

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTÍGENO D EN HEMATÍES HUMANOS IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El reactivo provoca la aglutinación directa de los hematíes que contengan el antígeno D y la aglutinación indirecta de los hematíes de la Categoría D^{VI} en la fase antiglobulina del test. La ausencia de aglutinación generalmente es indicativo de la inexistencia del antígeno D (ver Limitaciones).

SIGNIFICADO CLÍNICO

En 1940 Levine y Stetson descubrieron el sistema Rh del grupo sanguíneo. El antígeno D es el más significante clínicamente de los antígenos de hematíes que no son del sistema ABO. Los correspondientes anticuerpos han estado implicados en Reacciones transfusionales, así como en el Síndrome hemolítico del Recién Nacido.

Anti-D	Fenotipo	Caucasianos %	Caucasianos %
+	Rh D +vo	85	72
o	Rh D -vo	15	28

Expresión debilitada del antígeno RhD

El término colectivo D⁺ es ampliamente utilizado para describir los hematíes que presentan una expresión del antígeno D inferior a la normal. El término D débil denota individuos con un número reducido de antígenos D completos por célula. El término D parcial denota individuos con epitopos del antígeno D ausentes. DVI (D^{VI}) es una categoría de antígeno D parcial en la que la mayoría de epitopos D están ausentes. El reactivo detectará la mayoría de ejemplos de hematíes D débil y D parcial por aglutinación directa, pero no células DVI. El reactivo detectará DVI y células D parcial en la fase IAT.

REACTIVOS

Anti-D de Reactiva Search es un reactivo escasamente proteico combinado que contiene anticuerpos humanos monoclonales IgM e IgG diluidos en un tampón fosfato con cloruro sódico (0.9 g%), albúmina bovina (3 g%) y potenciadores macromoleculares. Durante el estudio de las muestras de pacientes, aplicando las técnicas aquí recomendadas, el reactivo aglutinará directamente células RhD positivas (pero no D^{VI}) y una elevada proporción de fenotipos D débiles (D⁺). El reactivo es suministrado en la dilución óptima para su utilización en todas las técnicas aquí recomendadas sin necesidad de diluciones o adiciones suplementarias. Ver el lote y caducidad de cada referencia en la etiqueta del vial.

IgM / IgG	Clon / Línea celular
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

PRECAUCIONES

- Los reactivos son sólo para uso en diagnóstico in vitro.
- Si el vial del reactivo está roto o agrietado, descartar inmediatamente su contenido.
- No utilizar reactivos caducados (ver la etiqueta de vial).
- No utilizar reactivos que presenten precipitados.
- La manipulación del reactivo debe realizarse con la apropiada indumentaria de protección, tales como guantes desechables y bata de laboratorio.
- Los reactivos han sido filtrados a través de cápsulas de 0.2 µm para reducir la carga biológica. Una vez abierto el vial, el contenido debe permanecer viable hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando no haya una marcada turbidez la cual podría ser indicativa de deterioración o contaminación del reactivo.
- Los reactivos contienen < 0.1% de azida sódica. La azida sódica puede ser tóxica, si se ingiere y puede reaccionar con cobre o plomo de las tuberías y formar componentes explosivos. En caso de eliminación del producto, hacerlo con abundante agua del grifo.
- Los materiales utilizados en la producción de los productos fueron analizados en origen mediante tests microbiológicos aprobados y resultaron ser negativos para el antígeno HBs, HCV y para el anti-HIV (1/2). Sin embargo, deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.
- Ningún método puede garantizar que los productos derivados de fuentes humanas o animales están libres de enfermedades infecciosas. Manipular y desechar con precaución los viales y su contenido.
- Para mayor información sobre la eliminación del producto o descontaminación en caso de derrame, ver las fichas de seguridad.

NOTAS

- Se recomienda la utilización de un control positivo (idealmente células R1r), un control negativo (idealmente células rr) y un reactivo de control negativo para analizar de forma paralela en cada tanda de tests. Los tests deben considerarse inválidos si los controles no muestran los resultados esperados.
- Es importante incluir un control negativo, debido a que los potenciadores macromoleculares del reactivo pueden provocar falsas reacciones positivas con las células recubiertas de IgG.
- En las técnicas aquí recomendadas un volumen es aproximadamente 40µl utilizando el gotero suministrado.
- La utilización de los reactivos y la interpretación de los resultados deben llevarse a cabo por personal cualificado y formado de acuerdo a los requisitos del país donde los reactivos están siendo utilizados.
- El usuario debe determinar la idoneidad de los reactivos para otras técnicas.

CONSERVACIÓN

No congelar. Los viales de reactivo deben ser conservados a 2-8°C. Almacenamientos prolongados, a temperaturas fuera de este rango, pueden provocar una aceleración de la pérdida de reactividad.

MATERIAL NECESARIO

- Tubos de vidrio (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Centrífuga de tubos.
- Baño o incubador equilibrado a 37°C ± 2°C.
- Pipetas volumétricas.
- Portaobjetos de vidrio para el microscopio.
- Stik aplicador.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0.9%, pH 7.0 ± 0.2 a 22°C ± 1°C.

