

# Imuno-Hemato

## Anti-D (Rho)

Reagente de anticorpos monoclonais IgG/IgM (Blend) para determinação qualitativa de Antígenos D (Rho), fator Rh, nos eritrócitos humanos em lâmina, tubo e microplaca por técnica de aglutinação.

Monoclonal antibodies IgG/IgM (Blend) reagent for qualitative determination of D (Rho) Antigens, Rh factor, in human erythrocytes in slide, tube and microplate by agglutination technique.

Monoclonal antibodies IgG/IgM (Blend) reagent for qualitative determination of D (Rho) Antigens, Rh factor, in human erythrocytes in slide, tube and microplate by agglutination technique.

REF 1055010-D - 10ml

REF 1055050-D - 50ml

REF 1055100-D - 100ml



### PORTUGUÊS

#### IMPORTÂNCIA CLÍNICA

O sistema Rh foi descoberto por Wiener, Landsteiner e Levine em 1940 quando faziam estudos de sensibilização em coelhos com hemácias de macacos Rhesus.

Depois dos抗原os do sistema ABO (A e B), o antígeno D (Rh) é o mais importante抗原o nas rotinas de tipagem sanguínea, uma vez estar ele relacionado ao desenvolvimento da doença hemolítica perinatal, às reações transfusionais hemolíticas e às anemias hemolíticas autoimunes. O fenótipo D negativo ocorre em 15% dos indivíduos brancos e 9 a 10% dos negros.

O Rh é um sistema complexo e comprende atualmente 48抗原os, onde os principais são o D, C/c, E/e. O antígeno D é o mais imunogênico, embora todos os outros possam induzir a produção de anticorpos que estão relacionados com a maioria dos problemas associados à aloimunização por transfusão e gestação.

Alguns indivíduos podem apresentar D negativo quando diretamente testados com anti-soros anti-D, mas quando o teste é prosseguido para a fase de anticonglobulina humana (Soro de Coombs) ocorre uma aglutinação variável. Esses indivíduos foram originalmente chamados de D positivo. Atualmente, o termo D foi substituído por "D fraco", e eles devem ser considerados como indivíduos D (Rh) positivos.

Alguns indivíduos podem apresentar D parcial, caracterizado pela ausência de algum de seus epitópos. Essa categoria de抗ígenos D (Rh) parcial é diferenciada das outras pela presença ou ausência de um ou mais epitópos (DII, DIII, DIV, DV, DVI, DVII, DFR, DBT, RoHan).

O anti-soro Imuno-HEMATO Anti-D (Rh) da WAMA é uma mistura (blend) de anticorpos monoclonais humanos, preparados a partir do sobrenadante de cultura in vitro de células de heterócloríbroma, onde uma linhagem de células secreta anticorpos de classe IgG e outra linhagem secreta anticorpos de classe IgM que reagem especificamente com o antígeno correspondente, oferecendo segurança na determinação da presença ou ausência do antígeno D em glóbulos vermelhos humanos. O anticorpo reage negativamente com eritrócitos que apresentam antígeno D parcial, categoria DVI, com os anticorpos de classe IgM e positivamente com os anticorpos de classe IgG nos testes de Coombs indireto.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

O procedimento do ensaio é baseado no princípio da aglutinação, onde células vermelhas do indivíduo possuindo antígeno D em sua superfície aglutinarão na presença do anti-soro anti-D, indicando um resultado positivo. O teste é considerado negativo quando não aparece aglutinação. Nesses casos o teste deveria ser continuado para pesquisa de antígeno D "fraco".

#### APRESENTAÇÃO DO KIT

REF 1055010-D - 10ml

1. Anti-soro Anti-D (1 x 10 ml)

2. Instruções para uso

REF 1055050-D - 50ml

- 1. Anti-soro Anti-D (5 x 10 ml)
- 2. Instruções para uso

REF 1055100-D - 100ml

- 1. Anti-soro Anti-D (10 x 10 ml)
- 2. Instruções para uso

#### PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REATIVOS

• **ANTI-SORO ANTI-D:** pronto para uso. Contendo uma mistura (blend) de anticorpos monoclonais de classe IgM e IgG anti-antígeno D. Está entre 2 – 8 °C até a data de vencimento impressa na etiqueta do frasco. Armazenamento inadequado prejudica a eficácia do reagente. Contém azida sódica < 0,095% como conservante. Contém também cloreto de sódio, albumina bovina e potencializadores macromoleculares. Fornecido em frascos conta-gotas com volume de 50 µl por gota. NÃO CONGELAR. Somente para uso in vitro.

