



Anti-A, Anti-B, Anti-AB

Reactivi monoclonali pentru testare, pentru determinarea grupei sanguine

INFORMAȚII PENTRU UZ PROFESIONAL



RO

Domenii de aplicare

Reactivii monoclonali de testare Anti-A, Anti-B și Anti-AB sunt destinați utilizării diagnostice in vitro și sunt utilizați pentru identificarea grupei sanguine. Aceștia sunt utilizați pentru identificarea calitativă a antigenilor sistemului de grupe sanguine ABO prin aglutinarea eritrocitelor umane [fără sau cu anticoagulanți (EDTA, citrat sau PAGGS-M)] în teste manuale pe placă și în eprubete efectuate de personal specializat.

Principiul testării

Sistemul uman de grupe sanguine ABO este definit prin prezența sau absența antigenelor A și/sau B la suprafața eritrocitelor. Caracteristica specială a sistemului de grupe sanguine ABO constă în faptul că persoanele care nu posedă antigenul A și/sau antigenul B la suprafața eritrocitelor prezintă de obicei anticorpi serici împotriva antigenului(lor) lipsă. Tabelul de mai jos prezintă principalele antigene și principalii anticorpi ai sistemului ABO:

Grupă sanguină	Antigene prezente la suprafața eritrocitelor	Anticorpi prezenți în ser
0	Nici A, nici B	Anti-A și Anti-B
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A și B	niciunul

Anticorpii monoclonali specifici ai reactivilor de testare aglutinează eritrocitele care posedă antigenul sau antigenele omoloage. Lipsa aglutinării indică absența antigenului relevant. Identificarea grupei sanguine ABO este completă doar dacă a fost confirmată și prin identificarea izoaglutininelor din ser (Directiva privind hemoterapia, a se vedea și „Interpretarea rezultatelor”).

Rezultatul identificării antigenelor prin utilizarea reactivilor de testare trebuie confirmat prin testarea serului cu eritrocite aparținând unei grupe sanguine ABO cunoscute (a se vedea mai jos „Interpretarea rezultatelor testului”). Dacă există diferențe între rezultatele testului privind antigenul eritocitar și aloaglutinină, acestea trebuie clarificate.

Compoziție

Reactivii de testare sunt obținuți din supernatantul culturii celulare al liniilor celulare hibride. Liniile celulare hibride au fost obținute prin fuzionarea celulelor splenice ale șoarecilor imunizați cu celule mielomatoase de șoarece. Anticorpii aparțin izotipului IgM. Reactivii monoclonali de testare conțin anticorpi ai următoarelor linii celulare hibride: Reactiv de testare Anti-A: clonă sifin A-11H5, reactiv de testare Anti-B: clonă sifin B-6F9, reactiv de testare Anti-AB: clonă sifin A-5E10 și clonă sifin B-2D7. Reactivii de testare Anti-A și Anti-B sunt colorați pentru a evita confundarea lor și pentru a permite verificarea amestecului de testare în culorile albastru și, respectiv, galben. Conservant: azidă de sodiu ($\leq 0,99$ mg/ml).

Termen de valabilitate și condiții de depozitare

În cazul în care sunt păstrați la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C reactivii de testare pot fi utilizați până la data indicată pe ambalaj. După deschidere, aceștia trebuie păstrați în ambalajul închis bine la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C. În timpul efectuării testului reactivul poate fi păstrat pentru 2-3 ore la temperaturi cuprinse între 18 °C și 26 °C. A se evita contaminarea bacteriană. Nu utilizați reactivii dacă au aspect evident tulbure.

Materialul de testare

Pentru efectuarea testului se poate utiliza sânge integral anticoagulat sau o suspensie eritocitară^{2a,b} de 3-5 % din sedimentul de eritrocite. Sângele trebuie recoltat în condiții de asepsie, cu sau fără anticoagulant (EDTA, citrat sau PAGGS-M). Proba trebuie testată cât mai curând posibil după recoltare. Dacă testarea este efectuată mai târziu, proba trebuie păstrată la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C. Contaminarea bacteriană a probei poate conduce la obținerea unor rezultate false ale testării. Sângele recoltat în heparină nu trebuie păstrat mai mult de două zile. Probele de sânge recoltat în EDTA, precum și cele de sânge coagulat, pot fi examinate într-un interval de până la 14 zile de la recoltare, iar sângele donat poate fi testat până la data de expirare (a se vedea mai jos, la secțiunea „Surse de eroare și limitări”).

Reactivi și materiale suplimentare necesare

Eprubete pentru testare (75 × 12 mm sau 70 × 8 mm), plăci, pipete (volumul picăturii 40-50 μ l), lamele, baghete aplicatoare, soluție fiziologică de clorură de sodiu (154 mmol/l), centrifugă de laborator, cronometru.

