

Teste para determinar grupo sanguíneo

Uso "in vitro"

RapidVet® -H
Canine DEA 1

NOTA IMPORTANTE SOBRE O TESTE

Por favor, certifique-se de ler e acompanhar as etapas do procedimento com cuidado.

Descrição e Finalidade: Como a prática da medicina transfusional veterinária, sofreu enorme crescimento nos últimos anos, tem aumentado a importância de identificar o tipo sanguíneo em caninos^{1,2}. RapidVet-H (DEA 1 Canino) destina-se a classificar cães com DEA 1 positivos ou negativos.

Embora sabe-se que os cães não possuem isoanticorpos de grupos sanguíneos incompatíveis, e, portanto, geralmente toleram bem uma transfusão incompatível inicial, a boa prática da medicina veterinária dita que tais transfusões devem ser evitadas. A meia-vida das células incompatíveis transfundidas, será bastante curto, e assim, o resultado terapêutico pretendido pode não ser alcançado. Além disso, a necessidade de uma transfusão futura do paciente canino deve ser considerada. Os anticorpos resultantes de transfusão de sangue³⁻⁷ incompatíveis, podem formar-se 5 a 7 dias após a transfusão, e terão viabilidade longa. O que acarretará problema em transfusão emergencial futura.

Além disso, os anticorpos resultantes de transfusão de grupos sanguíneos incompatíveis desenvolvidos em cadelas, devem ser motivo de preocupação especial dos criadores. Uma vez que, os anticorpos presentes no colostro das cadelas com isoanticorpos para um determinado tipo de sangue, não devem ser cruzadas com macho que possui este grupo sanguíneo⁸. Os filhotes poderão desenvolver isoeritrólise e até mesmo morrer devido a anemia hemolítica^{4,8-10}.

Oito antígenos específicos foram identificados na membrana celular dos eritrócitos canino^{1,3}. O sistema internacionalmente aceito de grupo sanguíneo canino, Sistema "DEA" (Dog Erythrocyte Antigen), baseia-se nestes antígenos. Atualmente, caracteriza oito grupos sanguíneos comuns, os antígenos DEA 1.1, 1.2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

DEA 1.1 e 1.2 são os fatores sanguíneos mais importantes do cão. Ambos são altamente antigênicos mas DEA1.1 é o fator principal na transfusão^{1,4,11-14,22-24}. Estima-se que 40% de todos os cães são DEA1.1 positivo³. Embora todos os antígenos dos grupos sanguíneos sejam capazes de estimular a formação de isoanticorpos, DEA 1.1 apresenta maior potencial. Assim, a maioria das reações resultantes da transfusão de células incompatíveis ocorre quando DEA 1,1 com sangue positivo é doado a um DEA1.1 negativo⁴. Reações clinicamente significativas à DEA1.2 pode ocorrer, mas são menos severas do que as reações de DEA1.1 positivo. DEA 7 pode ser um fator de reação nas transfusões, mas uma vez que é uma aglutinina fraca e um isoanticorpo que ocorre naturalmente, é considerada como tendo baixo significado clínico. Os demais antígenos nas transfusões causam problemas insignificantes⁵.

Pesquisa recente utilizando imunocromatografia e citometria de fluxo, demonstrou que os componentes do subsistema DEA 1 (DEA 1.1, 1.2 e possivelmente 1.3), não são tipos sanguíneos diferentes, mas sim, expressões diferentes do mesmo antígeno da célula vermelha (de negativo para fortemente positivo). Um estudo em 66 cães descobriu que 46, ou 70%, eram DEA 1 positivo. O ideal é que todo o sangue transfundido seja DEA1.1 negativo. Algumas raças, como os galgos são particularmente adequados como doadores de sangue, por causa de uma baixa concentração dos antígenos DEA 1 e DEA 7. No entanto, até o conceito de banco de sangue canino é amplamente aceito com sangue prontamente disponível, a partir de fontes comerciais, transfusão de sangue de cães que estão presentes na área no momento da necessidade, permanecerá normal.

Pode ocorrer resultados equivocados devido a cães com auto-aglutinação e anêmicos. O paciente canino, já vindo com informação da tipagem sanguínea, é o mais indicado. Identificar um cão em particular com DEA 1 positivo ou negativo, no nascimento, ajuda a tomada de decisão no futuro. Cão DEA 1 positivo pode receber tanto sangue de cão DEA 1 positivo e negativo. Um cão que é DEA1 negativo, não deve receber sangue de DEA 1 positivo.