Obs.: O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização, e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que mantido na temperatura indicada (2 – 8°C).

#### AMOSTRAS

Usar amostra de sangue fresco. Evitar amostras hemolizadas. Se não for possível realizar os testes após a coleta, a amostra deve ser conservada refrigerada entre 2 – 8 °C. De acordo com o anticoagulante utilizado as amostras deveriam ser testadas dentro dos seguintes prazos:

- Heparina ou Oxalato de Sódio : 2 dias
- EDTA ou Citrato de Sódio : 14 dias
- ACD ou CPD : 28 dias

OBS: O armazenamento prolongado da amostra pode causar deterioração do antígeno e resultar em classificação incorreta.

#### MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Técnica em Lâmina: lâmina de vidro, micropipeta de 50 µl e ponteiras ou pipeta Pasteur, vareta misturadora.
- Técnica em Tubo: tubos testes (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm), micropipeta de 50 µl e 1000 µl, ponteiras, centrifuga, solução salina isotônica 0,85 ou 0,9%.
- Técnica em Microplaca: microplaca fundo em "U", agitador de placa, centrifuga de microplaca, micropipeta de 50 µl e ponteira, solução salina isotônica 0,85 ou 0,9%.
- Recipiente para descarte de material.

#### PROCEDIMENTO

Independente da técnica adotada deixar o reagente e as amostras atingir a temperatura ambiente antes de iniciar os testes.

#### I. TÉCNICA EM LÂMINA

1. Sobre uma lâmina de vidro limpa, pingar 1 gota (50 µl) do anti-soro Anti-D (1) e 1 gota (50 µl) de sangue total a ser testado.
2. Homogeneizar uniformemente o reagente e as células sanguíneas usando uma vareta misturadora, sobre uma área de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro.
3. Com leves movimentos de rotação e de inclinação da lâmina verificar a formação de aglutinação dentro de 1 minuto (a reação se inicia em segundos). Reação inespecífica pode ocorrer devido à secagem da mistura de reação ou se a lâmina é aquecida.

#### II. TÉCNICA EM TUBO

1. Preparar uma suspensão a 5% de hemácias lavadas a ser testada em solução salina fisiológica (lavar as hemácias 3 vezes em salina a 0,85% ou 0,9% e, em um tubo de ensaio 12 x 75 mm, pipetar 50 µl das hemácias lavadas + 1 ml de salina. Outros volumes podem ser usados).
2. Em um tubo de ensaio 10 x 75 mm ou 12 x 75 mm marcado pipetar 50 µl da suspensão de hemácias a 5%.
3. Pipetar no mesmo tubo 50 µl do anti-soro Anti-D (1).
4. Homogeneizar através de leve agitação e incubar a temperatura ambiente (15 – 30 °C) por 1 a 15 minutos.
5. Centrifugar a 1.000 RPM (± 100 a 125 g) por 1 minuto.
6. Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação.

#### III. TÉCNICA EM MICROPLACA

1. Preparar uma suspensão a 2-3% de hemácias lavadas a ser testada em solução salina fisiológica (lavar as hemácias 3 vezes em salina a 0,85% ou 0,9% e, em um tubo de ensaio 12 x 75 mm, pipetar 25 µl das hemácias lavadas + 1 ml de salina - outros volumes podem ser usados).
2. Em uma microplaca de fundo em U, pipetar 50 µl da suspensão a 2-3% em cada cavidade da microplaca, de acordo com o número de amostras a serem testadas e o plano de distribuição na placa.
3. Pipetar em cada cavidade 50 µl do anti-soro Anti-D(1).
4. Homogeneizar através de leve agitação, de preferência com um agitador de microplaca, e incubar a temperatura ambiente (15 – 30 °C) por 15 minutos.
5. Centrifugar a microplaca a 140 r.c.f. por 1 minuto.
6. Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação.

