

Imuno-Hemato Anti-A e Anti-B

Reagente de anticorpos monoclonais IgM para determinação qualitativa de Antígenos A e/ou B nos eritrócitos para determinação do grupo sanguíneo humano em lâmina, tubo e microplaca por técnica de aglutinação.

Monoclonal antibodies IgM reagents for qualitative determination of A and/or B antigens in erythrocytes for determination of human blood group in glass slide, tube and microplate by technique of agglutination.

Reactivos de Anticuerpos monoclonales IgM para la determinación cualitativa de antígenos A y/o B en eritrocitos humanos para la determinación de grupo sanguíneo en laminas de vidrio, tubos y microplacas por técnica de aglutinación.

Reagents for the qualitative determination of A and B antigens in human erythrocytes by the use of monoclonal IgM antibodies.

[REF**]** **1054010-A - 10ml (anti-A)**

[REF**]** **1054050-A - 50ml (anti-A)**

[REF**]** **1054100-A - 100ml (anti-A)**

[REF**]** **1054010-B - 10ml (anti-B)**

[REF**]** **1054050-B - 50ml (anti-B)**

[REF**]** **1054100-B - 100ml (anti-B)**


WAMA Diagnóstica
Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT
CEP 13573-470 - São Carlos - SP - Brasil
Fone 55 16 3377.9977 / Fax 55 16 3377.9970
www.wamadiagnostica.com.br
SAC 0800 772 9977

PORTUGUÊS

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

O Sistema ABO foi descrito em 1900 por Landsteiner e permanece até hoje como o sistema mais importante dentro da prática transfusional. A transfusão ABO incorreta pode resultar na morte do paciente, com uma reação hemolítica intravascular, seguida de alterações imunológicas e bioquímicas.

A determinação do grupo sanguíneo consiste na identificação dos antígenos do sistema ABO existentes nos eritrócitos e que são geneticamente determinados por 3 genes, respectivamente, os genes A, B e O.

Existem dois tipos de anticorpos no sistema sanguíneo ABO: os de ocorrência natural e os imunes. Os de ocorrência natural começam a aparecer no soro cerca de três a seis meses após o nascimento. Eles são anticorpos anti-A (em indivíduos do grupo B), anti-B (em indivíduos do grupo A), anti-A e anti-B (em indivíduos do grupo O) e ausentes em indivíduos do grupo AB. Os anticorpos naturais representam uma mistura com maior quantidade de imunoglobulinas da classe M (IgM) do que imunoglobulinas da classe G (IgG). Já os imunes ocorrem por aloimunizações prévias, que podem ser através de heteroimunização por substâncias de origem animal ou bacteriana, ou por aloimunização, por gestação ou transfusão ABO incompatível. Esses anticorpos são usualmente referidos como hemolisinas, sendo a maioria da classe IgG.

A tipagem sanguínea de um indivíduo deve ser sempre realizada através de duas provas: a direta e a reversa. Na prova direta testa-se os antísoros contra uma suspensão de hemácias a 5% do indivíduo, cujo objetivo é identificar os antígenos presentes na superfície do glóbulo vermelho. Indivíduos do grupo A terão antígenos A em seus eritrócitos, do grupo B terão antígenos B, do grupo AB terão antígenos A e B, e do grupo O não terão nem antígenos A, nem B em sua superfície. Na prova reversa, o objetivo é identificar os anticorpos livres no soro, testando o soro dos indivíduos contra uma suspensão de hemácias a 5% conhecidas, uma de hemácias do tipo A, Rh negativo, e outra do tipo B, Rh negativo. Indivíduos do grupo A terão anticorpos anti-B, os do grupo B terão anticorpos anti-A, os do grupo AB não terão anticorpos e os do grupo O terão anticorpos anti-A e anti-B circulantes.

Os soros de recém-nascidos não contém ainda os anticorpos naturais anti-A e anti-B, podendo, inclusive, ocorrer a presença de anticorpos maternos anti-A e anti-B e, portanto, a prova reversa não deve ser realizada nessa faixa etária, pois levará a resultados incorretos. A utilização da prova direta e reversa permitem resultados seguros e evitam intercorrências, como a presença de subgrupos de A e B que podem apresentar reações fracas ou negativas na classificação direta.

O anti-soro **Imuno-HEMATO Anti-A e Anti-B da WAMA** são anticorpos monoclonais de classe IgM, preparados a partir do sobrenadante de cultura in vitro de linhagem de células de

rato hibridizadas secretando imunoglobulinas. O anti-soro oferece especificidade (antigenicidade), potência (título) e avidez (rapidez para que se estabeleça a aglutinação) iguais ou superiores aos padrões de referência internacionais, assegurando ótima qualidade na identificação dos antígenos A e B nas provas de tipagem sanguínea.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O procedimento do ensaio é baseado no princípio da aglutinação, onde células vermelhas do indivíduo possuindo antígeno A e/ou B em sua superfície aglutinarão na presença do anti-soro anti-A e/ou anti-B, indicando um resultado positivo. O teste é considerado negativo quando não aparece aglutinação.