Princípio e Explicação do Teste: O RapidVet-H (DEA 1 Canino) baseia-se na reação de aglutinação, que ocorre, quando eritrócitos que contenham antígeno DEA1 na superfície da membrana celular, interagem com anticorpos monoclonal específico anti-DEA 1 que está liofilizado e aderido no cartão de teste. O anticorpo monoclonal é reconstituído com diluente para formar um anti-soro, e é misturado com o sangue total do doente. Todos os eritrócitos positivos DEA 1 *reagem* com o anti-soro. O anti-soro *não reage* com os eritrócitos negativos DEA 1. Os resultados são identificados visualmente.

Observação: Um certo número de pacientes caninos exibem auto-aglutinação de vários graus, devido a fatores no soro que provocam a auto-aglutinação das próprias células vermelhas do paciente. RapidVet-H (DEA 1 Canino) fornece um poço que identifica esses pacientes. Se um paciente exibe esta condição no teste, deve-se antes de realizar o teste, separar o soro e lavar os glóbulos vermelhos antes de realizar. *Instruções para lavagem das hemácias podem ser encontradas no nosso site*

www.vpdiagnostico.com.br

Reagentes e Materiais: O kit de teste contém os reagentes e os materiais listados abaixo. Guardar na posição vertical.

Cartões de teste de aglutinação. Cada cartão tem três poços identificados como Auto-aglutinação> "Auto-Agglutination Saline Screen", DEA 1 Controle Positivo >"Positive Control", e teste do paciente > "Patient Test". Os cartões são embalados individualmente em polietileno, hermeticamente fechados, cada um contendo um dessecante.

Frasco com diluente: O frasco de plástico transparente contém fosfato 0,02 mol / L de tampão fosfato (PBS) a pH 7,4. A ponteira dispensa 40 µL.

Pipetas e agitadores: Cada saco de polietileno contém duas pipetas de plástico e três agitadores.

CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO

1. Os Cartões de teste de aglutinação são estáveis à temperatura ambiente (20-25 °C) por um período de 24 meses a partir da data da fabricação. Guarde os cartões em sua embalagem de polietileno longe da luz solar direta. Cada cartão de teste tem uma data de validade impressa.
2. O diluente é estável à temperatura ambiente durante 24 meses a partir da data da fabricação. Cada frasco de diluente tem uma data de validade impressa.

NOTA: Cada caixa com o kit de teste RapidVet-H (DEA 1 Canino) é impressa com data de validade, que representa a data de vencimento do componente com menor data de vencimento do kit. Mesmo que alguns componentes do kit possam ter datas de validade mais tardia individuais, não é recomendado o seu uso com outros componentes de outros kits.

PROCEDIMENTO DO TESTE

1. Extrair o sangue do paciente para seringa ou tubo revestido com EDTA, ou contendo EDTA como anticoagulante. O teste requer apenas 150 µL de sangue total, mas o tubo ou seringa deve ser completado de modo que o EDTA fique com uma concentração adequada. Se o teste não for realizado imediatamente, não deve-se adicionar conservantes como CPDA (citrato-fosfato-dextrose-adenina) no sangue.
2. Remova o cartão de teste de sua embalagem plástica. Guarde a embalagem plástica e reserve o dessecante.
3. Escreva o nome/número do cão e a data do teste no cartão. Coloque o cartão de teste em uma superfície plana.
4. DISPENSE 1 gota de diluente (40 µL) do frasco com o tampão no poço "Auto-Agglutination Saline Screen"
5. Aspire uma pequena quantidade de amostra do paciente para a pipeta e goteje (50 µL) no mesmo poço marcado "Auto-Agglutination Saline Screen" (Ver nota 1 para o uso correto da pipeta). Com o misturador (levemente) pressionado para baixo, e com a parte plana, misturar os materiais dentro da totalidade do poço, por cerca de 10 segundos.
6. Uma pequena percentagem de cães doentes e de cães saudáveis auto-aglutinam. Se a auto-aglutinação ocorrer, PARAR o teste e realizar os procedimentos normais de lavagem de células antes de prosseguir (método no site www.vpdagnostico.com.br). Pode ser possível determinar se o cão é DEA1 positivo ou negativo, apesar da auto-aglutinação, se a auto-aglutinação for leve. No entanto, devido à dificuldade de diferenciação entre os resultados positivo e negativo, em tais circunstâncias, este deve ser tentado somente em situações de emergência, quando o tempo e / ou o pessoal necessário para lavar as células não está disponível. Pode ser usado os seguintes critérios: se a aglutinação no poço do paciente for igual a auto-aglutinação, o cão provavelmente seja DEA1 negativo. Se a aglutinação no poço do paciente for substancialmente mais aglutinada que no poço da auto-aglutinação, o cão é provavelmente DEA 1 positiva.