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

**REAÇÃO POSITIVA:** visível aglutinação dos eritrócitos, indicando a presença de antígeno D na amostra testada.

**REAÇÃO NEGATIVA:** ausência de aglutinação dos eritrócitos, indicando provável ausência de antígeno D na amostra testada. Neste caso, a pesquisa de antígeno D "fraco" deve ser realizada através do teste de Coombs indireto.

#### TESTE DE COOMBS INDIRETO PARA PESQUISA DE D "FRACO"

Se estiver realizando a técnica em tubo continuar no mesmo tubo a pesquisa de D "fraco", caso contrário siga o seguinte procedimento:

1. Preparar uma suspensão a 5% de hemácias lavadas a ser testada em solução salina fisiológica (lavar as hemácias 3 vezes em salina a 0,85% ou 0,9% e, em um tubo de ensaio 12 x 75 mm, pipetar 50 µl das hemácias lavadas + 1 ml de salina. Outros volumes podem ser usados).
2. Em um tubo de ensaio 10 x 75 mm ou 12 x 75 mm marcado pipetar 50 µl da suspensão de hemácias a 5%.
3. Pipetar no mesmo tubo 50 µl (1 gota) do anti-soro Anti-D (1).
4. Homogeneizar através de leve agitação e incubar a 37°C por 15-30 minutos.
5. Lavar as células 3 vezes em salina a 0,85% ou 0,9%: encher o tubo com salina, ressuspender as células, misturar bem através de leve agitação, centrifugar a 2.000 rpm (800 a 1.000 g) por 1 minuto e desprezar o sobrenadante. Repetir a lavagem 3 vezes.
6. Após desprezar o sobrenadante da última lavagem, pipetar 100 µl (2 gotas) do soro humano poliespecífico de Coombs da WAMA, misturar e centrifugar a 2.000 RPM (800 a 1.000 g) por 1 minuto.
7. Ressuspender delicadamente o botão de hemácias e examinar a presença ou não de aglutinação.

**INTERPRETAÇÃO:** visível aglutinação dos eritrócitos indica a presença de antígeno D "fraco" na amostra testada e deve ser reportado como D(Rho) positivo (D "fraco"). Ausência de aglutinação dos eritrócitos indica ausência de antígeno D na amostra testada e, portanto, D(Rho) negativo.

**ATENÇÃO:** para a realização do teste de pesquisa de antígeno Rh e do Coombs Indireto para D "fraco" deve sempre ser usado um controle Rh. Recomendamos o uso do soro controle Rh da WAMA. A finalidade do uso do soro controle é identificar reações falso-positivas pela presença de anticorpos autoimunes, aglutininas frias ou formação de roleaux. A reação falso-positiva detectada na fase de anticonglobulina humana (Soro de Coombs) indica, geralmente, que as hemácias apresentam o teste de Coombs Direto positivo. Para a correta interpretação do teste com Controle Rh vide bula do reagente.

reações fracas. Em casos extremos, resultados falso-negativos podem ocorrer.

• Os procedimentos descritos são para uso com o soro de Coombs da WAMA. A princípio, soro de Coombs de outros fabricantes pode ser usado, mas o Laboratório deve seguir os procedimentos desses fabricantes. Também o Laboratório deve seguir procedimentos de validação aprovados para demonstrar a compatibilidade desses produtos.

#### PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Os reagentes devem ser conservados entre 2 – 8 °C.
2. A data de validade corresponde ao último dia do mês assinalado nos rótulos dos frascos e da caixa do kit.
3. Deve ser evitado expor os reagentes a temperaturas elevadas, bem como diretamente ao sol.
4. Não congelar nenhum reagente, pois isto causará deterioração irreversível.
5. O Imuno-HEMATO Anti-D (Rh) da WAMA, embora seja derivado de fonte animal, não se pode afirmar que esteja isento de agentes infeciosos. Portanto, recomenda-se tratar todos os reagentes como materiais potencialmente infeciosos, bem como ter o mesmo cuidado no descarte destes materiais.
6. Deixar os reagentes adquirir a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de iniciar os testes.
7. Os reagentes devem ser tampados imediatamente após o uso.
8. Não usar reagentes após a data de validade.
9. Os procedimentos informados são apenas para testes manuais. Ao usar instrumentos automáticos ou semiáutomáticos, deve ser seguido o procedimento que está contido no manual do operador fornecido pelo fabricante do instrumento.
10. Descartar o material conforme regulamentações locais.
11. Utilizar as Boas Práticas de Laboratórios (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

#### TERMO DE GARANTIA

A WAMA Diagnóstica garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A WAMA e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.

