



Anti-D (Rho)

monoclonal

IgG/IgM

Reactivo para la detección de antígeno D (Rho)

SIGNIFICACION CLINICA

Las observaciones de Levine y Stetson en 1939 y de Landsteiner y Wiener en 1940 establecieron las bases para el conocimiento actual de la importancia clínica en la detección de los anticuerpos anti-D.

Aproximadamente el 15% de los individuos de raza blanca y el 8% de los individuos de raza negra carecen del antígeno D y son fácilmente estimulados cuando reciben este antígeno, ya sea por transfusión o durante el parto, produciendo anti-D. Algunos individuos presentan una disminución cuantitativa en la expresión de su antígeno D, llamados D débiles (antigua-mente D^v). Otros, en cambio, presentan una variación cualitativa en la expresión de dicho antígeno, denominados como D parcial. Dentro de este grupo se encuentra la categoría D^{vi}, caracterizada por poseer una mínima cantidad de epítopes.

El antígeno D es altamente inmunogénico siendo responsable de severas reacciones post-transfusionales y de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Existen más de 40 antígenos diferentes identificados dentro del sistema Rh. Sin embargo, es el antígeno D el que posee mayor importancia en la clínica después del sistema ABO.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Los glóbulos rojos del paciente se ponen en contacto con suero anti-D (anti-Rho). Si existe en la superficie del eritrocito el antígeno correspondiente, se producirá una aglutinación visible macroscópicamente.

El componente IgM anti-D del reactivo produce aglutinación directa de los glóbulos rojos portadores del antígeno D normal. En la mayoría de los casos los D débiles no se aglutinan directamente con este reactivo.

El componente IgG anti-D del reactivo puede detectar las variantes débiles (detecta D^{vi}) mediante la prueba indirecta con anti-globulina.

REACTIVO PROVISTO

Anti-D (Rho): mezcla de anticuerpos monoclonales humanizados IgM/IgG (Blend) perteneciente a los clones TH-28 (secretor de IgM) y MS-26 (secretor de IgG), en una solución tamponada conteniendo 1 g/l de azida sódica como conservante.

REACTIVOS NO PROVISTOS

De acuerdo a la técnica empleada puede requerirse adicionalmente:

- Solución fisiológica.
- **Suero Anti-humano (poliespecífico)** de Wiener lab.
- Buffer PBS pH 7,0 ± 0,2.
- Solución salina de baja fuerza iónica (LISS).

INSTRUCCIONES PARA SU USO

El reactivo se provee listo para usar. No debe diluirse.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El Reactivo Provisto es estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar. Periodos prolongados de almacenamiento a temperaturas fuera de este rango pueden acelerar la pérdida de la actividad del reactivo.

Evitar los cambios térmicos repetidos y limitar a lo estrictamente necesario la exposición a temperatura ambiente del reactivo.

En estas condiciones de uso y conservación, el reactivo, después de su apertura, es estable hasta la fecha de expiración indicada en la caja.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Desechar el reactivo cuando se observe contaminación del mismo. Si bien la azida de sodio se adiciona como bacteriostático, se recomienda inspeccionar el reactivo visualmente antes de usarlo. No debe utilizarse si presenta turbidez. El reactivo no debe utilizarse si presenta precipitados o partículas.

MUESTRA

Glóbulos rojos o sangre entera

a) Recolección: obtener la sangre en forma aséptica con o sin anticoagulante. Puede analizarse sangre obtenida por punción digital para la técnica en placa. Para evitar la coagulación de la sangre al utilizar esta técnica, se la debe mezclar rápidamente con el reactivo.

b) Aditivos: pueden emplearse como anticoagulantes: heparina, EDTA, ACD (ácido cítrico, citrato, dextrosa), CPD (citrato, fosfato, dextrosa) o CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrosa, adenina). Puede utilizarse Anticoagulante W de Wiener lab.

c) Sustancias interferentes conocidas:

