sanguíneo de acuerdo con las recomendaciones y los protocolos en vigor, o bien enviar la muestra a un laboratorio experto.

Los Controles "auto", "allo" y "reactivo", así como el contexto clínico, pueden ayudar a comprender las anomalías.

Control "auto": Probar, en las mismas condiciones, el plasma del sujeto respecto a sus propios hematíes.

Control "allo": Probar, en las mismas condiciones, el plasma del sujeto respecto a una serie de hematíes-prueba O conocidas (detección de anticuerpos anti-eritrocitarios diferentes a los anti-A o anti-B).

Control "reactivo": Probar, en las mismas condiciones, el plasma del sujeto respecto al control negativo.

- En placa o en tubo, con la técnica de aglutinación directa: si hay aglutinación con ANTI-D (RH1) IgM o TOTEM, está presente el antígeno D; si no hay aglutinación se puede utilizar ANTI-D(RH1)TOTEM o ANTI-D (RH1) IgG con la técnica indirecta con antiglobulina, en el caso de que se quisieran detectar los antígenos D (RH1) débiles y/o parciales.

- Las reacciones negativas obtenidas en la prueba indirecta con antiglobulina se pueden validar con hematíes sensibilizados con IgGs (ver el prospecto del reactivo en cuestión).

- La interpretación de la reacción sólo será válida si:

el control realizado con el reactivo NEG CONTROL es negativo,

el sistema de análisis se ha validado mediante muestras con fenotipos garantizados,

la prueba directa con antiglobulina es negativa para los hematíes analizados.

LIMITES DEL METODO

- Sólo el personal calificado está habilitado para utilizar este producto.

- Para tomar la gota de reactivo es absolutamente necesario utilizar el cuentagotas calibrado del frasco donde está el producto.

- Las reacciones deberán leerse inmediatamente después de centrifugar y volver a poner en suspensión.

- Es absolutamente necesario trabajar con material limpio y productos carentes de contaminación (contaminación bacteriana o de otro tipo).

- Se deberán respetar escrupulosamente los siguientes puntos: las condiciones de conservación y la fecha de expiración, los procedimientos y la calibración de los equipos recomendados.

- Es posible que los fenotipos A y/o B débiles nos se detecten en la técnica en placa ya que ésta es menos sensible que la técnica en tubo. Por lo tanto se aconseja que en caso de que haya una contradicción entre la prueba globular y la prueba plasmática y en el caso de que pudiera tratarse de un fenotipo débil, se repita la prueba con la técnica más sensible.

- Para la prueba indirecta con antiglobulina es absolutamente necesario utilizar MAESTRIA IgG.

- Es absolutamente necesario utilizar NEG CONTROL como control negativo.

- Los reactivos ANTI-D (RH1) no deberán utilizarse con aquellas técnicas manuales que precisen realizar un tratamiento enzimático a los hematíes.

- Los reactivos ANTI-D (RH1) IgM no se pueden utilizar para la prueba indirecta con antiglobulina

- Con el reactivo ANTI-D (RH1)TOTEM pueden aparecer ciertas contradicciones (reacción negativa con la técnica de hemato-aglutinación directa y positiva con la técnica indirecta con antiglobulina). En estos casos se puede pensar en un antígeno D débil y/o parcial.

- Pueden aparecer falsos positivos:

cuando se utiliza el reactivo con la técnica de hemato-aglutinación directa si el sujeto analizado posee aglutininas frías,

cuando se utiliza el reactivo para la prueba indirecta de la antiglobulina si los hematíes del sujeto analizado presentan una reacción positiva en la prueba directa con antiglobulina.

Estas posibles situaciones explican el uso paralelo del NEG CONTROL.

COMPORTAMIENTO

- Estos reactivos responden cuando se utilizan con las técnicas recomendadas en las Especificaciones Técnicas Comunes para los PMDIV.

- Se ha realizado una evaluación del comportamiento de los ANTI-A(ABO1), ANTI-B(ABO2) y ANTI-A,B (ABO3), en más de 15.000 muestras de diferentes orígenes (donantes de sangre, pacientes y recién nacidos) recogidas en los tres tipos de anticoagulantes recomendados (EDTA, heparina y citrato). Estos experimentos han demostrado que todos estos reactivos tienen una especificidad del 100% respecto a los resultados esperados en lo tocante a los fenotipos comunes conocidos A1, A2, A1B, A2B, B y O.

Las pruebas realizadas con hematíes particulares de fenotipos ABO débiles han demostrado una buena especificidad en lo tocante a los fenotipos A3 y B3.

- ANTI-A,B(ABO3) reconoce los hematíes Ax.

- ANTI-B (ABO2) no aglutina los hematíes "B adquirido" que se han probado.

- En ciertos casos se puede observar la existencia de una población doble (sujetos sometidos a transfusiones, ciertos fenotipos A o B débiles (A3, B3...), ciertas modificaciones hemopáticas, los mosaicos o las quimeras...)