#### ENGLISH

#### SUMMARY

The Rh system was discovered by Wiener, Landsteiner and Levine in 1940 when they were studying of sensitization in rabbits with red blood cells of Rhesus monkeys.

After the antigens of the ABO system (A and B), the D antigen (Rh) is the most important antigen in blood typing, once it is related to the development of the perinatal hemolytic disease, hemolytic transfusion reactions, and autoimmune hemolytic anemias. The phenotype D negative occurs in 15% of Caucasians and 9 to 10% of the blacks.

The Rh is a complex system and currently comprises of f4f4 antigens, where the main ones are the D, C/c, E/e. The D antigen is the most immunogenic, although all others may induce the production of antibodies that are related with the majority of the problems associated with alloimmunization by transfusion and pregnancy.

Some individuals may present negative D when directly tested with anti-D antisera, but when the test continues to the human antiglobulin phase (Coombs Serum), variable agglutination occurs. These individuals were originally called D<sup>+</sup> positive. Currently, the term D<sup>+</sup> was replaced by "weak D", and they should be considered as individuals D (Rh) positive.

Some individuals may have partial D antigen, characterized by the absence of some of its epitopes. This category of partial D (Rh) antigens is differentiated one from others by the presence or absence of one or more epitopes (DII, DIII and DIV, DV, DVI, DVII, DFR, DBT, RoHan).

The anti-serum Imuno-HEMATO Anti-D (Rh) from WAMA mixture of human monoclonal antibodies, prepared from the supernatant of in vitro culture of heterohibridoma cells, where a strain of cells secrete IgG antibodies and another strain secretes IgM antibodies, which react specifically with the corresponding antigen, providing assurance in the determination of the presence or absence of the D antigen on human red blood cells. The antibody reacts negatively with erythrocytes that have partial D antigen, category DVI, with the IgM antibodies and positively with the IgG antibodies in indirect Coombs tests.

#### PRINCIPLE OF THE METHOD

The procedure of the assay is based on the principle of agglutination, where red blood cells of individuals possessing D antigen on their surface will agglutinate in the presence of anti-D antiserum, indicating a positive result. The test is considered negative when no agglutination appears. In such cases, the test should continue to search for antigen "weak D".

#### KIT PRESENTATION

REF 1055010-D - 10ml

- 1. Anti-D antiserum (1 x 10 ml)

2. Instructions for use

REF 1055050-D - 50ml

- 1. Anti-D antiserum (5 x 10 ml)

2. Instructions for use

#### REAGENT PREPARATION AND STABILITY

• **ANTISERUM ANTI-D:** ready to use. Containing a blend of IgM and IgG anti-antigen D monoclonal antibodies.

Stable at 2 – 8 °C until expiration date printed on the bottle. Improper Storage affects the effectiveness of the reagent. Contains sodium azide < 0.095% as preservative. Also contains sodium chloride, bovine albumin and extenuating macromolecular architecture. Supplied in dropper bottles with a volume of 50µl per drop. DO NOT FREEZE. For in vitro diagnostic use only.

Note: The kit has the same performance after first use, and is stable until the expiration date described on the label if it is kept in the indicated temperature (2 – 8 °C).

#### SPECIMENS

&lt;p

D antigen in the tested sample.

**NEGATIVE REACTION:** visible agglutination of erythrocytes, indicating the presence of D antigen in the tested sample. In this case, the search for "weak" D antigen must be performed through the indirect Coombs test.

