

Teste para Determinação de Grupo Sanguíneo

Para uso *in vitro*.

RapidVet®-H
Canine DEA 1

MODIFICAÇÃO DO PROCEDIMENTO DO TESTE E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE SANGUE DO PACIENTE

Atenção! Revise cuidadosamente e siga todos os procedimentos revisados, modificados e desenvolvidos para proporcionar uma melhor interpretação dos resultados!

DESCRIÇÃO E USO PRETENDIDO

À medida que a prática da medicina transfusional veterinária passou por um enorme crescimento nos últimos anos, a importância da identificação dos tipos sanguíneos aumentou.^{1 2}

Embora seja amplamente verdade que os cães não possuam isoanticorpos contra grupos sanguíneos incompatíveis e, portanto, geralmente tolerem bem uma transfusão inicial incompatível, a boa prática da medicina veterinária determina que tais transfusões sejam evitadas. A meia-vida das células incompatíveis transfundidas será bastante curta e o resultado terapêutico pretendido pode não ser alcançado. Além disso, devem ser consideradas as futuras necessidades do paciente canino. Anticorpos resultantes de uma transfusão incompatível² podem se formar em apenas 5 a 7 dias e permanecer viáveis por longo período, eliminando a possibilidade de utilizar sangue incompatível em uma futura situação de emergência.

Além disso, anticorpos desenvolvidos em fêmeas sensibilizadas por transfusão de grupos sanguíneos incompatíveis são motivo de preocupação especial para criadores. Como os anticorpos estão presentes no colostro, fêmeas com isoanticorpos para determinado tipo sanguíneo não devem ser acasaladas com machos que possuam esse grupo sanguíneo se forem amamentar os filhotes resultantes.^{4 5 6} Os filhotes lactentes desenvolverão isoeritrolise e poderão ser suscetíveis a doenças ou até morrer devido à anemia hemolítica.^{4 5 6}

Historicamente, o sistema internacionalmente aceito de grupos sanguíneos caninos, o “DEA” (Dog Erythrocyte Antigen – Antígeno Eritrocitário Canino), era baseado em oito antígenos específicos identificados na superfície dos eritrócitos caninos.^{7 8} Atualmente caracteriza oito grupos sanguíneos comuns, dez antígenos DEA 1.1, 1.2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

DEA 1.1 e 1.2, considerados parte do subsistema DEA 1 devido à similaridade antigênica, são os fatores sanguíneos mais significativos no cão. Ambos são altamente antigênicos, mas o DEA 1.1 é considerado o principal fator lítico na medicina transfusional canina.^{1 4 11 14 22 24}

Estima-se que 40% dos cães sejam DEA 1.1 positivos.³ Embora todos os antígenos de grupos sanguíneos sejam capazes de estimular a formação de isoanticorpos, acredita-se que o DEA 1.1 tenha o maior potencial de estimulação. Assim, a maioria das reações decorrentes de transfusão incompatível ocorre quando sangue identificado como DEA 1.1 positivo é administrado a um receptor DEA 1 negativo.² Reações clinicamente significativas ao que foi considerado DEA 1.2 podem ocorrer, mas são menos severas do que aquelas relacionadas ao DEA 1.1 positivo. O DEA 7 pode participar de reações transfusionais, mas como é uma crioaglutinina e um isoanticorpo natural, é considerado de baixa significância clínica. Os antígenos restantes são considerados clinicamente insignificantes em problemas transfusionais.⁴

Pesquisas mais recentes [utilizando imunocromatografia e citometria de fluxo] demonstraram que os componentes do subsistema DEA 1 [DEA 1.1, 1.2 (e possivelmente 1.3)] não são tipos sanguíneos separados, mas diferentes expressões (de negativo a fortemente positivo) do mesmo antígeno eritrocitário. Um estudo com 66 cães mostrou que 46, ou 70%, eram DEA 1 positivos.

Idealmente, todo sangue transfundido deveria ser negativo para DEA 1. Certas raças, como o Greyhound, são particularmente adequadas como doadoras devido à baixa frequência dos antígenos DEA 1 e DEA 7. Entretanto, até que o conceito de banco de sangue canino seja amplamente aceito e haja sangue prontamente disponível de fontes comerciais, transfusões realizadas com cães disponíveis localmente continuarão sendo a norma.

Como vários cães podem apresentar auto-aglutinação e cães muito anêmicos podem gerar resultados duvidosos, recomenda-se a tipagem antes de uma necessidade urgente. Identificar um cão como DEA 1 positivo ou negativo ao nascimento simplifica muito futuras decisões. Um cão DEA 1 positivo pode receber sangue DEA 1 positivo ou negativo. Um cão DEA 1 negativo não deve receber sangue DEA 1 positivo.