APRESENTAÇÃO DO KIT
Imuno-Hemato Anti-A
[REF**]** **1054010-A – 10ml (anti-A)**
1. Antisoro Anti-A (1 x 10 mL)
2. Instruções para uso

[REF**]** **1054050-A – 50ml (anti-A)**
1. Antisoro Anti-A (5 x 10 mL)
2. Instruções para uso

[REF**]** **1054100-A – 100ml (anti-A)**
1. Antisoro Anti-A (10 x 10 mL)
2. Instruções para uso

Imuno-Hemato Anti-B
[REF**]** **1054010-B – 10ml (anti-B)**
1. Antisoro Anti-B (1 x 10 mL)
2. Instruções para uso

[REF**]** **1054050-B – 50ml (anti-B)**
1. Antisoro Anti-B (5 x 10 mL)
2. Instruções para uso

[REF**]** **1054100-B – 100ml (anti-B)**
1. Antisoro Anti-B (10 x 10 mL)
2. Instruções para uso

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REATIVOS
• **ANTISORO ANTI-A:** pronto para uso. Contendo anticorpos monoclonais de classe IgM, anti-antígeno A do Sistema ABO. Reagente contendo corante azul. Estável entre 2 – 8 °C até a data de vencimento impressa na etiqueta do frasco. Armazenamento inadequado prejudica a eficácia do reagente. Contém NaN3 < 0,095% como conservante. NÃO CONGELAR. Somente para uso in vitro.

• **ANTISORO ANTI-B:** pronto para uso. Contendo anticorpos monoclonais de classe IgM, anti-antígeno B do Sistema ABO. Reagente contendo corante amarelo. Estável entre 2 – 8 °C até a data de vencimento impressa na etiqueta do frasco. Armazenamento inadequado prejudica a eficácia do reagente. Contém NaN3 < 0,095% como conservante. NÃO CONGELAR. Somente para uso in vitro.

Obs.: O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização, e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que mantido na temperatura indicada (2 -8 °C).

AMOSTRAS
Usar amostra de sangue fresco. Evitar amostras hemolizadas.
Se não for possível realizar os testes após a coleta, a amostra deve ser conservada refrigerada entre 2 – 8 °C. De acordo com o anticoagulante utilizado as amostras deveriam ser testadas dentro dos seguintes prazos:

- Heparina Oxalato de Sódio : 2 dias
- EDTA Citrato de Sódio : 14 dias
- ACD ou CPD : 28 dias

O armazenamento prolongado da amostra pode causar deterioração do antígeno e resultar em classificação incorreta.

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO
• Técnica em Lâmina: lâmina de vidro, micropipeta de 50µl e ponteiros ou pipeta Pasteur, vareta misturadora.
• Técnica em Tubo: tubos testes (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm), micropipeta de 50µl e 1000µl, ponteiros, centrífuga, solução salina isotônica 0,85 ou 0,9%.
• Recipiente para descarte de material.

PROCEDIMENTO
Independente da técnica adotada deixar o reagente e as amostras atingir a temperatura ambiente antes de iniciar os testes.

I. TÉCNICA EM LÂMINA
1. Sobre uma lâmina de vidro limpa, pingar 1 gota (50 µl) do anti-soro Anti-A ou Anti-B (1) e 1 gota (50 µl) de sangue total a ser testado.
2. Homogeneizar uniformemente o reagente e as células sanguíneas usando uma vareta misturadora, sobre uma área de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro.
3. Com leves movimentos de rotação e de inclinação da lâmina verificar a formação de aglutinação dentro de 1 minuto (na presença de antígeno A, a reação se inicia em segundos). Reação inespecífica pode ocorrer devido à secagem da mistura de reação ou se a lâmina é aquecida.

II. TÉCNICA EM TUBO
1. Preparar uma suspensão a 5% de hemácias lavadas a ser testada em solução salina

fisiológica (lavar as hemácias 3 vezes em salina a 0,85% ou 0,9% e, em um tubo de ensaio 12 x 75 mm, pipetar 50 µl das hemácias lavadas + 1 ml de salina. Outros volumes podem ser usados).
2. Em um tubo de ensaio 10 x 75 mm ou 12 x 75 mm marcado pipetar 50 µl da suspensão de hemácias a 5%.
3. Pipetar no mesmo tubo 50 µl do anti-soro Anti-A ou Anti-B (1).
4. Homogeneizar através de leve agitação e incubar a temperatura ambiente (15 – 30 °C) por 1 a 15 minutos.
5. Centrifugar a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) por 1 minuto.
6. Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação.

III. TÉCNICA EM MICROPLACA
1. Preparar uma suspensão a 2-3% de hemácias lavadas a ser testada em solução salina fisiológica (lavar as hemácias 3 vezes em salina a 0,85% ou 0,9% e, em um tubo de ensaio 12 x 75 mm, pipetar 25 µl das hemácias lavadas + 1 ml de salina - outros volumes podem ser usados).
2. Em uma microplaca de fundo em U, pipetar 50 µl da suspensão a 2,5% em cada cavidade da microplaca, de acordo com o número de amostras a serem testadas e o plano de distribuição na placa.
3. Pipetar em cada cavidade 50 µl do anti-soro Anti-A ou Anti-B (1).
4. Homogeneizar através de leve agitação, de preferência com um agitador de microplaca, e incubar a temperatura ambiente (15– 30 °C) por 15 minutos.
5. Centrifugar a microplaca a 140 r.c.f. por 1 minuto.
6. Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação.

IMPORTANTE:
Embora a técnica em lâmina seja utilizada por muitos laboratórios, sugere-se a utilização da técnica em tubo ou microplaca, com prova direta e reversa, uma vez que tal procedimento evita alguns erros de interpretação quando somente a pesquisa do antígeno é utilizada.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
REAÇÃO POSITIVA: visível aglutinação dos eritrócitos, indicando a presença de antígeno A ou B ou ambos na amostra testada.
REAÇÃO NEGATIVA: ausência de aglutinação dos eritrócitos, indicando ausência de antígeno A e/ou B na amostra testada.
REAÇÃO DISCREPANTE: se os resultados obtidos na prova reversa não se correlacionam com o da prova direta, tornando-se necessárias outras investigações.

INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES PARA TIPAGEM SANGÜÍNEA				
PROVA DIRETA - REAGENTE		PROVA REVERSA - SUSPENSÃO		GRUPOS SANGÜÍNEOS
Anti -A	Anti -B	A1	B	A
+	-	-	+	A
-	+	+	-	B
+	+	-	-	AB
-	-	+	+	O

ESPECIFICIDADE DO TESTE
O desempenho do ***Imuno-HEMATO Anti-A e Anti-B*** foi avaliada em 1125 amostras colhidas com os anticoagulantes recomendados. A avaliação demonstrou especificidade de 100% de cada reagente quando comparados com os resultados de um Kit utilizado no mercado.

PRECISÃO DO TESTE
a. Precisão Intra-Ensaio
Foram selecionadas 4 amostras do controle de qualidade (1 para cada tipo sanguíneo) para realizar o teste de repetibilidade. Foram feitas 10 repetições do teste com mesmo operador no mesmo dia.
De acordo com os testes realizados, foi verificado que o kit Família ***Imuno-Hemato Anti-A e Anti-B*** repetiui de maneira satisfatória os resultados com as amostras testadas nas mesmas condições.

b. Precisão Inter-Ensaio
Foram selecionadas 4 amostras do controle de qualidade (1 para cada tipo sanguíneo) para realizar o teste de reprodutibilidade; foram realizados 20 testes com as mesmas amostras em dias e operadores diferentes.
De acordo com os testes realizados, foi verificado que o kit Família ***Imuno-Hemato Anti-A e Anti-B*** reproduz de maneira satisfatória os resultados com as amostras testadas mesmo em diferentes condições.

LIMITAÇÕES DE USO
• Resultados falso-positivos e negativos podem ocorrer por contaminação dos materiais do ensaio, concentração inadequada das suspensões de células, tempo de incubação ou temperatura inadequados, ou por erros de procedimento.
• Os tempos de centrifugação mencionados são meras sugestões. Um tempo de centrifugação adequado deve ser determinado por cada laboratório, e será aquele que produz a mais forte reação do anticorpo com o antígeno nas reações positivas, mas também que permita a ressuspensão fácil do botão de hemácias.
• Reações mais fracas podem ser observadas com sangue armazenado do que com sangue fresco.
• Antígenos ABO não estão completamente desenvolvidos ao nascimento, portanto, reações fracas podem ocorrer quando se usa células vermelhas do cordão umbilical ou de neonatos. Amostras de cordão contaminadas com geleia de Wharton podem dar resultados falso-positivos.
• Amostras de sangue de subgrupos A ou B podem dar origem a resultados falso-negativos ou reações fracas.
• Recomendado-se usar um controle com hemácias com antígeno A sabidamente presentes e hemácias negativas, diariamente, antes de iniciar os testes para confirmar a reatividade e especificidade do reagente.

• Deveria ser sempre realizada prova reversa para pesquisa de anticorpos circulantes em indivíduos maiores de 6 meses de idade, no sentido de se confirmar que os resultados da prova direta se correlaciona com os da reversa. Se eles não se correlacionam, outras investigações devem ser realizadas.
• Glóbulos vermelhos revestidos com aloanticorpos ou auto-anticorpos com a especificidade igual ou semelhante ao reagente, isto é, células que são positivas no teste direto de antiglobulina (teste de Coombs Direto) podem dar reações fracas. Em casos extremos, resultados falso-negativos podem ocorrer.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS
1. Os reagentes devem ser conservados entre 2 – 8 °C.
2. A data de validade corresponde ao último dia do mês assinalado nos rótulos dos frascos e da caixa do kit.
3. Deve ser evitado expor os reagentes a temperaturas elevadas, bem como diretamente ao sol.
4. Não congelar nenhum reagente, pois isto causará deterioração irreversível.
5. O ***Imuno-HEMATO Anti-A e Anti-B da WAMA***, embora seja derivado de fonte animal, não se pode afirmar que esteja isento de agentes infecciosos. Portanto, recomenda-se tratar todos os reagentes como materiais potencialmente infecciosos, bem como ter o mesmo cuidado no descarte destes materiais.
6. Deixar os reagentes adquirir a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de iniciar os testes.
7. Os reagentes devem ser tampados imediatamente após o uso.
8. Não usar reagentes após a data de validade.
9. Os procedimentos informados são apenas para testes manuais. Ao usar instrumentos automáticos ou semiautomáticos, deve ser seguido o procedimento que está contido no manual do operador fornecido pelo fabricante do instrumento.
10. Descartar o material conforme regulamentações locais.
11. Utilizar a Boas Práticas de Laboratórios (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

TERMO DE GARANTIA
A **WAMA Diagnóstica** garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A **WAMA** e seus distribuidores não se responsabilizarão por falhas no desempenho do kit sob essas condições.

ENGLISH

SUMMARY
The ABO System was described in 1900 by Landsteiner and remains until today as the most important system in blood transfusion. The wrong ABO transfusion can result in death of the patient, with an intravascular hemolytic reaction, followed by biochemical and immunological changes.

The determination of blood group consists in the identification of the antigens of the ABO system existing in erythrocytes and that are genetically determined by 3 genes, respectively, the genes A, B and O.

There are two types of antibodies in ABO blood system: the natural occurrence and the immune. The natural occurrence begins to appear in serum approximately three to six months after the birth. They are the anti-A (individuals in the group B), anti-B (individuals in the group A), anti-A and anti-B (individuals in the group O) antibodies and absent in individuals of group AB. The natural antibodies represent a mixture with higher amount of immunoglobulins of class M (IgM) than the immunoglobulins class G (IgG). The immune occur through prior alloimmunizations, which can be through heteroimmunization through substances of animal or bacterial origin, or through alloimmunization, through pregnancy or ABO incompatible transfusion. These antibodies are usually referred to as hemolysins, and most of them are IgG.