- Los glóbulos rojos recubiertos con inmunoglobulinas o fracciones del complemento pueden dar reacciones falsamente positivas. Cuando se sospecha esta situación deberá realizarse una Prueba de Antiglobulina Directa.
- La hemólisis marcada interfiere.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: las muestras deberán ser analizadas lo antes posible, evitando de esta manera falsos positivos o negativos derivados de la conservación incorrecta o de contaminación bacteriana. Si el análisis no se puede realizar en el momento, las muestras se deben conservar refrigeradas (2-10°C). Si se utilizó EDTA

o heparina para su obtención, la tipificación debe llevarse a cabo dentro de las 48 horas. Las muestras obtenidas con ACD, CPD o CPDA-1, pueden ser ensayadas hasta los 35 días de extraída. Si se emplean coágulos, deberá efectuarse la tipificación dentro de los 7 días de obtenida la muestra. Si los glóbulos rojos son almacenados por períodos prolongados pueden observarse reacciones débiles. Para los ensayos con sangre de cordón, los glóbulos rojos deben lavarse previamente con solución fisiológica.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

Dependiendo de la técnica a utilizar, podrán ser necesarios:

- Centrífuga
- Tubos de hemólisis
- Placa de vidrio
- Palillos mezcladores descartables

PRECAUCIONES

Este reactivo es para uso "in vitro" y está estrictamente reservado para uso profesional por personal calificado con comprobada competencia en inmunohematología.

No utilizar el reactivo fuera de la fecha de vencimiento.

La azida sódica es tóxica. R22: nocivo por ingestión.

La azida puede reaccionar con las cañerías de plomo o cobre generando compuestos explosivos. Al eliminar el reactivo, se debe dejar correr grandes cantidades de agua.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

El reactivo y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

PROCEDIMIENTO

Este reactivo ha sido estandarizado según los procedimientos detallados a continuación; su desempeño en el uso mediante otras técnicas no puede ser garantizado.

I- TECNICA EN PLACA

Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 40-50% en plasma/suero autólogos, PBS pH $7,0 \pm 0,2$ o solución fisiológica. También puede emplearse sangre entera.

1) Colocar una gota de Anti-D (Rho) sobre una placa de vidrio limpia y rotulada.

2) Agregar al lado una gota de la suspensión de glóbulos rojos a probar. Debe mantenerse la relación antisuero:células en todos los ensayos.

3) Mezclar el antisuero y los glóbulos rojos con un palillo descartable en un área de 2 cm de diámetro y balancear constantemente la placa durante 2 minutos.

Observar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa.

Si el período de observación es mayor a 2 minutos, efectos de la evaporación del reactivo pueden conducir a resultados equivocados (débilmente positivos).

Algunas muestras D débiles o D parcial pueden no aglutinar cuando se utiliza la técnica en placa. Ante resultados indeterminados o negativos deben confirmar-

se utilizando la técnica en tubo.

Las técnicas en placa no están aconsejadas para la detección de muestras D débil o D parcial.

II- TECNICA EN TUBO

Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 3-5% en plasma o suero autólogos, PBS pH $7,0 \pm 0,2$, LISS 1,5-2% o en solución fisiológica.

1) Colocar una gota de Anti-D (Rho) en un tubo de hemólisis rotulado.

2) Agregar una gota de la suspensión de glóbulos rojos a probar.

3) Mezclar y centrifugar 20 segundos a 1.000 g.

4) Agitar el tubo para despegar las células y examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa.

Las reacciones aparentemente negativas deben incubarse a 37°C durante 15-30 minutos, luego centrifugar y volver a leer como se describió en 4). Las muestras que aún en estas condiciones resulten negativas deben ser investigadas respecto al antígeno D débil.

Efectuando la técnica en tubo, en caso de resultado indeterminado o negativo, se puede continuar con el paso 4 de la prueba antiglobulina indirecta para D débil.

III- PRUEBA ANTIGLOBULINA INDIRECTA PARA D DEBIL

Preparar una suspensión al 3-5% de glóbulos rojos en plasma o suero autólogos, o solución fisiológica.

1) Colocar una gota de Anti-D (Rho) en un tubo de hemólisis rotulado.