O RapidVet®-H (DEA 1 Canino) destina-se à classificação de cães como DEA 1 positivos ou negativos.

PRINCÍPIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O teste RapidVet-H (DEA 1 Canino) baseia-se na reação de aglutinação que ocorre quando um eritrócito contendo antígeno DEA 1 em sua membrana interage com um anticorpo monoclonal murino específico para DEA 1, liofilizado no cartão de teste. **O anticorpo monoclonal é reconstituído com um diluente para formar um antissoro e é cuidadosamente misturado aos eritrócitos livres de plasma do paciente.** Todos os eritrócitos DEA 1 positivos reagem com o antissoro causando aglutinação. O antissoro é completamente não reativo com eritrócitos DEA 1 negativos. Os resultados são identificados visualmente.

ADVERTÊNCIA

Certos pacientes caninos apresentam auto-aglutinação em diferentes graus devido a fatores séricos que causam aglutinação dos próprios eritrócitos do paciente. Se isso ocorrer sob as condições do teste, não será possível tipar definitivamente o paciente sem separar o soro e lavar seriamente os eritrócitos restantes antes de realizar o teste. Um poço é fornecido em cada cartão para triagem desses pacientes.

REAGENTES E MATERIAIS:

Este kit contém os reagentes e materiais listados abaixo. Um guia de interpretação e cartões de relatório de grupo sanguíneo também são fornecidos.

CARTÕES DE TESTE DE AGLUTINAÇÃO

Cada cartão possui 3 poços visualmente definidos identificados como: “Auto-Agglutination Saline Screen”, “Positive Control” e “Patient Test”. Os cartões são embalados individualmente em envelopes de polietileno selados, contendo um sachê dessecante.

Um frasco plástico transparente conta-gotas contém solução salina tamponada com fosfato 0,02 mol/L em pH 7,4. A ponta dispensadora libera 40 µL.

PIPETAS E MISTURADORES

Cada embalagem de polietileno contém 2 pipetas plásticas e 3 bastões misturadores de madeira.

Materiais Necessários, mas não Fornecidos:

Materiais laboratoriais e solução salina normal necessários para preparação da amostra eritrocitária do paciente.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

1. Os cartões de aglutinação são estáveis em temperatura ambiente (20–25°C) por um período de 24 meses a partir da data de fabricação. Armazenar os cartões em seus envelopes de polietileno, longe da luz solar direta. Cada cartão possui data de validade.
2. O diluente é estável em temperatura ambiente por 24 meses a partir da data de fabricação. Cada frasco possui data de validade.

NOTA: Cada kit é rotulado com uma data de validade correspondente ao componente de menor validade no kit. Embora alguns componentes possam ter validade individual posterior, não é recomendado utilizar componentes de kits diferentes.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DO PACIENTE

1. ***Coletar sangue do paciente em seringa ou tubo de tampa roxa contendo EDTA como anticoagulante. A seringa ou o tubo devem ser preenchidos completamente para garantir concentração adequada de EDTA. Se a tipagem sanguínea não for realizada imediatamente, não adicionar conservantes como CPDA. Não utilizar heparina.***
2. ***Centrifugar o sangue total com EDTA por 10 minutos. Desprezar o sobrenadante (plasma). Manter apenas os eritrócitos.***
3. ***Em um tubo limpo, dispensar no mínimo 100 µL (0,1 mL) de eritrócitos. Adicionar solução salina estéril, no mesmo volume que os eritrócitos adicionados. Homogeneizar bem. Esta é a amostra do paciente.***