Blood typing of an individual should always be performed through two tests: the direct and the reverse. In the direct test, the antisera is tested against 5% suspension of red blood cells of the individual, whose objective is to identify the antigens present on the surface of the red blood cell. Individuals from the group A will have antigens A in their erythrocytes, from group B will have antigen B, from AB group will have antigens A and B, and from group O does not have either antigens A or B on its surface. In the reverse test, the objective is to identify the free antibodies in the serum, testing the sera of individuals against a 5% suspension of known red blood cells, one of red blood cell of type A, negative Rh, and another of type B, Rh negative. Individuals in group A will have anti-B antibodies, in group B will have anti-A antibodies, in AB group will not have antibodies, and in the group O will have anti-A and anti-B circulating antibodies.

The sera of newborns does not yet contain the natural antibodies anti-A and anti-B, and can also have the presence of maternal anti-A and anti-B antibodies and, therefore, the reverse test should not be performed in this age group, because it will lead to incorrect results. The use of direct and reverse test leads to correct results and prevent complications, such as the presence of subgroups A and B that can produce weak or negative reactions in direct test.

The anti-serum **Imuno-HEMATO Anti-A and Anti-B from WAMA** are monoclonal IgM class antibodies, prepared from the supernatant of in vitro cell line culture of hybridized mouse secreting immunoglobulins. The anti-serum offers specificity (antigenicity), potency (titer) and avidity (quickness to establish the agglutination) equal to or greater than the international reference standards, ensuring optimum quality in the identification of A and B antigens on the blood typing tests.

PRINCIPLE OF THE METHOD
The procedure of the assay is based on the principle of agglutination, where red blood cells of individuals possessing A and/or B antigen on their surface will agglutinate in the presence of anti-A and/or anti-B antiserum, indicating a positive result. The test is considered negative when no agglutination appears.

KIT PRESENTATION
Imuno-Hemato Anti-A
[REF**]** **1054010-A – 10ml (anti-A)**
1. Anti-A antiserum (1 x 10 mL)
2. Instructions for use

[REF**]** **1054050-A – 50ml (anti-A)**
1. Anti-A antiserum (5 x 10 mL)
2. Instructions for use

[REF**]** **1054100-A – 100ml (anti-A)**
1. Anti-A antiserum (10 x 10 mL)
2. Instructions for use

Imuno-Hemato Anti-B
[REF**]** **1054010-B - 10ml (Anti-B)**
1. Anti-B antiserum (1 x 10 mL)
2. Instructions for use

[REF**]** **1054050-B - 50ml (Anti-B)**
1. Anti-B antiserum (5 x 10 mL)
2. Instructions for use

[REF**]** **1054100-B - 100ml (Anti-B)**
1. Anti-B antiserum (10 x 10 mL)
2. Instructions for use

REAGENT PREPARATION AND STABILITY
• **ANTISERUM ANTI-A:** ready to use. Contains monoclonal IgM antibodies, anti-A antigen of the ABO System. Reagent containing blue dye. Stable at 2 – 8 °C until expiration date printed on the bottle. Improper Storage affects the effectiveness of the reagent. Contains NaN3 < 0.095% as a preservative. DO NOT FREEZE. For in vitro diagnostic use only.

• **ANTISERUM ANTI-B:** ready to use. Contains monoclonal IgM antibodies, anti-B antigen of the ABO System. Reagent containing yellow dye. Stable at 2 – 8 °C until expiration date printed on the bottle. Improper Storage affects the effectiveness of the reagent. Contains NaN3 < 0.095% as a preservative. DO NOT FREEZE. For in vitro diagnostic use only.

Note: The kit has the same performance after first use, and is stable until the expiration date described on the label if it is kept in the indicated temperature (2-8 °C).

SPECIMENS
Use fresh blood sample. Avoid hemolyzed samples.
If it is not possible to perform the tests after collection, the sample must be kept refrigerated at 2 – 8 °C. In accordance with the anticoagulant used, the samples should be tested within the following time limits:

- Heparine or Oxalate Sodium : 2 days
- EDTA or Sodium Citrate : 14 days
- ACD or CPD : 28 days

The long term storage of the sample may cause deterioration of the antigen and result in incorrect classification.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED
• Glass slide Technique : glass slide, 50 µl pipettor and tips or Pasteur pipette, mixing rod.
• Test Tube Technique: test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm), 50µl micropipette and tips, centrifuge, isotonic 0.85 or 0.9 % saline solution.
• Container for material disposal.

PROCEDURE
Regardless of the technique used, let the reagent and the sample reach room temperature before starting the tests.

I. GLASS SLIDE TECHNIQUE
1. On a clean glass slide, drip 1 drop (50 µl) of Anti-A or Anti-B antiserum (1) and 1 drop (50 µl) of whole blood to be tested.
2. Mix evenly the reagent and blood cells using a mixing rod, over an area of approximately 2.5 cm in diameter.
3. With gentle rotation movements and tilt of the glass slide check for the formation of agglutination within 1 minute (in the presence of antigen A, the reaction starts in seconds). Nonspecific Reaction can occur due to drying of the reaction mixture or if the blade is heated.

II. TUBE TECHNIQUE
1. Prepare a suspension in 5% of washed erythrocytes to be tested in physiological saline solution (wash the cells 3 times in 0.85% or 0.9% saline solution, pipette 50 µl of washed erythrocytes + 1 ml of saline into a 12 x 75 mm test tube. Other volumes can be used).
2. In a labeled 10 x 75 mm or 12 x 75 mm test tube, pipette 50 µl of 5% erythrocytes suspension.
3. Pipette in the same tube 50 µl of the Anti-A or Anti-B antiserum.
4. Mix by gentle agitation and incubate at room temperature (15 -30 °C) for 1 to 15 minutes.
5. Centrifuge at 1,000 RPM (± 100 to 125 g) for 1 minute.