Se a auto-aglutinação não ocorrer, prossiga para a próxima etapa

7. DISPENSE 1 gota de diluente (40 µL) nos 2 poços restantes. O diluente auxilia na reconstituição do material liofilizado no poço controle e do paciente.
8. ASPIRAR uma pequena quantidade de amostra do paciente com a pipeta e gotejar uma gota (50 µl) no poço marcado "Positive Control". Utilizando um novo agitador e pressionando para baixo com a parte plana, espalhar e misturar os materiais dentro da totalidade do poço durante cerca de 10 segundos.
9. Novamente ASPIRAR uma pequena quantidade de amostra do paciente e goteje (50 µL) para o poço marcado "Patient Test" . Utilizando um novo agitador e pressionando para baixo com a parte plana do agitador, espalhar e misturar os materiais dentro da totalidade do poço durante cerca de 10 segundos.
10. Movimento do cartão, usando um movimento transaxial, por não mais do que um minuto, tempo menor se a aglutinação já ocorreu no poço "teste do paciente" , cuidado para que os materiais estejam homogeneizando e "girando" dentro de cada poço. Tenha cuidado para não misturar material de um poço para outro.

A aglutinação é uma ligação eletrostática de células e anticorpos e, assim, é reversível. Se a aglutinação aparece e desaparece e volta a aparecer, ou se o operador não sabe ao certo se o que vê é a aglutinação, isto ocorre provavelmente devido a um efeito de pró-zona. Isto pode ocorrer, em cães com múltiplos tipos de sangue, e poucos antígenos DEA 1 na membrana celular do eritrócito, em relação à concentração do anticorpo monoclonal do poço. Em tais casos, adicionar uma segunda gota de diluente e movimentar a placa durante mais 30 segundos, antes de ler o resultado. Isto irá potencializar a reação se, e apenas se, o animal for DEA 1 positivo.

11. **LER** os resultados e anotar os poços em que ocorreram as aglutinações. O Guia de Interpretação Canino incluído pode ser utilizado como uma referência. Recomendamos entretanto que os resultados informados não sejam somente como DEA 1 positivo ou negativo, mas informar quando positivo, também o grau (fraco a forte) de DEA 1.
12. Depois que o cartão foi lido, tirar uma fotografia digital para ter um registro permanente. Alternativamente, inclinar o cartão a um ângulo de 10° para que o excesso de sangue corra para o fundo dos poços. Colocando a parte superior da placa no dessecante vai conseguir isso. Depois que os materiais no cartão secarem, coloque o cartão na embalagem plástica para um registro permanente.

PROCEDIMENTO NOTA 1: Utilização da pipeta: Segure o tubo de plástico entre o polegar e o dedo indicador, apertar bem e não liberar a pressão. Segurar o tubo de amostra verticalmente e colocar a extremidade aberta do tubo de plástico e mergulhe abaixo da superfície da amostra. Diminua a pressão dos dedos para pipetar a amostra.

Em seguida, segure a pipeta em posição perpendicular diretamente sobre o poço para o qual a amostra se destina. Aperte suavemente e permita que caia no poço 50 µL. A pipeta é concebida para expelir ligeiramente um excesso de 50 µl para compensar uma pequena quantidade de amostra retida pelo agitador.

Use cada pipeta apenas uma vez, em seguida, descartar. Sob nenhuma circunstância utilize a pipeta mais de uma vez, pois haverá contaminação fazendo com que os resultados dos testes sejam imprecisos.

Resultados: Se o teste foi executado corretamente, aparecerá uma aglutinação visível no poço "Positive Control". Se não houver nenhuma aglutinação no controle positivo, o ensaio não foi executado corretamente.

NOTA: O poço controle não tem outra finalidade. O material liofilizado no "Positive Control" também NÃO É O MESMO que o do poço "Patient Test"

Se a amostra do paciente ocorrer aglutinação no poço marcado "Patient Test" e não houve auto-aglutinação, o paciente canino é DEA 1 positivo. Se não houver aglutinação visível no poço marcado "Patient Test", o paciente é DEA 1 negativo.

Qualquer aparência granular fina desenvolvida após 1 minuto deve ser desconsiderada na determinação dos resultados. A velocidade de aglutinação e o tamanho dos aglomerados de um paciente DEA 1 positivo, pode ser diferente do poço controle positivo. Ao contrário dos seres humanos, um animal pode possuir mais de um tipo de sangue primário. Em tal caso, as células vermelhas levarão tais antígenos de cada tipo. Tal animal vai levar menos antígenos DEA 1 do que um animal que só tem DEA 1 de um tipo de sangue primário.