#### INDIRECT COOMBS TEST TO SEARCH FOR "WEAK" D

If you are performing the technique in tube, continue the search for the "weak" D in the same tube; otherwise follow the procedure:  
1. Prepare a suspension in 5% of washed erythrocytes to be tested in physiological saline solution (wash the cells 3 times in 0.85% or 0.9% saline solution, pipette 50µl of washed erythrocytes + 1ml of saline into a 12 x 75 mm test tube. Other volumes can be used).  
2. In a labeled 10 x 75 mm or 12 x 75 mm test tube, pipette 50µl of 5% erythrocytes suspension.  
3. Pipette in the same tube 50µl (1 drop) of the anti-D antiserum (1).  
4. Mix by gentle agitation and incubate at 37°C for 15-30 minutes.  
5. Wash the cells 3 times in 0.85% or 0.9% saline: fill the tube with saline, resuspending the cells, mix well through gentle agitation, centrifuge at 2,000 RPM (800 to 1,000 g) for 1 minute and discard the supernatant. Repeat the washing 3 times.  
6. After discarding the supernatant in the last wash, pipette 100µl (2 drops) of the anti-human polyclonal Coombs serum from WAMA, mix and centrifuge at 2,000 RPM (800 to 1,000 g) for 1 minute.  
7. Gently resuspend the button of erythrocytes and examine for the presence of agglutination.

**INTERPRETATION:** visible agglutination of erythrocytes indicates the presence of "weak" D antigen in the sample tested, and must be reported as D(Rho) positive ("weak" D). Absence of agglutination of erythrocytes indicates absence of D antigen in the tested sample and, therefore, D(Rho) negative.

**CAUTION:** to perform the test searching for Rh antigen and the Indirect Coombs for "weak" D, an Rh control must always be used. We recommend the use of the Rh serum control from WAMA. The purpose for using serum control is to identify false-positive reactions through the presence of autoimmune antibodies, cold agglutinins or formation of royleas. The false positive reaction detected in the human antiglobulin phase (Coombs Serum) generally indicates that the red blood cells are positive for in the Direct Coombs test. For the correct interpretation of the test with Rh Control, see the reagent package insert.

#### TEST SPECIFICITY:

The performance of the **Imuno-HEMATO Anti-D (Rho)** was evaluated in 1125 samples collected with the recommended anticoagulants. The evaluation showed 100% specificity for each reagent when compared with the results of a Kit used on the market.

#### PRECISION OF THE TEST:

##### a. Intra-Assay Precision

2 samples were selected from quality control (1 positive and 1 negative) to perform the repeatability test. 20 repetitions of the test was done by the same operator on the same day.

According to the tests carried out, it was verified that the kit **Imuno-Hemato Anti-D (Rho)** repeated satisfactorily the results with the samples to be tested under the same conditions.

##### b. Inter-Assay Precision

20 samples were selected from quality control (16 negatives and 4 negatives) to perform the test of reproducibility: 3 tests were performed with the same samples in different days and technicians and with two different lots.

According to the tests carried out, it was verified that the kit **Imuno-Hemato Anti-D (Rho)** repeated satisfactorily the results with the samples to be tested even under different conditions.

#### LIMITATIONS OF USE

False-positive and negative results can occur due to contamination of the test materials, inadequate concentration of suspensions of cells, inadequate incubation time or temperature, or errors of procedure.

The centrifugation times mentioned are recommendations. A appropriate centrifugation time must be determined by each laboratory, and will be the one that produces the strongest reaction of the antibody with the antigen in positive reactions, and will also to allow for easy resuspension of RBC buttons.

Weaker reactions will occur more frequently with stored blood than with fresh blood.

• Positive and negative control should be used when carrying out the tests.

• In the glass slide method, "weak" D antigens and certain types of partial D may not be recognized.

Improper Storage affects the effectiveness of the reagent.

• It's recommended to always use an Rh control to avoid false positive results.

• Red blood cells coated with alloantibodies or auto-antibodies, whose cells are positive in the direct antiglobulin test (Coombs test) can give weak responses. In extreme cases, false-negative results may occur.

The described procedures are for use with the Coombs sera of **WAMA**. As a principle, Coombs sera from other manufacturers may be used, but the Laboratory must follow the procedures of these manufacturers. Also the laboratory must follow approved validation procedures to demonstrate the compatibility of these products.