6. Gently resuspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination.

III. MICROPLATE TECHNIQUE

- Prepare a suspension of 2-3% of washed erythrocytes to be tested in physiological saline solution (wash the cells 3 times in 0.85% or 0.9% saline solution and, in a 12 x 75 mm test tube, , pipette 25 µl of washed erythrocytes + 1 ml of saline- other volumes can be used).
- In a microplate with U-bottom, pipette 50 µl of suspension at 2.5% in each cavity of the microtitre plate, according to the number of samples to be tested and the distribution plan on board.
- Pipette in each cavity 50 µl of the anti-A or anti-B antiserum (1).
- Mix by gentle agitation, preferably with a microplate shaker, and incubate at room temperature (15- 30° C) for 15 minutes.
- Centrifuge the microplate 140 r.c.f. for 1 minute.
- Gently resuspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination.

IMPORTANT:

→ Although the slide glass technique is used by many laboratories, it is suggested to use the tube or microplate technique, with direct and reverse test, because such procedure avoids some interpretation errors when only the search of antigen is used.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

POSITIVE REACTION: visible agglutination of erythrocytes, indicating the presence of A or B antigen or both in the tested sample.

NEGATIVE REACTION: Absence of agglutination of erythrocytes, indicating absence of antigen A and/or B in the tested sample.

DISCREPANT REACTION: if the results obtained in the reverse test do not correlate with the direct test, it necessary to perform other investigations.

INTERPRETATION OF REACTION FOR BLOOD TYPING				
DIRECT TEST - REAGENT		REVERSE TEST - SUSPENSION		BLOOD TYPES
Anti -A	Anti -B	A1	B	
+	-	-	+	A
-	+	+	-	B
+	+	-	-	AB
-	-	+	+	O

TEST SPECIFICITY:

The performance of the ***Imuno-HEMATO Anti-B and Anti-B*** was evaluated in 1125 samples collected with the recommended anticoagulants. The evaluation showed 100% specificity for each reagent when compared with the results of a Kit used on the market.

PRECISION OF THE TEST:

a. Intra-Assay Precision

4 samples were selected from quality control (1 for each blood type) to perform the repeatability test. 10 repetitions of the test was done by the same operator on the same day. According to the tests carried out, it was verified that the kit ***Imuno-Hemato Anti-A and Anti-B*** Family repeated satisfactorily the results with the samples tested under the same conditions.

b. Inter-Assay Precision

4 samples were selected from quality control (1 for each blood type) to perform the test of reproducibility; 20 tests were performed with the same samples in different days and with different technicians.

According to the tests carried out, it was verified that the kit ***Imuno-Hemato Anti-A and Anti-B*** Family repeated satisfactorily the results with the samples to be tested even under different conditions.

LIMITATIONS OF USE

- False-positive and negative results can occur due to contamination of the test materials, inadequate concentration of suspensions of cells, inadequate incubation time or temperature, or errors of procedure.
- The centrifugation times mentioned are recommendations. A appropriate centrifugation time must be determined by each laboratory, and will be the one that produces the strongest reaction of the antibody with the antigen in positive reactions, and will also to allow for easy resuspension of RBC buttons.
- Weaker reactions will occur more frequently with stored blood than with fresh blood.
- ABO antigens are not fully developed at birth, therefore, weak reactions can occur when using red blood cells from the umbilical cord or of neonates. Cord Samples contaminated with Wharton's jelly can give false-positive results.
- Blood Samples of subgroups A and B may let to false-negative results or weak reactions.
- It is recommended to you use control with red blood cells with knowingly present antigen A and negative RBCs, daily, before starting the tests to confirm the reactivity and specificity of the reagent.
- Reverse test should always be performed to search for circulating antibodies in individuals older than 6 months of age, in order to confirm that the results of the direct test correlates with the reverse. If they do not correlate, other investigations should be carried out.
- Red blood cells coated with alloantibodies or auto-antibodies with specificity equal or similar to the reagent, which is, cells that are positive in the direct antiglobulin test (Coombs test) can give weak responses. In extreme cases, false-negative results may occur.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The reagents should be kept between 2 - 8°C.
- The expiry date refers to the last day of the month indicated on the labels of the vial and of the kit box.
- Avoid exposing the reagents to high temperatures and direct sunlight.
- Do not freeze the reagent, as this may cause irreversible damage.
- The **Imuno-HEMATO Anti-A and Anti-B** from **WAMA**, though derived from animal source, cannot assume to be free of infectious agents. Therefore, it is recommended to treat all reagents as potentially infectious, as well as having the care in disposing of these materials.
- Allow the reagents to reach the room temperature (20 -25°C) before starting the test.

- The reagents must be capped immediately after use.
- Do not use the reagent after the expiration date.
- The procedures are only for manual testing. When using automatic or semi-automatic instruments, procedure contained in the operator's manual provided by the instrument manufacturer must be followed.
- Discard the material following local regulations.
- Use the Good Laboratory Practices (GLPs) in storage, handling and disposal of materials.

WARRANTY

WAMA Diagnóstica guarantees the exchange of the diagnostic kit, provided it is within the expiration date and is proven by its technical support that there were no technical mistakes in the execution, handling and storage of this product. **WAMA** and its distributors are not liable for failures on the performance of the kits under these conditions.