PROCEDIMENTO

1. REMOVER o cartão de teste do envelope plástico. Guardar o envelope e separar o sachê dessecante.
2. IDENTIFICAR o cartão com o nome/número do cão e a data do teste. Colocar o cartão sobre superfície plana.
3. ***DISPENSAR duas gotas (80 µL) de diluente no poço identificado como “Auto-Agglutination Saline Screen”.***
4. ASPIRAR pequena quantidade da amostra do paciente em uma pipeta fornecida e liberar 1 gota (50 µL) no poço “Auto-Agglutination Saline Screen”. (Ver Nota de Procedimento 1 para uso correto da pipeta.) Utilizando um misturador e pressionando suavemente sua parte plana, espalhar e misturar o material por toda a extensão do poço por aproximadamente 10 segundos. Girar o cartão em movimento transaxial por aproximadamente 30 segundos e observar se ocorreu aglutinação.
5. ***COLOCAR o cartão sobre superfície plana e adicionar 1 gota de diluente (40 µL). NÃO MISTURAR. Girar novamente o cartão por 30 segundos em movimento transaxial e observar se ocorreu aglutinação.***
6. Pequena porcentagem de cães doentes e saudáveis apresenta autoaglutinação. Se houver aglutinação, INTERROMPER o teste e realizar procedimentos normais de lavagem celular antes de continuar. Pode ser possível determinar se o cão é DEA 1 positivo ou negativo apesar da autoaglutinação quando esta for leve. Entretanto, devido à dificuldade de diferenciação entre resultados positivos e negativos nessas circunstâncias, isso deve ser tentado apenas em situações de emergência. Se o usuário prosseguir, os seguintes critérios podem ser utilizados: se a aparência no poço do paciente for igual à do poço de autoaglutinação, o cão provavelmente é DEA 1 negativo. Se houver aglutinação substancialmente maior no poço do paciente, o cão provavelmente é DEA 1 positivo.
Se não ocorrer autoaglutinação, prossiga para a próxima etapa.
7. ***DISPENSAR 2 gotas de diluente (80 µL) em cada um dos dois poços restantes. O diluente auxilia na reconstituição do material liofilizado nos poços controle e paciente.***
8. ASPIRAR pequena quantidade da amostra do paciente em uma pipeta e liberar 1 gota (50 µL) no poço “Positive Control”. Utilizando um novo misturador e pressionando suavemente sua parte plana, espalhar e misturar o material por todo o poço durante aproximadamente 10 segundos.

9. ASPIRAR novamente pequena quantidade da amostra do paciente e liberar 1 gota (50 µL) no poço “Patient Test”. Utilizando um novo misturador e pressionando suavemente sua parte plana, espalhar e misturar o material por todo o poço durante aproximadamente 10 segundos.
10. **GIRAR o cartão em movimento transaxial por aproximadamente 60 segundos, garantindo mistura completa e movimentação do material em cada poço. Tomar cuidado para evitar contaminação cruzada. Observar se ocorre aglutinação durante a rotação do cartão.**
11. **POSICIONAR o cartão em ângulo de 10–20° e permitir que as amostras sedimentem no fundo dos poços por 60 segundos.**
12. **COLOCAR o cartão sobre superfície plana e ADICIONAR 1 gota de diluente (40 µL) em ambos os poços. NÃO MISTURAR. Girar o cartão em movimento transaxial por 30 segundos. Posicionar o cartão em ângulo de 10–20° e permitir sedimentação por 30 segundos.**
13. LER os resultados e registrar os poços onde ocorreu aglutinação. Se o teste foi realizado corretamente, deve ocorrer aglutinação visível no poço “Positive Control”. Se não houver aglutinação no controle, o teste não foi executado corretamente.
 - Se a amostra do paciente apresentar aglutinação no poço “Patient Test” e não houver autoaglutinação, o paciente é DEA 1 positivo.
 - Se não houver aglutinação visível no poço “Patient Test”, o paciente é DEA 1 negativo.Recomenda-se registrar os resultados não apenas como DEA 1+ ou DEA 1–, mas também o grau de aglutinação (fraca a forte). Qualquer aparência granular fina que se desenvolva mais de 1 minuto após a leitura deve ser desconsiderada. A velocidade da aglutinação e o tamanho dos agregados celulares podem diferir do poço “Positive Control”. Diferentemente dos humanos, um animal pode possuir mais de um tipo sanguíneo primário. Nesses casos, os eritrócitos carregarão antígenos de cada tipo, resultando em menor quantidade de antígenos DEA 1 do que em animais que possuem apenas DEA 1 como tipo primário. Se o paciente for muito anêmico, o padrão de aglutinação pode aparecer como pequenas agregações discretas semelhantes à cabeça de um alfinete, em vez de aglutinação grosseira.
14. Após leitura do cartão, realizar uma fotografia digital para registro permanente.

NOTA DE PROCEDIMENTO 1: Uso da pipeta

Segure o tubo plástico entre o polegar e o indicador próximo à extremidade achatada e selada, comprimindo firmemente sem liberar a pressão. Mantenha o tubo da amostra na posição vertical e coloque a extremidade aberta da pipeta abaixo da superfície da amostra. Solte a pressão para aspirar o material.

Depois, mantenha a pipeta perpendicularmente sobre o poço onde a amostra será dispensada. Aperte suavemente permitindo que uma gota caia no poço (50 µL). A pipeta foi projetada para expelir volume ligeiramente superior a 50 µL para compensar a retenção de pequena quantidade de amostra pelo misturador.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. Para obtenção de resultados precisos, é essencial seguir corretamente o procedimento.
2. **Uso incorreto de pipetas ou misturadores pode causar contaminação cruzada e resultados imprecisos.**
3. Sempre executar os poços controle em cada cartão de teste, mesmo ao testar vários pacientes. Os controles servem como evidência de que o teste foi realizado corretamente e para criação de registro permanente apropriado.
4. A estabilidade dos componentes do kit varia. Armazenar os componentes conforme indicado nos rótulos. Não utilizar componentes vencidos. Materiais vencidos podem causar resultados não confiáveis.
5. **O diluente fornecido encontra-se em frasco conta-gotas com tampa rosqueável para minimizar contaminação bacteriana ou de outra natureza. Diluentes de outras fontes laboratoriais não devem ser utilizados. Cada gota do diluente contém 40 µL.**
6. A integridade física da amostra do paciente é fundamental para resultados corretos.
7. **Garantir coleta completa da seringa ou tubo com EDTA antes da remoção do plasma. Os eritrócitos livres de plasma serão utilizados conforme instruído no teste.**

