



ATLAS ANTI-A, ANTI-B, ANTI-AB y ANTI-D Slide microplaca y prueba en cubetas

Sólo para uso profesional In-Vitro
Conservar a 2-8°C

USO

Una prueba rápida para la agrupación sanguínea ABO basado en el método de aglutinación, y para la detección de individuos Rh positivo y negativo.

INTRODUCCION Y PRINCIPIOS

Los reactivos ABO se preparan desde cultivos sobrenadantes de hidridadas líneas celulares de ratón secretoras de inmunoglobulina. Los reactivos son diluidos con buffer de fosfato conteniendo cloruro de sodio, EDTA y albúmina bovina dando reactivo optimizado para el uso de procedimientos en tubo, slide y microplaca. El Anti-A es coloreado con ácido azul (azul patentado), Anti-B es coloreado con ácido amarillo (tartrazina), y el Anti-AB no es coloreado. El procedimiento de la prueba está basado en el principio de aglutinación, donde las células rojas poseedoras del antígeno aglutinado en la presencia de el anticuerpo correspondiente indican que el resultado es positivo. La prueba es considerada negativa cuando no aparece aglutinación.

El reactivo Anti-D está preparado de una cuidadosa mezcla de IgM y IgG humano monoclonado adecuado para los procedimientos de slide, tubo y microplato. El reactivo aglutinará directamente las células Rh D positivas, incluyendo mayoría de las variantes (pero no DVI) y una alta proporción de D débil (D^H) fenotipos. El reactivo aglutinará la categoría D^{VI} y un bajo grado de débil D (D^H) fenotipos por la indirecta técnica de antiglobulina.

El reactivo Anti-D es diluido con solución de cloruro de sodio, solución de fosfato de sodio y albúmina bovina (libre de caprilato de sodio). El procedimiento está basado en principios de aglutinación, donde las células rojas poseedoras del antígeno aglutinado en la presencia del anticuerpo correspondiente en el reactivo indicando que el resultado es positivo. La prueba es considerada negativa cuando no aparece aglutinación.

MATERIALES

MATERIALES PROPORCIONADOS

1. Reactivo del grupo ABO.
2. Mezcla del reactivo Anti-D IgG/IgM.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

3. Tubos de ensayo de cristal, slide ó U-button microplato.
4. Solución salina isotónica buferada (pH 6.9).
5. Palillos, aplicadores.
6. Centrífuga (900-1000 RCF para tubos de ensayo y 140 RCF para pruebas en microplato).
7. Mezclador microplato (Sólo para procedimientos en microplato).
8. Reloj.
9. Incubador.

PRECAUCIONES

1. Estos reactivos son derivados de fuentes humanas y animales, así, debe tomarse un cuidado apropiado del uso y desecho de estos reactivos, así como métodos desconocidos que puedan garantizar la ausencia de agentes infecciosos.
2. Los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 a 8°C. Nunca congelar o exponer a altas temperaturas.

3. No utilice los reactivos si están marcados con turbidez, lo cual puede indicar el deterioro o contaminación del reactivo.
4. Los reactivos contienen 0.1% de azide de sodio el cual es tóxico y puede ser absorbido por la piel. Cuando es drenado, el desague debe lavarse bien con agua.
5. Los reactivos deben ser usado como son suministrados y de acuerdo con el procedimiento indicado debajo. **No los utilice después de la fecha de expiración.**

COLECCIÓN Y PREPARACION DEL ESPECIMEN

La sangre colectada en anticoagulante (EDTA, heparina o citrato) en tubo estéril con tapón, conservado entre 2°C y 8°C, debe ser examinada dentro de 48 horas, en la medida en que no sean visibles signos de hemólisis. En el momento de la prueba, centrifugar la muestra de sangre a 1200xg por 3 minutos.

PROCEDIMIENTO

A. TECNICA DE PLATO A TEMPERATURA AMBIENTE

1. En un plato rigurosamente limpio, usando el gotero, aplicar 1 gota del reactivo (Anti-D si se mide Rh, ABO si se mide grupo sanguíneo ABO)
2. Tome 25 µl de sedimento celular sin lavar y aplicar luego de cada gota del reactivo, cuidando no crear contacto entre gotas.
3. Mezcle la sangre y el reactivo usando un movimiento espiral con el extremo del agitador creando así un rombo de diámetro regular de 2 a 3 cm.
4. Incubar el plato a temperatura ambiente y sin agitar por 30 segundos.
5. Mantenga el plato y de un movimiento rodante por 3 minutos mientras observe macroscópicamente la posible aparición de aglutinación.
6. Lea la reacción inmediatamente.