ESPAÑOL

IMPORTANCIA CLÍNICA

El sistema ABO fue descrito en 1900 por Landsteiner y se mantiene hasta hoy como el sistema más importante en la transfusión de sangre. La transfusión equivocada de ABO puede provocar la muerte del paciente, con una reacción hemolítica intravascular, seguida por cambios bioquímicos e inmunológicos.

La determinación del grupo sanguíneo consiste en la identificación de los antígenos del sistema ABO existentes en los eritrocitos y que están determinados genéticamente por 3 genes, respectivamente, los genes A, B y O.

Hay dos tipos de anticuerpos en el sistema sanguíneo ABO: los de presencia natural y los sistema inmunológico. Los de presencia natural comienzan a aparecer en el suero de tres a seis meses después del nacimiento aproximadamente. Estes son anticorpos anti-A (en el grupo B), anti-B (individuos en el grupo A), anti-A y Anti-B (individuos del grupo O), y ausentes en los individuos del grupo AB. Los anticuerpos naturales representan una mezcla con mayor cantidad de inmunoglobulinas de la clase M (IgM) que las inmunoglobulinas de clase G (IgG). Los del sistema inmunológico se producen por alloimmunization anteriores, que pueden ser a través de heteroimmunization mediante sustancias de origen animal o bacteriana, o por aloimmunización, durante el embarazo o transfusión incompatible ABO. Estos anticuerpos se denominan habitualmente hemolisinas y la mayoría de ellos son IgG.

Determinación del grupo sanguíneo de una persona siempre se debe realizar a través de dos exámenes: la directa y la inversa. En el examen directo, los antisueros se probados contra una suspensión de 5% de glóbulos rojos de la persona, cuyo objetivo es el de identificar los antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos. Los individuos del grupo A tienen los antígenos A en sus eritrocitos, del grupo B antígeno B, del grupo AB tienen los antígenos A y B, y del grupo O no tienen ni los antígenos A ni B en su superficie. En la prueba inversa, el objetivo es identificar los anticuerpos libres en el suero, probando los sueros de los individuos contra una suspensión de 5% de glóbulos rojos conocida, uma de glóbulos rojos del tipo A, Rh negativo, y otra de tipo B, Rh negativo. Personas en el grupo A tendrán anticuerpos anti-B, en el grupo B tendrán anticuerpos anti-A, en el grupo AB no tendrán anticuerpos y e nel grupo O tendrán anticuerpos circulantes anti-A y anti-B.

Los sueros de los recién nacidos aún no contienen los anticuerpos naturales anti-A y anti-B, pudiendo, incluso, presentar anticuerpos anti-A y anti-B maternos y, por tanto, la prueba inversa no se debe realizar en este grupo de edad, porque dará lugar a resultados incorrectos.

El uso pruebas direta y inversa conduce a corregir los resultados y prevenir complicaciones, tales como la presencia de subgrupos A y B que pueden producir reacciones debiles o negativas en prueba directa.

El anti suero ***Imuno-HEMATO Anti-A y Anti-B*** de **WAMA** son anticuerpos monoclonales del tipo IgM, preparados a partir del sobrenadante de cultivo in vitro de la línea celular hibridadas inmunoglobulinas secretoras de ratón. El anti suero ofrece especificidad (antigenicidad), potencia (título) y avidez (rapidez para establecer la aglutinación) iguales o superiores a los valores internacionales de referencia, asegurando la óptima calidad en la identificación de los antígenos A y B en pruebas de tipificación de sangre.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El procedimiento del ensayo se basa en el principio de aglutinación, donde las células rojas de los individuos que poseen antígeno A y/o B en su superficie aglutinarán en presencia del antisuero anti-A y/o anti-B, que indica un resultado positivo. La prueba se considera negativa cuando no aparece ninguna aglutinación.

PRESENTACIÓN DEL KIT

Imuno-Hemato Anti-A

[REF] 1054010-A – 10ml (anti-A)

- Antisuero Anti-A (1 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

[REF] 1054050-A – 50ml (anti-A)

- Antisuero Anti-A (5 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

[REF] 1054100-A – 100ml (anti-A)

- Antisuero Anti-A (10 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

Imuno-Hemato Anti-B

[REF] 1054010-B - 10ml (Anti-B)

- Antisuero Anti-B (1 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

[REF] 1054050-B - 50ml (Anti-B)

- Antisuero Anti-B (5 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

[REF] 1054100-B - 100ml (Anti-B)

- Antisuero Anti-B (10 x 10 ml)
- Instrucciones de uso

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE REACTIVOS

• **ANTISUERO ANTI-A:** Listo para usar. Contiene anticuerpos monoclonales IgM, antígeno anti-A del Sistema ABO. Reactivo con colorante azul. Estable a 2 - 8 °C hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase. Almacenamiento inadecuado afecta la eficacia del reactivo. Contiene NaN3 < 0,095% como conservante. NO CONGELAR. Para uso diagnóstico in vitro.

• **ANTISUERO ANTI-B:** Listo para usar. Contiene anticuerpos monoclonales IgM, antígeno anti-B del Sistema ABO. Reactivo con colorante amarillo. Estable a 2 - 8 °C hasta que fecha de vencimiento impresa en el envase. Almacenamiento inadecuado afecta a la eficacia del reactivo. Contiene NaN3 < 0,095% como conservante. NO CONGELAR. Para uso diagnóstico in vitro.

Nota: El kit mantiene el mismo rendimiento después de la primera utilización, y es estable hasta la fecha de vencimiento descrita en la etiqueta, siempre que se mantenga a la temperatura indicada (2 - 8°C).

ESPECÍMENES

Utilice muestra de sangre fresca. Evite muestras hemolizadas.