Se o paciente está muito anêmico, o padrão de aglutinação pode ter a forma de pequenos agregados discretos, com o tamanho de uma cabeça de alfinete, em vez de grande aglutinação .

LIMITAÇÕES DO TESTE:

1. Para obtenção de resultados precisos, é essencial que o procedimento correto seja seguido.
2. Sempre use uma nova pipeta para cada amostra e um novo agitador para cada poço. Reutilizar qualquer dispositivo fará com que haja contaminação cruzada e resultados imprecisos.
3. Sempre execute os poços de controle em cada cartão de teste, mesmo que testar vários pacientes e usando vários cartões de teste. Os poços de controle são usados como evidência de que o teste foi realizado corretamente e cria um registro permanente adequado.
4. A estabilidade dos componentes individuais do kit varia. Armazenar os componentes, conforme indicado nos rótulos. Não use nenhum componente além da data de validade indicada. O uso de materiais vencidos podem dar resultados não confiáveis.
5. O diluente é fornecido em frasco com tampa de rosca, para minimizar a contaminação bacteriana ou outro problema. O diluente de outras fontes, não deve ser utilizado.
6. A integridade física da amostra do paciente é crítico para os resultados corretos.
7. Sempre amostrar uma seringa cheia ou tubo contendo EDTA. Menos sangue irá causar uma concentração demasiado elevada de EDTA na amostra a ser testada.

Características de desempenho: Um total de 145 amostras de eritrócitos canino, dos quais 127 foram escolhidos aleatoriamente, foram testados utilizando anti-soro canino DEA1.1 e o kit RapidVet-H (Canine DEA 1.1). Os resultados foram idênticos: 91 amostras foram DEA 1.1 positiva e 54 foram DEA 1.1 negativa. Nove destas amostras foram testadas várias vezes ao longo de um período de vários dias, com resultados consistentes, demonstrando a reprodutibilidade do ensaio.

Eliminação: Eliminar todos os materiais biológicos, pipetas e agitadores em um recipiente de risco biológico.

Controle de Qualidade: Todos os reagentes e materiais incorporados neste kit tem sua qualidade controlada por procedimentos de teste padrão, usando programa de controle de qualidade de rotina durante a fabricação.

GUIA PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIVEL CAUSA	AÇÃO CORRETIVA
Não ocorreu aglutinação no poço "Positive Control"	<p>A) esqueceu de usar diluente para reconstituir o material liofilizado</p> <p>b) adicionou no poço quantidade incorreta de diluente ou amostra, ou não adicionou a segunda gota de diluente de acordo com o procedimento 10</p> <p>c) ao misturar sangue e o liofilizado, provocou abrasão do cartão com o misturador, pelo excesso de força aplicada</p>	<p>Rever cuidadosamente os procedimentos usados.</p> <p>Repetir o teste</p>
Reação negativa no poço "Patient Test" com o soro de um paciente canino sabidamente DEA 1 positivo, por outra metodologia	<p>a) o mesmo que os itens a, b, c acima</p> <p>b) quantidade insuficiente de sangue em relação ao EDTA ao coletar a amostra</p> <p>c) uso de concentrado de hemácias, em vez de sangue total, como amostra</p> <p>d) a outra metodologia não é precisa</p>	<p>a) revise cuidadosamente os procedimentos usados. Repetir o teste, se necessário.</p> <p>b) ver procedimento nº 1 e limitações do procedimento nº 7</p> <p>c) diluir a amostra 1:1 com solução salina fisiológica e retestar</p>
A aglutinação ocorreu no poço "Patient Test" mas tem características diferentes as do poço "Positive Control"	É normal de ocorrer	Ler o resultado normalmente
Agglutinação desaparece/ não tem certeza que seja aglutinação	Prozona. Concentração de anticorpos muito maior do que os sítios de ligações na membrana celular dos eritrócitos do canino DEA 1, em cães com vários tipos de sangue	Como observado no procedimento nº 10, adicionar mais uma gota de diluente e somente balançar o cartão, mas não misture com o misturador.