#### PRECAUTIONS AND WARNINGS

- 1. The reagents should be kept between 2 - 8°C.
- 2. The expiry date refers to the last day of the month indicated on the labels of the vial and of the kit box.
- 3. Avoid exposing the reagents to high temperatures and direct sunlight.
- 4. Do not freeze the reagent, as this may cause irreversible damage.
- 5. The **Imuno-HEMATO Anti-D (Rho)** from **WAMA**, though derived from animal source, cannot assume to be free of infectious agents. Therefore, it is recommended to treat all reagents as potentially infectious, as well as having the care in disposing of these materials.
- 6. Allow the reagents to reach the room temperature (20 - 25°C) before starting the test.
- 7. The reagents must be capped immediately after use.
- 8. Do not use the reagent after the expiration date.
- 9. The procedures are only for manual testing. When using automatic or semi-automatic instruments, procedure contained in the operator's manual provided by the instrument manufacturer must be followed.
- 10. Discard the material following local regulations.
- 11. Use the Good Laboratory Practices (GLPs) in storage, handling and disposal of materials.

#### WARRANTY

**WAMA Diagnóstica** guarantees the exchange of the diagnostic kit, provided it is within the expiration date and is proven by its technical support that there were no technical mistakes in the execution, handling and storage of this product. **WAMA** and its distributors are not liable for failures on the performance of the kits under these conditions.

## ESPAÑOL

#### IMPORTANCIA CLÍNICA

El sistema Rh fue descubierto por Wiener, Landsteiner y Levine en 1940, cuando estaban estudiando sensibilización en conejos con glóbulos rojos de monos Rhesus. Después de los抗原s del sistema ABO (A y B), el antígeno D (Rh) es el antígeno más importante en tipo de sangre, una vez que se relaciona con el desarrollo de la enfermedad hemolítica perinatal, reacciones de transfusión hemolíticas, y anemias hemolíticas autoinmunes. El fenotipo D negativo se produce en 15% de los caucásicos y a 10% de los negros.

El Rh es un sistema complejo y comprende actualmente 48 antígenos, donde los principales son la D, C, Cc, E, Ee. El antígeno D es el más inmunogénico, aunque todos los otros pueden inducir la producción de anticuerpos que se relacionan con la mayor parte de los problemas asociados con la aloinmunización por transfusión y el embarazo.

Algunos individuos pueden presentar D negativo cuando se prueban directamente con Antisueros anti-D, pero cuando la prueba continúa a la fase antiglobulina humana (suero de Coombs), se produce aglutinación de las variables. Estos individuos fueron originalmente llamados D<sup>v</sup> positivo. Actualmente, el término D<sup>v</sup> fue sustituido por "débil D", y que deben ser considerados como individuos D (Rh) positivo.

Algunos individuos pueden tener antígeno D parcial, que se caracteriza por la ausencia de algunos de sus epitopos. Esta categoría de antígenos D (Rh) parciales se diferencia uno de los otros por la presencia o ausencia de uno o más epitopos (DII, DIII y DIV, DV, DVI, DVII, DFR, DBT, RoHar).

El antisuero **Imuno-HEMATO Anti-D (Rho)** de **WAMA** es una mezcla de anticuerpos monoclonales humanos, preparado a partir del sobrenadante del cultivo *in vitro* de células heterohibridoma, donde una cepa de células secretan anticuerpos IgG y otra cepa secreta anticuerpos IgM, que reaccionan específicamente con el antígeno correspondiente, lo que garantiza en la determinación de la presencia o ausencia del antígeno D de glóbulos rojos en humanos. El anticuerpo reacciona negativamente con eritrocitos que tienen antígeno D parcial, categoría DVI, con anticuerpos IgM y positivamente con los anticuerpos IgG en las pruebas de Coombs indirecta.

#### PRINCIPIO DEL MÉTODO

El procedimiento del ensayo se basa en el principio de aglutinación, donde las células rojas de los individuos que poseen antígeno D en su superficie aglutinarán en presencia del antisuero anti-D, indicando un resultado positivo. La prueba se considera negativa cuando no aparece ninguna aglutinación. En tales casos, la prueba debe continuar con la búsqueda de antígeno "D débil".