Metode

1. Testul pe placă sau lamelă

- 1.1. Aplicați o picătură (40-50 μ l) din reactivii pentru testare Anti-A, Anti-B și Anti-AB pe câte o placă etichetată corespunzător. Pot fi folosite și lamele (tehnica Lauer) în locul plăcilor.
- 1.2. La fiecare picătură de reactiv pentru testare adăugați o picătură (40-50 μ l) dintr-o suspensie 5 % de eritrocite^{2b} care trebuie testate (în ser fiziologic) și amestecați cu atenție cu o baghetă aplicatoare curată de sticlă sau de plastic.
- 1.3. Examinați pentru a observa prezența aglutinării, după 5, maxim 20 de minute de incubare la 18...26 °C, prin rotirea sau balansarea lentă a plăcii sau a lamelei. În locul suspensiei 5 % se poate utiliza o picătură de sânge. Atenție: Dacă este utilizat sânge integral anticoagulat, timpul de reacție trebuie limitat la maxim 5 minute pentru a evita rezultatele fals pozitive cauzate de efectele de uscare.
- 1.4. Notați rezultatele testului. Rezultatele testului trebuie interpretate imediat după terminarea testului, deoarece produsul de reacție este instabil.

2. Testul în eprubetă

- 2.1. Preparați o suspensie din eritrocitele care urmează să fie testate (spălate sau nespălate) cu o concentrație de 3-5 % în soluție salină fiziologică.^{2a,b}
- 2.2. Aplicați o picătură (40-50 μ l) din reactivii pentru testare Anti-A, Anti-B și Anti-AB în trei eprubete mici (de ex. 70 × 8 mm) etichetate corespunzător.
- 2.3. Adăugați o picătură (40-50 μ l) din suspensia de eritrocite în fiecare eprubetă și amestecați bine prin scuturare.
- 2.4. Centrifugați imediat timp de 1-2 minute la o forță relativă de centrifugare (rcf) de 180 până la 270 × g.
- 2.5. Examinați supernatantul pentru a observa absența hemolizei. Hemoliza poate fi consecința contaminării bacteriene.
- 2.6. Scuturați ușor eprubeta pentru a desprinde sedimentul de pe fundul acesteia și examinați conținutul pentru a observa prezența aglutinării.
- 2.7. Notați rezultatele testului. Rezultatele testului trebuie interpretate imediat după terminarea testului, deoarece produsul de reacție este instabil.

Interpretarea rezultatelor testului

Trebuie să existe concordanță între rezultatele detectării antigenului (gruparea celulară) și rezultatele detectării aloanticorpilor (gruparea serologică) ale unei probe de sânge. Tabelul de mai jos prezintă modelele de reacție ale celor mai frecvente fenotipuri ABO și frecvențele lor aproximative:

Gruparea celulară			Grupare serologică				Grup ABO	Frecvență %
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Celule A ₁	Celule A ₂	Celule B	Celule 0		
+	-	+	-	-	+	-	A	40
-	+	+	+	+	-	-	B	11
-	-	-	+	+	+	-	0	45
+	+	+	-	-	-	-	AB	4

Măsuri de precauție și avertismente

- Utilizarea procedurilor biotehnologice de producție înseamnă că riscul de contaminare a reactivilor de testare cu agenți infecțioși este practic inexistent. Deoarece reactivii pentru testare conțin materiale de origine animală (ser de făt bovin, stabilizatori), aceștia ar trebui tratați ca având potențial infecțios și trebuie manipulați corespunzător.
- Reactivii pentru testare conțin azidă de sodiu; evitați contactul cu tegumentul sau cu membranele mucoase.
- Materialele rămase de la testele uzate trebuie eliminate ca deșeu în conformitate cu directivele naționale aferente, de exemplu, în Germania, ca deșeu din grupa AVV 18 01 (AS 18 01 03) în conformitate cu „Directiva privind eliminarea corectă a deșeurilor din unitățile sanitare” (Directiva LAGA, versiunea actuală).

Caracteristici de performanță și limitele metodei

Evaluarea performanței conform Regulamentului de punere în aplicare (UE) 2022/1107 al Comisiei de stabilire a unor specificații comune (SC) a evidențiat următoarele valori de diagnostic calculate:

reagentul	pozitiv	fals-negativ	sensibilitate	negativ	fals-positiv	specificitate
Anti-A	12359	0	100 %	13326	0	100 %
Anti-B	5535	0	100 %	20150	0	100 %
Anti-AB	1215	0	100 %	462	0	100 %