B. METODO DIRECTO EN UN TUBO A TEMPERATURA AMBIENTE

1. Prepare un 5% de suspensión de glóbulos rojos de la sangre en solución isotónica.
2. Usando el gotero, transfiera una gota de (reactivo Anti-D si se mide Rh, reactivo ABO si se mide grupo sanguíneo ABO) en el tubo.
3. Agregue 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos de la sangre.
4. Mezcle para homogenizar la mezcla, entonces centrifugar a 500xg por un (1) minuto.
5. Lea macroscópicamente mientras suavemente agite los tubos así como separar el sedimento de glóbulos rojos.
6. Notar la aparición de cualquier aglutinación.

C. METODO DE ANTIGLOBULINA INDIRECTA PARA ANTI-D

1. Inmediatamente después de centrifugado y lectura indicada anteriormente, si la reacción es débil o negativa, agite los tubos e incuba a 37°C por 15 minutos.
2. Lave los glóbulos rojos dos veces con solución salina isotónica y descarte el último líquido de lavado.
3. Agregue 50 µl de GLOBULINA ANTI-HUMANA a los glóbulos rojos sedimentados. Mezcle, luego centrifugar a 120xg por un (1) minuto.
4. Realizar la lectura como es indicado en la sección 1.

D. PROCEDIMIENTO PRUEBA MICROPLATO PARA GRUPO SANGUINEO ABO

1. Preparar una suspensión a 2-3% de glóbulos rojos en solución salina isofónica. (pH 6.9).
2. En un pocillo del microplato U-Bottom coloque un volumen (30-50 µl) del reactivo para la agrupación sanguínea ABO y un volumen de suspensión de células a 2-3%.
3. Mezclar bien, preferiblemente con un agitador de microplato, teniendo cuidado para evitar contaminación cruzada.
4. Centrifugar el microplato a 140 RCF por un (1) minuto. Las pruebas deben incubadas a temperatura ambiente (18-25°C) por 15 minutos previo a la centrifugación.
5. Incline el plato a un ángulo de 60-90°C en el tope del banco y

observar por transmisión de hasta 3 minutos. Las reacciones negativas permiten que las células fluyan hacia abajo en una transmisión uniforme. Reacciones positivas permanecen como un botón distinto, ya sea en el fondo del pocillo, o de vez en cuando deslizándose por el lado. Alternativamente, las células pueden ser re-suspendidas usando cuidadosamente agitación controlada en un agitador de microplato, luego recurrir al examen de aglutinación visual.

E. PROCEDIMIENTO DE DESLICE

1. PARA GRUPO SANGUINEO ABO

1. Coloque un volumen del reactivo Grupo Sanguíneo ABO en un slide a temperatura ambiente (18-25°C).
2. Agregue un volumen de 35%-45% de células propiamente suspendidas o grupo compatible de plasma o suero.
3. Mezcle el reactivo y las células utilizando un aplicador limpio sobre un área de aproximadamente 20x40mm.
4. Suavemente incline los slides hacia atrás y adelante y observar por aglutinación por un período que no exceda dos minutos.

2. POR ANTI-D

1. Coloque un volumen de la mezcla Anti-D en un slide etiquetado precalentado a 40-50°C en una caja de vista iluminada.
2. Agregue un volumen a 35-45% de la suspensión de células en solución salina isotónica buferada (pH 6.9), suero o plasma en el slide. Mezcle la mezcla de suero-Células con un palillo aplicador limpio sobre un área de aproximadamente 20x40mm.
3. Inclinar los slides hacia atrás y adelante y observar por aglutinación.
4. Si no aparece aglutinación dentro de 2 minutos, los resultados son interpretados como negativo. No confunda secados periféricos o hebras de fibrina como aglutinación.
5. Si la prueba es negativa, se requiere una prueba DU.

