

Anti-D (IgG + IgM)

RUO

| PRESENTACION | | | |
|---|---------|------------------|-------|
| REF | 3440010 | Anti-D (IgG+IgM) | 10 mL |
| Sólo para uso diagnóstico <i>in vitro</i> | | | |

Rh

Anti-D (IgG+IgM) monoclonal

Determinación cualitativa del antígeno D en sangre humana.

PRUEBAS EN PORTA Y TUBO

FUNDAMENTO

La determinación de grupos sanguíneos del sistema Rh se efectúa enfrentando los hematíes problema con anticuerpos anti-D de especificidad conocida.

El reactivo origina una aglutinación directa con hematíes que poseen el antígeno D, una alta proporción de D^u y una aglutinación indirecta con los hematíes de Categoría D^{vi} en el ensayo correspondiente a la prueba de la antiglobulina humana (AGH).

La aglutinación de los hematíes ensayados es indicativa de la presencia del antígeno correspondiente. La no-aglutinación es indicativa por lo general de la ausencia del antígeno D.

| Anti D | Fenotipo | Caucasianos % | Afro-Americanos % |
|--------|---------------|---------------|-------------------|
| + | Rh D positivo | 85 | 72 |
| 0 | Rh D negativo | 15 | 28 |

El antígeno D, es el más clínicamente significativo, después del ABO, ya que puede provocar reacciones hemolíticas transfusionales y enfermedad hemolítica del recién nacido.

COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

El reactivo de grupaje anti-D de Linear Chemicals es una mezcla de anticuerpos IgG e IgM anti-D monoclonales humanos bajo en proteínas:

ANTI-D
(IgG+IgM)

Línea celular IgG MS-26, IgM RUM-1.
Tampón fosfatos que incluye:
Cloruro sódico 0,9 g %, Albúmina bovina 3 g %, Azida sódica <0,1% y potenciadores macromoleculares.

El reactivo aglutina directamente hematíes Rh D positivos, incluyendo la mayoría de sus variantes (excepto D^{vi}) y una alta proporción de fenotipos D débiles (D^u).

Precauciones: Los diferentes componentes de origen humano han sido ensayados y hallados exentos de virus HIV 1+2 y anti-HCV, así como HBsAg. Aun así se aconseja manipular los reactivos y las muestras con las precauciones debidas.

Usar guantes y ropa protectora.

Aviso: Los reactivos contienen azida sódica. Evitar el contacto con la piel y mucosas.

EXPRESIONES DEBILES DEL ANTIGENO RhD

El término D^u es usado comúnmente para describir aquellos hematíes que tienen una expresión del antígeno D mas débil de lo normal.

D débil indica individuos con un reducido número de antígenos D por hematíe.

D parcial denota a los individuos que han perdido epítomos del antígeno D.

D^{iv} categoría de D que ha perdido la mayoría de epítomos D.

El anti-D de Linear Chemicals aglutina directamente con la mayoría de D parciales o débiles, pero no detecta los hematíes D^{vi} que son detectados mediante la prueba de AGH.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Los reactivos están listos para su uso.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Todos estos reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen bien cerrados a 2-8°C y se evita la contaminación durante su uso. No usar los reactivos una vez caducados.
2. No congelar o exponer el reactivo a altas temperaturas. La conservación del producto a temperatura distinta de la recomendada acelera la pérdida de reactividad de producto.
3. Estos reactivos deben ser claros y transparentes. La presencia de turbidez puede indicar contaminación microbiana.
4. Descartar el contenido del vial, en caso de turbidez, rotura o pérdida de contenido.

MUESTRAS

Si la prueba se efectúa de inmediato, puede utilizarse sangre total anticoagulada o sangre coagulada en su propio suero.

Muestras recogidas en EDTA o Heparina deberán ensayarse antes de 48 horas.

Muestras recogidas en ACD, CPD, CPDA-1 mantienen su reactividad durante 35 días.

Las muestras con signos evidente de hemólisis pueden dar resultados poco fiables. Guardar las muestras a 2-8°C.

EQUIPO ADICIONAL

- Tubos de vidrio (10x75 mm o 12x75 mm).
- Pipetas Pasteur.
- Centrifuga Sero-fuge o similar.
- Portas de vidrio.
- Palillos desechables.

REACTIVOS ADICIONALES

- Solución Salina Tamponada (PBS): 8,5-9,0 g/L NaCl (0,145 mol/L-0,154 mol/L) pH 7,0 ± 0,2 a 22 ± 1°C.
- Hematíes control: Positivos (preferentemente R_{1r}) y negativos (preferentemente rr).

TECNICA

I. Prueba en placa

1. Depositar 1 gota (aprox. 40 µL) de hematíes problema resuspendidos, con un hematocrito aproximado del 35-45%, sobre una placa.
2. Añadir 1 gota (aprox. 40 µL) del reactivo cerca de la muestra de hematíes.
3. Mezclar bien la sangre con el reactivo, con un palillo desechable, formando un círculo de unos 2 cm de diámetro.
4. Mover la placa lentamente con movimientos basculantes durante 2 minutos.
5. **Lectura**
Examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación:



Reacción negativa:

No se observa aglutinación a los 2 minutos.

Reacción positiva:

Los hematíes aglutinan en segundos. No confundir la fibrina con aglutinación.