- Reactivii monoclonali de testare aglutinează antigenele cu expresie slabă cu o intensitate a aglutinării normală sau slabă (A₃, B₃^{slab}) sau reacție slabă până la negativă (A_x). Pentru a determina antigenele exprimate slab ar trebui utilizat testul în eprubetă datorită sensibilității sale mai ridicare, cu o incubare de 30 de minute, dacă este necesar.
- Reactivul monoclonal de testare Anti-B nu reacționează cu B dobândit.
- Reactivul monoclonal de testare Anti-A reacționează cu Tn. Persoanele cu Tn pozitiv trebuie excluse din rândurile donatorilor de sânge deoarece existența Tn este considerată a fi un simptom al unei stări preleucemice, iar eritrocitele sunt poliaglutinabile.
- Determinări ale titrului: Pentru a prepara diluții ale reactivilor monoclonali de testare se recomandă utilizarea de ser fiziologic care conține 2 % proteine (ser AB, albumină serică bovină) pentru a facilita resuspensia produsilor de reacție de pe placă sau de pe fundul eprubetei.

Surse de eroare și limitări

- **Controlul intern al calității:** pentru fiecare test trebuie testate în paralel eritrocite de control pozitive și negative.
- O concentrație a eritrocitelor mai mică decât 3% poate cauza reacții de intensitate mai redusă pe placă sau lamelă.
- Interpretarea reacțiilor obținute la testarea sângelui de sugar poate fi complicată de faptul că serul sugarilor nu conține în mod necesar anticorpi pentru fiecare antigen absent din celule, iar anticorpii pasivi anti-A și/sau anti-B din sângele mamei pot cauza rezultate contradictorii atunci când pentru teste se utilizează probe din sângele din cordonul ombilical. Probele din sângele din cordonul ombilical pot, de asemenea, conduce la reacții mai slabe decât cele normale în cazul testelor de grupare celulară, deoarece antigenele ABH nu sunt complet dezvoltate la naștere.
- În cazul probelor mai vechi de sânge se pot obține rezultate de intensitate mai slabă decât în cazul probelor proaspete.
- Determinarea titrurilor: Pentru diluarea reactivilor monoclonali de testare pentru determinarea titrului trebuie utilizată o soluție fiziologică de clorură de sodiu cu un adaos de aproximativ 2 % proteine (de exemplu, albumină serică bovină), pentru a facilita resuspensia produselor de reacție de pe placă sau de pe fundul eprubetei.
- Pe plăci probele de sânge pot uneori reacționa prin formare de ruloari, situație care poate fi confundată cu o aglutinare slabă și poate fi interpretată în mod eronat ca un rezultat pozitiv. Acest fenomen are cauze non-imunologice. Formarea de ruloari survine de asemenea în cazul sângelui heparinic, al sângelui provenind de la pacienți tratați cu substanțe care heparină sau expandează plasma (de ex. dextran sau hidroxietil amidon), precum și la pacienții cu plasmomi tom (conținut ridicat de proteine, modificări ale compoziției proteinelor), afecțiuni oncologice (tabelou sanguin patologic) sau tulburări de coagulare. În cazul acestor pacienți utilizați testul în eprubetă, deoarece acest fenomen nu poate fi detectat de obicei în suspensie.
- Reactivul monoclonal de testare Anti-A identifică Tn. Subiecții Tn-pozitivi trebuie excluși de la donarea de sânge, deoarece prezența Tn este considerată a fi un semn al unei stări preleucemice, iar eritrocitele sunt poliaglutinabile.
- Pentru a obține rezultate corecte trebuie respectate concentrațiile suspensiilor de eritrocite și timpii de reacție menționați mai sus.
- Depozitarea necorespunzătoare afectează eficacitatea reactivului de testare respectiv.

Vigilență

Toate incidentele grave apărute în legătură cu produsul trebuie raportate către sifin diagnostics gmbh, în calitate de producător, precum și către autoritatea competentă a statului membru în care utilizatorul și/sau pacientul își are sediul sau reședința. Raportul sumar actual privind siguranța și performanța este disponibil la cerere.

Referințe

(1) Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie), Versione curentă. (2) Technical Manual, 17th ed. Bethesda, American Assoc. of Blood Banks, 2011 (a) method 1.5 b) method 1.6). (3) Messeter L et al: Mouse monoclonal antibodies with Anti-A, Anti-B and Anti-AB specificities, some superior to human polyclonal ABO reagents. Vox Sang 1984; 46, 185-194

Dimensiunea ambalajului

Specificitatea	Anti-A	Anti-B	Anti-AB
1 x 10 ml	BG1101	BG1111	BG1131
10 x 10 ml	BG1101-01	BG1111-01	BG1131-01

Explicarea simbolurilor utilizate

LOT	Numărul lotului	IVD	Aparatură medicală de diagnostic in vitro	ACT	Activitate/titru minim		A se utiliza până la AAAA-LL (LL=sfârșitul lunii)
REF	Numărul de catalog	ABO	Reactiv de testare pentru determinarea grupei sanguine	CLONE	Descrierea clonei		Limitare a temperaturii
							Consultați instrucțiunile de utilizare