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES CONHECIDAS

Nenhuma.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Um total de 145 amostras eritrocitárias caninas, das quais 127 foram escolhidas aleatoriamente, foi testado utilizando antissoro anti-DEA 1.1 canino e o teste RapidVet-H (DEA 1.1 Canino). Os resultados foram idênticos: 91 amostras DEA 1.1 positivas e 54 negativas. Nove dessas amostras foram testadas múltiplas vezes (de 2 a 5) ao longo de vários dias com resultados consistentes, comprovando a reprodutibilidade do teste.

DESCARTE

Descartar todos os materiais biológicos, pipetas e misturadores em recipiente para resíduos biológicos.

CONTROLE DA QUALIDADE

Todos os reagentes e materiais incorporados neste kit passaram por controle de qualidade utilizando procedimentos padronizados durante a fabricação.

GUIA DE SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSÍVEL CAUSA	AÇÃO CORRETIVA
Ausência de aglutinação no poço "Positive Control"	a) esquecimento do uso do diluente para reconstituir o material liofilizado b) volume incorreto de diluente ou amostra dispensado inicialmente c) pressão excessiva ou uso da borda do misturador causando abrasão do substrato	Revisar cuidadosamente os procedimentos utilizados. Repetir o teste.
Ausência de reação no poço "Patient Test" em cão considerado DEA 1+ por outro método	a) ver itens a, b e c acima b) quantidade inadequada de sangue em relação ao EDTA c) uso de amostra incorreta, como sangue total ou concentrado de hemácias não diluído, em vez de hemácias livres de plasma d) outro método não é preciso	a) revisar cuidadosamente os procedimentos. Repetir o teste. b) ver Etapa 1 e Limitação 7 c) revisar preparação da amostra do paciente. Repetir o teste.
Existe aglutinação no "Teste do Paciente", mas com aspecto diferente do "Positive Control"	Isto é normal	Ver Resultados
Aglutinação desaparecendo / suspeita de aglutinação	Efeito prozona. Anticorpo muito concentrado em relação à quantidade de sítios de ligação DEA 1 em cães com múltiplos tipos sanguíneos	Conforme indicado na Etapa 12, adicionar a terceira gota de diluente após a reação inicial, sem misturar novamente, apenas movimentando o cartão

Referências

- Kristensen A, Feldman B: Canine and Feline Transfusion Medicine. The Veterinary Clinician 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 ME, 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, Kurokawa 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, Yuile 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 groupings system 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. Lippencott Company, 1992
- Nichols M: Monoclonal antibodies with red cell specificities. In: Moulds, JM, Masouredis 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, Masouredis SP, eds. Monoclonal antibodies. Arlington, Va: American Association of Blood Banks 49-82, 1989
- Tucker EM, Metenier L, Grosclade J, et al: Monoclonal antibodies to bovine blood group antigens. Anim Genet 17:3-13, 1986
- Fulton JE, Briles RW, Lamont SJ: Monoclonal antibody differentiates chicken A 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, Chavey PS, Smith JE: Production, characterization, and applications of a murine monoclonal antibody to dog erythrocyte antigen 1.1. JAVMA 201:10, 1549-52, 1992
- Kohn B, Reitemeyer 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 & Documenti Veterinari, N. 3 (1997), Supplemento, p.

Fabricado sob licença de: Kansas State University RapidVet® é marca registrada da dms laboratories, inc.
RVHC-023

**RapidVet® by DMS
Laboratories, Inc.**

dms laboratories, inc.
3252 South Fair Lane
Tempe, AZ 85282
Tel: (908) 782-3353 / 800 567-4367
www.rapidvet.com



Importador: JMR Trading Ltda / VP Diagnóstico
CNPJ: 11.857.347/0001-71
Nº Registro no MAPA: 117/10-PR
Rua Mandaguari 1752, Pinhais - PR - Brasil, CEP: 83.325-015
Responsável Técnica: Margareth Carvalho S. Agottani (CRMV-PR nº 3288)
SAC: info@vpdiagnostico.com.br www.vpdiagnostico.com.br