MUESTRAS

Debe utilizarse muestras de sangre recogidas con o sin anticoagulante. Si el test no se realiza de inmediato, conservar las muestras a 2-8°C. Las muestras en EDTA o citrato deben ser analizadas en 48 horas. Las muestras recogidas en ACD, CPD o CPDA-1 pueden ser estudiadas hasta 35 días desde su retirada. Todas las muestras de sangre deben ser lavadas con PBS al menos dos veces antes de realizar el test. Todas las muestras de sangre que muestren evidencias de lisis pueden dar lugar a resultados no fiables.

PROCEDIMIENTO

A. Método en Tubo

- Preparar una suspensión de hematíes a testar lavados al 2-3% en PBS.

- Añadir en un tubo identificado: 1 volumen de reactivo Anti-D y un volumen de la suspensión de hematíes.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente por aglutinación.
- Cualquier tubo que muestre un resultado negativo o cuestionable, debe ser incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Tras la incubación, repetir los pasos 3 y 4.

B. Método en Porta

- Preparar una suspensión de hematíes al 35-45% en suero, plasma o PBS.
- Depositar en un porta identificado: 1 volumen del reactivo Anti-D y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
- Utilizando un stik aplicador limpio, mezclar el reactivo y las células en un área de unos 20 x 40 mm.
- Lentamente inclinar el porta de atrás a delante durante 30 segundos, ocasionalmente con un periodo adicional de mezcla de 2 minutos, manteniendo el porta a temperatura ambiente.
- Leer macroscópicamente tras 2 minutos sobre una luz difusa y no confundir las fibras de fibrina con la aglutinación.
- Cualquier reacción débil debe ser repetida con la técnica en tubo.

PROCEDIMIENTO (PARA LA DETECCIÓN DE LA CATEGORÍA D^{VI})

A. Técnica antiglobulina indirecta

- Preparar una suspensión al 2-3% de los hematíes a evaluar lavados en PBS.
- Depositar en un tubo identificado: 1 volumen del reactivo Anti-D y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
- Mezclar minuciosamente e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- Lavar 4 veces los hematíes en PBS cuidando de decantar la solución salina entre lavados y resuspendiendo el botón celular tras cada lavado. Tras el último lavado, decantar completamente la solución salina.
- Añadir 2 volúmenes de antiglobulina humana o anti-IgG a cada botón celular.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo: La aglutinación constituye un resultado positivo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la presencia del antígeno D en los hematíes.
- Negativo: La ausencia de aglutinación de hematíes constituye un resultado negativo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la ausencia del antígeno D en los hematíes.
- Los resultados de células que aglutinen con el control negativo deben excluirse, puesto que la aglutinación es probablemente causada por el efecto de los potenciadores macromoleculares del reactivo en células sensibilizadas.

Estabilidad de las reacciones

- Leer los tests realizados directamente tras la centrifugación.
- Las etapas de lavado deben completarse sin interrupción alguna y la centrifugación y lectura debe realizarse inmediatamente tras la adición del reactivo. Los retrasos pueden suponer la disociación de los complejos antígeno anticuerpo, causando falsos negativos o resultados positivos débiles.
- Los tests en porta deben ser interpretados en 2 minutos a fin de asegurar la especificidad y evitar la posibilidad de que un resultado negativo sea incorrectamente interpretado como positivo debido al secado del reactivo.
- Los resultados, de tests realizados a otras temperaturas de las aquí recomendadas, deben ser interpretados con cautela.

LIMITACIONES

- El reactivo Reactiva Search Anti-D no es adecuado para su utilización con células tratadas enzimáticamente o resuspendidas en LISS.
- La sangre almacenada puede dar lugar a reacciones más débiles que la sangre fresca.
- Puede observarse falsa aglutinación positiva en células sensibilizadas con IgG.
- Puede también ocurrir falsos resultados positivos o negativos debido a:

- Contaminación de los materiales del test.
- Conservación inadecuada, concentración celular, tiempo o temperatura de incubación.
- Centrifugación inapropiada o excesiva.
- Desviación de las técnicas recomendadas.

- El usuario es responsable del funcionamiento de los reactivos en cualquier otro método distinto de los mencionados como técnicas aquí detalladas.
- Cualquier desviación de las técnicas aquí recomendadas debería ser validada antes de su utilización⁹.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Los reactivos han sido caracterizados para todos los procedimientos aquí mencionados.
- Previamente a su liberación, cada lote de Anti-D Reactiva Search es probado, a través de las técnicas recomendadas frente a un panel de hematíes antígenos-positivo, a fin de asegurar la adecuada reactividad.
- La especificidad en origen de los anticuerpos monoclonales está demostrada frente a un panel de hematíes antígenos-negativo.
- La potencia del reactivo ha sido analizada frente a un estándar de referencia de potencia mínima Anti-D 99/836, obtenido del National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC).
- El Control de Calidad de los reactivos se llevó a cabo utilizando hematíes lavados dos veces en PBS, previa utilización.
- Los reactivos cumplen las recomendaciones de la última versión de las Guías para los Servicios de transfusión de sangre del Reino Unido.

BIBLIOGRAFÍA

- Kholer G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975, 256, 495-497.
- Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man 6th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.

PRESENTACIÓN:

CONT. 1X10 ml CODIGO: RSHC-004