Si no es posible realizar las pruebas después de la recolección, la muestra debe mantenerse refrigerada a una temperatura de 2 - 8 °C. De acuerdo con el anticoagulante usado, las muestras deben ser probadas en los siguientes plazos:

- Heparina y Oxalato de Sodio : 2 Días
- EDTA y Citrato de Sodio : 14 Días
- ACD y CPD : 28 Días

El almacenamiento a largo plazo de la muestra puede provocar el deterioro de los antígenos y ocasionar a resultado de clasificación incorrecta.

MATERIAL NECESARIO, PERO NO SUMINISTRADO

- Técnica de lámina de vidrio: laminas vidrio, pipetas 50µl y puntas o pipeta Pasteur, varilla de mezcla.
- Técnica de Tubo de ensayo: tubos de ensayo (10 x 75 mm o 12 x 75 mm), micropipeta 50 µl y puntas, centrifuga, solución salina isotónica 0,85 o 0.9 %.
- Recipiente para descarte de material.

PROCEDIMIENTO

Independientemente de la técnica empleada, deje que el reactivo y la muestra alcancen la temperatura ambiente antes de comenzar las pruebas.

I.TÉCNICA DE LÁMINA DE VIDRIO

- En una lámina de vidrio, gotear 1 gota (50 µl) de antisuero anti-A o anti-B (1) y 1 gota (50 µl) de sangre entera a ser probada.
- Mezclar uniformemente el reactivo y células sanguíneas usando una varilla de mezcla, en un área de aproximadamente 2.5 cm de diámetro.
- Con suaves movimientos de rotación e inclinacion de la lámina de vidrio para verificar la formación de aglutinación dentro de 1 minuto (len la presencia de un antígeno, la reacción comienza en segundos). Reacción inespecífica puede presentarse debido al secado de la mezcla de reacción o si la lámina se calienta.

II. TÉCNICA DE TUBOS

- Preparar una suspensión en 5% de eritrocitos lavados para ser sometidas a ensayo en solución salina fisiológica (lavar las células 3 veces en solución salina 0,85 % o 0.9 %), pipetear 50 µl de eritrocitos lavados + 1 ml de solución salina en un tubo de ensayo 12 x 75 mm. Otros volúmenes pueden ser utilizados).
- En un tubo de ensayo etiquetado de 10 x 75 mm o 12 x 75 mm , pipetas 50 µl de suspensión de eritrocitos a 5%.
- Pipeta en el mismo tubo 50 µl del antisuero anti-A o anti-B.
- Homogeneizar por agitación suave e incubar a temperatura ambiente (15 - 30°C) por 1 a 15 minutos.
- Centrifugar a 1,000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.

6. Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación.

III. TÉCNICA DE MICROPLACAS.

- Preparar una suspensión de 2-3% de eritrocitos lavados para ser sometidos a ensayo en solución salina fisiológica (lavar las células 3 veces en solución salina 0,85 % o 0.9 %), en un tubo de 12 x 75 mm., pipetear 25 µl de eritrocitos lavados + 1 ml de solución salina - otros volumen pueden ser usados.
- En microplaca con fondo U, pipetear 50 µl de la suspensión de 2,5% en cada cavidad de la microplaca, según el número de muestras que deberán ser probadas y el plan de distribución en la placa.
- Pipetear en cada cavidad 50 µl del antisuero anti-A o anti-B (1).
- Mezclar por agitación suave, preferiblemente con un agitador de microplacas, y incubar a temperatura ambiente (15 - 30 ° C) por 15 minutos.
- Centrifugar la microplaca 140 r.c.f. por 1 minuto.
- Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación.

IMPORTANTE:

→ Aunque la técnica en lámina de vidrio sea utilizada por muchos laboratorios, se sugiere utilizar la técnica de tubo o microplacas, con pruebas directa e inversa, tal procedimiento evita algunos errores de interpretación cuando sólo la búsqueda de antígeno es utilizada.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

REACCIÓN POSITIVA: Aglutinación de los eritrocitos, lo que indica la presencia de antígeno A o B or ambos en la muestra ensayada.

REACCIÓN NEGATIVA: Ausencia de aglutinación de los eritrocitos, lo que indica ausencia de antígeno A y/o B en la muestra ensayada.

REACCIÓN DISCREPANTES: Si los resultados obtenidos en la prueba inversa no se correlacionan con la prueba directa, es necesario realizar otras investigaciones.

INTERPRETACIÓN DE LA REACCIÓN PARA TIPAGEN SANGUINEO				
PRUEBA DIRECTA - REACTIVO		PRUEBA INVERSA - SUSPENSIÓN		TIPOS DE SANGRE
Anti -A	Anti -B	A1	B	
+	-	-	+	A
-	+	+	-	B
+	+	-	-	AB
-	-	+	+	O

ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA:

El rendimiento de ***Imuno-HEMATO Anti-A e Anti-B*** fue evaluada en 1125 muestras obtenidas con los anticoagulantes recomendados. La evaluación demuestra una especificidad del 100% de cada uno de los reactivos en comparación con los resultados de un Kit en el mercado.

PRECISIÓN DEL TEST:

a. Precisión Intraensayo

Se seleccionaron 4 muestras de control de calidad (1 para cada tipo de sangre) para realizar la prueba de repetibilidad. 10 repeticiones del test fueran corridas por el mismo técnico en mismo día.

De acuerdo a las pruebas realizadas, se verificó que el kit ***Imuno-Hemato Anti-A e Anti-B***, repitió satisfactoriamente los resultados con las muestras analizadas en las mismas condiciones.

b. Precisión Interensayo

Se seleccionam 4 muestras de control de calidad (1 para cada tipo de sangre) para realizar la prueba de reproducibilidad; 20 pruebas se han llevado a cabo con las mismas muestras en días y técnicos diferentes.