LECTURA DE LOS RESULTADOS

POSITIVO: Si aparece aglutinación.

NEGATIVO: Si no se observa aglutinación.

Reacciones:

Reactivo			Células suspendidas				Grupo ABO
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	A1	A2	B	O	
+	-	+	-	-	+	-	A
-	+	+	+	+	-	-	B
+	+	+	-	-	-	-	AB
-	-	-	+	+	+	-	D

Las pruebas en tubo de grupo sanguíneo ABO y pruebas en microplato deben leerse inmediatamente después de la centrifugación. Las pruebas de slide deben interpretarse dentro de dos minutos para evitar la posibilidad de que un resultado negativo que puede ser incorrectamente interpretado como positivo debido al secado del reactivo.

Retraso en la lectura e interpretación de los resultados puede resultar en un débil positivo o falso negativo, las pruebas de slide deben interpretarse al final de los dos minutos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Un resultado falso/positivo puede ocurrir de una contaminación con los materiales de la prueba, una indebida concentración de células, indebido tiempo de incubación o temperatura, o cualquier desviación en el procedimiento recomendado.
2. Una indebida centrifugación puede causar un resultado falso. El tiempo de centrifugación mencionado debe considerarse como sólo sugerencia. Un tiempo apropiado de centrifugación debe ser determinado por el que produzca la reacción más fuerte del anticuerpo con células antígeno-positivo, permitiendo aún una fácil re-suspensión del antígeno-negativo en glóbulos rojos.

3. Los glóbulos rojos que muestran un resultado positivo de antiglobulina directa no puede ser escrito por D^U.

4. Se pueden observar reacciones débiles cuando sangre conservada que con sangre fresca.

5. Los antígenos ABO no son completamente desarrollado al nacimiento, por lo tanto reacciones débiles pueden ocurrir con el cordón o glóbulos rojos neonatal. Muestras del cordón contaminadas con gelatina Wharton's puede dar resultados negativos o reacciones débiles.

6. Las muestras de sangre de débiles subgrupos A ó B pueden dar lugar a resultados falsos negativos reacciones débiles.

7. Para confirmar la reactividad y especificidad del reactivo grupo sanguíneo ABO y el reactivo Anti-D es recomendado que un apropiado antígeno-positivo y antígeno-negativo sean probados con el reactivo en cada día de su uso.

8. La interpretación de agrupación sanguínea ABO en individuos mayores de 6 meses de edad deben ser confirmados por prueba en suero o plasma del individuo en contra del grupo con glóbulos rojos A y grupo B (agrupación revertida).

9. Si los resultados obtenidos con el suero no se correlacionan con los glóbulos rojos de la prueba, es requerida una investigación adicional.

SENSITIVIDAD Y ESPECIFICIDAD

	Sensitividad	Especificidad
Reactivos ABO	Son revisados antes de su liberación por su reactividad usando el procedimiento recomendado en una amplia variedad de células.	La fuente de anticuerpos monoclonales del cual son derivados estos reactivos se demuestra usando un panel de células antígeno-Negativo.
Reactivos Anti-D	Para prueba de slide y tubo es manufacturado dentro de las directrices y requisitos potenciales de la FDA de los Estados Unidos U.S.	Está demostrado por el procedimiento recomendado con un panel de prueba glóbulo rojo antígeno positivo. Anticuerpos a Lec Led, Ytb, Mg y Wra, no deben ser excluidas en pruebas rutinarias de especificidad. Estas y otros antígenos de baja frecuencia pueden ser probados con reactivos disponibles de ATLAS.

REFERENCIAS

1. BCSH Blood Transfusion Task Force. Guidelines for microplate techniques in liquid-phase blood groupin and antibody screening. Clin. Lab. Haem 1990: 12, 437-460
2. Issitt P. D. Applied Blood Group Serology, 3rd. Ed. Miami: Montgomery Scientific, 1985.
3. Kholer G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, 256, 495-497, 1975.
4. Messeter L. et. Al. Mouse Monoclonal antibodies with anti-A, anti-B and Anti-A, B specificities, some superior to human polyclonal ABO reagents, Vox Sang 46, 185-194, 1984.
5. Race R.R. and Sanger R. Blood groups in man, 6th ed., Oxford: Balckwell Scientific, 1975