References:

- Kristensen A, Feldman B: Canine and Feline Transfusion Medicine. The Veterinary Clinics of North America, W.B. Saunders 25:6, November 1995
- Vriesendorp HM, Albert E, Templeton JW: Joint report of the second international workshop on canine immunogenetics. Transplant Proc 8:289-314, 1976
- Pichler MH, Turnwald GH: Blood transfusion in the Dog and Cat, Part I. Physiology, Collection, Storage, and Indications for Whole Blood Therapy. Continuing Education Article #6, 7, 1:64-71, Jan 1975
- Turnwald GH, Pichler ME: Blood transfusion in Dogs and Cats, Part II. Administration, Adverse Effects, and Component Therapy. Continuing Education Article #3, 7, 2:115-124, Febr 1985
- Ejima H, Kurakawa K, Ikemoto S: Experimental studies on blood transfusion in dogs II. Incompatibilities based on red cell and leukocyte blood groups. Bull Nippon Vet Zootech Coll 29:1-13, 1980
- Young LE, Ervin DM, Yule CL: Hemolytic reactions produced in dogs by transfusion in incompatible dog blood and plasma: Serologic and hematologic aspects. Blood 4:1218-1231, 1949
- Young LE, Christian RM, Ervin DM, et al: Erythrocyte-isoantibody reactions in dogs. Proceedings, Intern Soc Hematol 226-233, 1950
- Young LE, Christian RM, Ervin DM, et al: Hemolytic diseases in newborn dogs. Blood 6:291-313, 1951
- Young LE, Ervin DM, Christian RM, et al: Hemolytic disease in newborn dogs following isoimmunization of the dam by transfusions. Science 109:630-631, 1949
- Christian RM, Ervin DM, Swisher SN, et al: Hemolytic anemia in newborn dogs due to absorption of isoantibody from breast milk during the first day of life. Science 110:443, 1949
- Swisher SN, Young LE: The blood grouping systems of dogs. Physiol Rev 41:495-520, 1961
- Swisher SN, Young LE, Trabold N: In vitro and in vivo studies of the behavior of canine erythrocyte-isoantibody systems. Ann NY Acad Sci 97:15-25, 1962
- Dudok De Wit C, Coenegracht NACJ, Poll PHA, et al: The practical importance of blood groups in dogs. J Small Anim Pract 8:285-289, 1967
- Young LE, O'Brien WA, Swisher SN, et al: Blood groups in dogs - their significance to the veterinarian. Am J Vet Res 13:207-213, 1952
- Hohenhaus AE: Problems in Veterinary Medicine, Transfusion Medicine, Philadelphia. J.B. Lippincott Company, 1992
- Nichols M: Monoclonal antibodies with red cell specificities. In: Moulds, JM, Masouresis SP, eds. Monoclonal antibodies. Arlington, Va: American Association of Blood Banks 27-47, 1989
- Sinor LT, Farlow SJ, Hudson GS, et al: Laboratory applications of monoclonal antibodies. In: Moulds, JM, Masouresis SP, eds. Monoclonal antibodies. Arlington, Va: American Association of Blood Banks 49-82, 1989
- Tucker EM, Metenier L, Grosclaude J, et al: Monoclonal antibodies to bovine blood group antigens. Anim Genet 17:3-13, 1986
- Fulton JE, Brites RW, Lamont SJ: Monoclonal antibody differentiates chicken B system alloantigens. Anim Genet 21:39-45, 1990
- Tucker EM, Clarke SW, Metenier L: Murine/bovine hybridomas producing monoclonal alloantibodies to bovine red cell antigens. Anim Genet 18:29-39, 1987
- Andrews GA, Charvey PS, Smith JE: Production, characterization, and applications of a murine monoclonal antibody to dog erythrocyte antigen 1.1. JAVMA201:10, 1549-52, 1992
- Kohn B, Reiteneyer S, Giger U: Bestimmung der Blutgruppe DEA 1.1 und deren Bedeutung beim Hund. Kleintierpraxis 43, Heft 2 (1998), Seiten 77-86
- Knottenbelt C, Mackin A: Blood transfusions in the dog and cat. In Practice, March 1998, p. 110-114
- Lubas G: Trasfusione del sangue in clinica canina. Obiettivi & Document Veterinari, N. 3 (1997), Supplemento, p. 15-25

Manufactured under license from: Kansas State University
 RapidVet is a registered trademark of **dms**laboratories, inc.
 RVHC-023

dmslaboratories, inc.
 2 Darts Mill Road, Flemington, NJ 08822 USA
 Tel: (908) 782-3353 / Fax: (908) 782-0832
www.rapidvet.com

Importador: JMR Trading Ltda
 CNPJ: 11.857.347/0001-71
 Nº Registro no MAPA: 117/10-PR
 Endereço: Rua Santa Alves Petra, 173
 CEP: 83.325-170 Pinhais-Paraná-Brasil
 Responsável Técnica: CRMV PR nº3288
 Margareth Carvalho S. Agottani
 SAC: info@jmrtrading.com.br
www.vpdagnostico.com.br