De acuerdo a las pruebas realizadas, se verificó que el kit ***Imuno-Hemato Anti-A e Anti-B***, repitió satisfactoriamente los resultados con las muestras de ensayo, incluso bajo diferentes condiciones.

LIMITACIONES DE USO

- Resultados falso positivos y negativos pueden ocurrir debido a la contaminación de los materiales de ensayo, concentración inadecuada de las suspensiones de células, tiempo de incubación y temperatura inadecuados, o errores de procedimiento.
- Los tiempos de centrifugación mencionados son recomendaciones. Un tiempo de centrifugación apropiado debe ser determinado por cada laboratorio, y será aquel quel produce la reacción más fuerte del anticuerpo con el antígeno en las reacciones positivas, y también para permitir una fácil resuspensión de botones de RBC.
- Reacciones más débiles serán más frecuentes con sangre almacenada que con sangre fresca.
- Los antígenos ABO no están totalmente desarrollados al nacer, por lo tanto, pueden ocurrir reacciones débiles cuando se utilizan glóbulos rojos de la sangre del cordón umbilical o de neonatos. Muestras de cordón contaminadas con gelatina de Wharton puede dar resultados falsos positivos.
- Las muestras de sangre de subgrupos A y B pueden dejar a resultados falsos negativos o reacciones débiles.
- Se recomienda que utilice control con glóbulos rojos sanguíneos, con presencia conocida de antígeno A y RBC negativo, diariamente, antes de confirmar la reactividad y especificidad de los reactivos.
- Prueba inversa deberá realizarse siempre para la búsqueda de anticuerpos

circulantes en personas mayores de 6 meses de edad, con el fin de confirmar que los resultados de la prueba directa se correlaciona con la prueba inversa. Si no se correlacionan, otras investigaciones deben llevarse a cabo.

• Los glóbulos rojos recubiertos con alo anticuerpos o auto-anticuerpos, con especificaciones igual o similar ao reactivo, lo que es, células que son positivas en la prueba de antiglobulina directa (prueba de Coombs) pueden dar respuestas débiles. En casos extremos, pueden producir resultados falso-negativos.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Los reactivos deben conservarse entre 2 – 8°C.
- La fecha de caducidad se refiere al último día del mes indicado en las etiquetas del frasco y de la caja del kit.
- Evite la exposición de los reactivos a altas temperaturas y la luz solar directa.
- No congele el reactivo, ya que esto puede causar daños irreversibles.
- El ***Imuno-HEMATO Anti-A e Anti-B*** de **WAMA**, aunque derivados de origen animal, no puede dar por sentado que sea libre de agentes infecciosos. Por lo tanto, se recomienda tratar todos los reactivos como material potencialmente infeccioso, así como tener cuidado al deshacerse a su cargo el cuidado de deshacerse de estos materiales.
- Dejar que los reactivos adquieran la temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de iniciar los tests.
- Los reactivos deben taparse inmediatamente después de su uso.
- No utilice el reactivo después de la fecha de caducidad.
- Los procedimientos son sólo para prueba manual. Al usar instrumentos automáticos o semiautomáticos, procedimiento que figura en el manual del operador proporcionado por el fabricante del instrumento debe ser seguido.
- Desechar el material siguiendo regulaciones locales.
- Utilice las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en el almacenamiento, la manipulación y eliminación de los materiales.

TÉRMINO DE GARANTÍA

WAMA Diagnóstica garantiza el cambio del kit de diagnóstico, siempre que esté dentro de la fecha de caducidad y que ha sido probado por su apoyo técnico que no hubo errores técnicos en la ejecución, la manipulación y el almacenamiento de este producto. **WAMA** y sus distribuidores no se responsabiliza por fallas en el rendimiento de los kits en estas condiciones.

BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFÍA:

- Levine, P.: The discovery of Rh haemolytic disease. Vox Sanguinis 47: 187-190, 1984.
- Jones, J., Scott, M.M. and Voak, D.: Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. Transfusion Medicine, 5: 171-184, 1995.
- Avent, N.D. and Reid, M.E.: The Rh blood group system: a review. Blood, 95: 375-387, 2000.
- Zallen, D. T., Christie, D. A. and Tansey, E. M.: The Rhesus Factor and Disease Prevention. Witness Seminar held by the Wellcome Trust Centre for the History of Medicine at UCL, London, June, 2003.
- Scott, M. L.: The complexities of the Rh system. Vox Sanguinis, 87: 58-62, 2004.
- Westhoff, C. M.: The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. Transfusion, 44: 1663-1673, 2004.
- Moulds, M.K.: Review: monoclonal reagents and detection of unusual or rare phenotypes or antibodies. Immunohematology, 22 (2): 52-63, 2006.
- Van Kim, C., Colin, Y. and Cartron, J.: Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. Blood Reviews, 20: 93-110, 2006.
- Westhoff, C.M.: The structure and function of the Rh antigen complex. Seminars in Hematology, 44: 42-50, 2007.

SIMBOLOGIA / SIMBOLS / SIMBOLOGIA

	O conteúdo é suficiente para (n) testes Quantity sufficient for (n) tests O contenido es suficiente para (n) testes		Número do lote Lot Number Número del lote
	Data limite de utilização Expiry Date Fecha de la caducidad		Número do catálogo Catalog Number Número del catálogo
	Produto diagnóstico <i>in vitro</i> In vitro diagnostic Produto diagnóstico <i>in vitro</i>		Limite de temperatura Temperature Limite de temperatura
	Consultar instruções para uso Refer to user's instructions Consultar las instrucciones para el uso		Proteger do calor Keep away from sunlight Proteger del calor
	Representante Europeu European Representative Representante Europeu		Fabricado por Manufactured by Fabricado por