- El anticuerpo ANTI-A y de forma accesoria el anticuerpo ANTI-A,B presentan una reacción cruzada con el antígeno Tn que se manifiesta por la aparición de una población doble (fenómeno excepcional).

- Se ha realizado una evaluación del comportamiento de los ANTI-D(RH1) IgM I, IgM II, IgG, TOTEM y ANTI-DCE (RH1,2,3) en una serie de entre 1.000 y 200.000 muestras, de diferentes orígenes (donantes de sangre, pacientes y recién nacidos) recogidas en los tres tipos de anticoagulante recomendados (EDTA, heparina y citrato). Estos experimentos han demostrado que todos estos reactivos tienen una especificidad del 100% respecto a los resultados esperados en lo tocante a los fenotipos Rhesus comunes conocidos.

- La intensidad de las reacciones obtenidas con los ANTI-D (RH1) IgM puede depender del número de sitios antigénicos presente sobre los hematíes.

- El ANTI-D (RH1) TOTEM y el ANTI-D (RH1) IgG permiten detectar los hematíes D (RH1) débil con la técnica de hemato-aglutinación indirecta con antiglobulina.

- No se puede garantizar que con el conjunto de los reactivos de la gama se puedan reconocer todos los motivos antigénicos poco frecuentes, débiles o variantes.

- Puede aparecer un falso positivo si el sujeto analizado posee aglutininas frías.

- El ANTI-D (RH1) IgM I y TOTEM tienen la característica de que reconocen ciertos motivos antigénicos poco frecuentes de tipo Rh33 (RoHar) y por lo tanto pueden provocar reacciones contradictorias con los reactivos policlonales que los reconocen poco o nada.

- Sólo el ANTI-D (RH1) TOTEM es capaz de permitir la detección del D parcial DVI con la técnica de hemato-aglutinación indirecta en tubo.

- Por otra parte, los clones de los ANTI-D pueden reconocer de forma específica ciertos epítipos del antígeno D (ver la tabla de la última página).

- Para la identificación de los D parciales en general, se recomienda el uso de la caja D-CREEN.

BIBLIOGRAFIA

- BETREMIEUX C., BEOLET M., KEYSER L.

A new strategy for D phenotyping with TOTEM®multimonoclonal ANTI-D reagent XXIII rd I.S.B.T. Congress, July 1994

- ARAMBURU E., RABASA P., ESQUIROZ R., GALARRETA T., OLCOZ B.

Valoración de un antisuero anti-D IgM-IgG monoclonal (DIAGAST) en donantes de sangre con expresividad débil del antígeno anti D.

Congrés d'Hématologie - Madrid - Octobre 1990.

- MANNESSIER L. - BLOOD TRANSFUSION CENTRE- LILLE - France.

The use of monoclonal antibodies as blood grouping reagents : applications, advantages and problems.

Congress of the Italian Society for blood transfusion - Rome - June 1992

- Las Especificaciones Técnicas Comunes para los productos médicos destinados al diagnóstico *in vitro* del anexo II, lista A, de la directiva 98/79/CE se publican en el boletín oficial de las comunidades europeas con el N° C (2002) 1344, texto de interés para la EEE (2002/364/CE).

DENOMINACION		REFERENCIA	CLON	TIPO	ORIGEN
ANTI-A (ABO1)	5 x 10 ml	70501	9113D10	IgM	Murino
ANTI-B (ABO2)	5 x 10 ml	70502	9621A8	IgM	Murino
ANTI-A,B (ABO3)	5 x 10 ml	70503	9113D10 + 152D12	IgM	Murino
ANTI-D (RH1) IgM I	5 x 10 ml	71000	P3X61	IgM	Humano
ANTI-D (RH1) IgM II	5 x 10 ml	71005	HM10	IgM	Humano
ANTI-D (RH1) TOTEM	5 x 10 ml	71010	P3X61 + P3X21223B10 + P3X290 + P3X35	IgM IgM IgG IgG	Humano
ANTI-D (RH1) IgG	5 x 10 ml	71020	HM16	IgG	Humano
ANTI-DCE (RH1,2,3)	5 x 5 ml	74111	P3X61 + P3X25513G8 + P3X234	IgM	Humano
NEG CONTROL	5 x 10 ml	79000			

CLONE	Tipo	D II	D IIIa III b III c	D IVa	D IVb	D Va	D VI	D VII	D FR	D BT	RoHar	HMI
P3X61	IgM	+	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	+
HM10	IgM	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
HM16	IgG	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
P3X21223B10	IgM	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
P3X290	IgG	+	+	+/-	-	+	+/-	+	+	-	-	+
P3X35	IgG	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+

■ "+" indica un resultado positivo cuya intensidad puede variar en función del número de sitios antigénicos presente en los hematíes analizados.

■ "+/-" indica que se puede obtener un resultado positivo o negativo dependiendo de la antigenicidad.