2) Agregar una gota de la suspensión de glóbulos rojos.

3) Mezclar e incubar a 37°C durante 15-30 minutos.

4) Lavar las células 3-4 veces con solución fisiológica o PBS pH $7,0 \pm 0,2$ descartando perfectamente la solución salina residual o sobrenadante y resuspender las células luego de cada lavado.

5) Agregar 2 gotas de **Suero Anti-humano (polispecífico)**, mezclar y centrifugar 20 segundos a 1000 g.

6) Agitar ligeramente el tubo para despegar las células y examinar macroscópicamente presencia o ausencia de aglutinación. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa.

Nota: las muestras que dan positivo el test de Coombs directo no pueden ser analizadas por la prueba antiglobulina indirecta.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La observación de aglutinación (con cualquiera de las técnicas empleadas) indica presencia del antígeno D; la reacción es positiva y el individuo será clasificado como Rh positivo.

La aglutinación de los glóbulos rojos en estudio con el reactivo anti-D por la prueba antiglobulina indirecta para D débil, indica que los glóbulos pertenecen a la variedad D débil (siempre que los glóbulos rojos resulten Coombs directo negativo). La no aglutinación con el reactivo Anti-D en la prueba antiglobulina indirecta para D débil indica ausencia del corres-

pondiente antigénico; la reacción es negativa y el individuo será clasificado como Rh negativo.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de los reactivos es esencial y debe realizarse al comienzo de cada jornada de trabajo, con cada serie de determinaciones de grupo Rh y con pruebas individuales. Como mínimo deberían emplearse: glóbulos rojos R1r como control positivo y glóbulos rojos rr como control negativo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA. La determinación no puede efectuarse sobre glóbulos rojos que dan lugar a test de Coombs directo positivo. Pueden obtenerse resultados más rápidos y mejor visualización precalentando la placa a 45-50°C. Los resultados anormales pueden ser consecuencia de:

- Contaminación bacteriana o química de las muestras, de los reactivos o del material.
- Medicación o patología del paciente que provoque reacción cruzada.
- Preparación de los glóbulos rojos diferente a la recomendada.
- Agitación insuficiente que provoque una resuspensión incompleta de los glóbulos rojos.
- Agitación demasiado fuerte que disgregue los aglutinados.
- Demoras en la lectura.

PRESENTACION

- 1 x 10 ml (Cód. 1443155).

BIBLIOGRAFIA

- Levine P., Stetson R.E. - "An unusual case of intragroup agglutination" - J. Amer. Med. Assoc. 113:126-127, 1939.
- White WD, Issitt CH, McGuire D. - "Evaluation of the use of albumin controls in Rh phenotyping" - Transfusion 14:67-71; 1974.
- Race, R.R. and Sanger, R. - "Blood Groups in Man" - 6th ed. Oxford Blackwell Scientific Publications, pág. 178, 1975.
- Moore B.P.L. - Serological and immunological methods of the Canadian Red Cross Blood Transfusion Service, 8th ed. Toronto, Hunter Rose 1980.
- Garraty G. et al. - "Spontaneous agglutination of red cells with a positive direct antiglobulin test in various media" - Transfusion 24:214-217, 1984.
- Issitt P.D. Applied Blood Group Serology 3rd ed., Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, Chapter 10, 1985.
- Guidelines for compatibility testing in hospital blood banks. Cli. Lab. Haem. 9:333-341, 1987.
- Tippett P. - "Sub-Divisions of the Rh (D) antigen" - Med. Lab. Sci. 45:88-93, 1988.
- Widmann F.K. ed Technical Manual 10th ed. Washington DC, American Association of Blood Banks, Chapter 11, 1990.
- Walker RH., ed. Technical Manual, 11th ed. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, Chapter 11, 1993.
- Jones J., Scott ML., 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.
- Vengelen V., ed. Technical manual. 13th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1999.

SIMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución



Contenido



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar instrucciones de uso



Calibrador



Control



Control Positivo



Control Negativo



Número de catálogo

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Disp. N°: 1074/89



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina

870080000 / 00 Pág. 3 de 6