En casos dudosos se recomienda repetir la prueba en tubo.

II Prueba en tubo (No aplicable a D^{VI})

1. Preparar una suspensión al 2-3% de hematíes problema en PBS, lavados 2 veces con PBS.
2. Depositar 1 gota del reactivo (aprox. 40 µL) en un tubo apropiado.
3. Añadir 1 gota (aprox. 40 µL) de suspensión de hematíes.
4. Mezclar y centrifugar a 1000 f.c.r. durante 20 segundos o por una fuerza y tiempo equivalentes.

5. Lectura

Golpear suavemente el tubo para desprender el sedimento y examinar la presencia o ausencia de aglutinación.

Reacción negativa:

La resuspensión de los hematíes es homogénea.

Reacción positiva:

Los hematíes positivos permanecen aglutinados una vez resuspendidos.

Cualquier tubo que presente un resultado negativo o dudoso incubar 15 minutos a temperatura ambiente repetir los pasos 4 y 5.

III Prueba en tubo (Aplicable a D^{VI})**Antiglobulina Indirecta (Prueba D^{VI})**

1. Proceder como en los pasos 1, 2 y 3 Prueba en tubo II.
2. Mezclar e incubar 15 minutos a 37°C.
3. Lavar los hematíes 4 veces con abundante PBS, decantar el sobrenadante totalmente y resuspender los hematíes después de cada lavado. Decantar por completo tras el último lavado.
4. Añadir 1 gota de Suero Antiglobulina Humana, resuspender los hematíes por completo.
5. Mezclar y centrifugar a 3400 r.p.m. o 1000 g, 30 seg.
6. **Lectura**

Ver Prueba en tubo II.

La prueba de la Antiglobulina Indirecta solo puede considerarse válida si todo resultado negativo reacciona positivamente con hematíes sensibilizados con anti IgG.

Interpretación

1. **Reacción positiva:** La aglutinación de los hematíes problema es indicativa de un resultado positivo, teniendo en cuenta las limitaciones del procedimiento, y confirma la presencia del antígeno D en los hematíes.
2. **Reacción negativa:** La ausencia de aglutinación de los hematíes problema es indicativa de un resultado negativo, teniendo en cuenta las limitaciones del procedimiento, y confirma la ausencia del antígeno D en los hematíes.
3. Una aglutinación con el control negativo no deberá interpretarse como un resultado positivo, ya que la aglutinación podría deberse a los potenciadores macromoleculares sobre los hematíes sensibilizados.

CONTROL DE CALIDAD Y NOTAS

- Se recomienda comprobar la funcionalidad de los reactivos, en cada lote, incluyendo controles positivos (preferentemente hematíes R₁r) y negativos (hematíes rr). Si se observan discrepancias con los resultados esperados el resultado debe considerarse invalidado.
- Cuando se ensayen hematíes de paciente es importante incluir un control negativo, ya que los potenciadores macromoleculares del reactivo pueden causar resultados falsamente positivos con hematíes sensibilizados con IgG.

- Leer los tubos inmediatamente después de su centrifugación.
- Complete el lavado de los hematíes sin interrupción, centrifugue y lea los resultados inmediatamente después de la adición del Coombs, retrasos en la lectura pueden provocar disociación del complejo antígeno-anticuerpo, dando falsos resultados negativos o reacciones débiles.
- Las pruebas en porta deben leerse en los dos minutos siguientes de la mezcla para asegurarnos su especificidad y evitar que el secado de la mezcla se interprete incorrectamente como resultado positivo.
- Se debe tener cuidado en la lectura de los resultados a temperaturas diferentes a las recomendadas.
- La validación del reactivo con otras técnicas deberá determinarlas el usuario.
- El uso e interpretación de los resultados debe llevarse a cabo por personal formado y cualificado, de acuerdo con la normativa de cada país.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

- Los reactivos han sido ensayados, según lo especificado en el apartado de TÉCNICA.
- Antes de aprobar cada lote Linear Chemicals prueba el reactivo frente a un panel de hematíes que contiene hematíes negativos y positivos para el antígeno D.
- El título de los reactivos se ha determinado frente a: Minimum potency reference standards de National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC):
 - Anti-D reference standard 91/592

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El anti-D IgG+IgM no puede ser usado con hematíes tratados con enzimas o resuspendidos en LISS.
- La sangre almacenada puede dar resultados más débiles que la sangre fresca.
- Falsos resultados pueden ser debidos a:
 - Contaminación del material usado.
 - Tiempo o temperatura de incubación inadecuados.
 - Inadecuada o excesiva centrifugación.
 - Inadecuada conservación u omisión de los reactivos.
- No seguir la técnica recomendada.

REFERENCIAS

1. Kholer, G. y Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256 : 495-497 (1975).
2. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man 6th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers Chapter 2 (1975).
3. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, Chapter 10 (1985).
4. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, Chapter 7 (1987).
5. Tippett P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. Medical. Laboratory Science; 45: 88-93 (1988).
6. Thompson KM, Hughes-Jones NC. Production and characteristics of monoclonal anti-Rh. Bailliere's Clinical Haematology; (1990).
7. 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).
8. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
9. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 5: 145-150 (1995).

G3440-2/0407
R1.cas