#### PRESENTACIÓN DEL KIT

##### REF 1055010-D - 10ml

1. Antisuero Anti-D (1 x 10 ml)
2. Instrucciones de uso

##### REF 1055050-D - 50ml

1. Antisuero Anti-D (5 x 10 ml)
2. Instrucciones de uso

#### REF 1055100-D - 100ml

1. Antisuero Anti-D (10 x 10 ml)
2. Instrucciones de uso

#### PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE REACTIVOS

- **ANTISUERO ANTI-D:** Listo para usar. Que contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales de clase IgM e IgG antígeno anti-D. Estable a 2 - 8 °C hasta la caducidad impresa en el envase. Almacenamiento inadecuado afecta a la eficacia del reactivo. Contiene azida de sodio < 0,095 % como conservante. También contiene cloruro de sodio, albúmina bovina macromoleculares y atenuantes. Se suministra en frascos de goteo con un volumen de 50µl por gota. NO CONGELAR. Para uso diagnóstico *in vitro*.

Nota: El kit mantiene el mismo rendimiento después de la primera utilización, y es estable hasta la fecha de vencimiento descrita en la etiqueta, siempre que se mantenga a la temperatura indicada (2 - 8°C).

#### ESPECÍMENES

Utilice muestra de sangre fresca. Evite muestras hemolizadas.

Si no es posible realizar las pruebas después de la recolección, la muestra debe mantenerse refrigerada a una temperatura de 2 - 8 °C. De acuerdo con el anticoagulante usado, las muestras deben ser probadas en los siguientes plazos:

- |                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| • Heparina o oxalato de sodio | : 2 Días  |
| • Ráxifina o Clorato de sodio | : 14 Días |
| • ACD o CPD                   | : 28 Días |

Nota: El almacenamiento a largo plazo de la muestra puede provocar el deterioro de los antígenos y resultado de clasificación incorrecta.

#### MATERIAL NECESARIO, PERO NO SUMINISTRADO

- Técnica de lámina de vidrio: láminas vidrio, micropipetas 50µl y puntas o pipeta Pasteur, varilla de mezcla.
- Técnica de Tubo de ensayo: tubos de ensayo (10 x 75 mm o 12 x 75 mm), micropipeta 50µl y puntas, centrífuga, isotónica solución salina 0,85 o 0,9 %.
- Técnica de Microplacas: microplacas en "U", agitador de microplacas, centrifuga, 50µl micropipeta y puntas, solución salina isotónica 0,85 o 0,9 %.
- Recipiente para descarte de material.

#### PROCEDIMIENTO

Independientemente de la técnica empleada, deje que el reactivo y la muestra alcance la temperatura ambiente antes de comenzar las pruebas.

#### I. TÉCNICA DE LÁMINA DE VIDRIO

1. En una lámina de vidrio, gotear 1 gota (50µl) de antisuero anti-D (1) y 1 gota (50µl) de sangre entera a ser probado.

2. Mezclar uniformemente el reactivo y células sanguíneas usando una varilla de mezcla, en un área de aproximadamente 2.5 cm de diámetro.

3. Con suaves movimientos de rotación y inclinación la lámina de vidrio para verificar por formación de aglutinación dentro de 1 minuto (la reacción comienza en segundos). Reacción inespecífica puede presentarse debido al secado de la mezcla de reacción o si la lámina se calienta.

#### II. TÉCNICA DE TUBOS

1. Preparar una suspensión en 5% de eritrocitos lavados para ser sometidos a ensayo en solución salina fisiológica (lavan las células 3 veces en solución salina 0,85 o 0,9 %), pipetear 50µl de eritrocitos lavados + 1 ml de solución salina en un tubo de ensayo 12 x 75 mm. Otros volúmenes pueden ser utilizados).

2. En un tubo de ensayo etiquetado de 10 x 75 mm o 12 x 75 mm , pipetear 50µl de suspensión de eritrocitos a 5%.

3. Pipetear en el mismo tubo 50µl del antisuero anti-D.

4. Homogeneizar por agitación suave e incubar a temperatura ambiente (15 - 30°C) por 1 a 15 minutos.

5. Centrifugar a 1,000 RPM (± 100 a 125 g) durante 1 minuto.

6. Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación.

#### III. TÉCNICA DE MICROPLACAS.

1. Preparar una suspensión de 2-3% de eritrocitos lavados para ser sometidas a ensayo en solución salina fisiológica (lavan las células 3 veces en solución salina 0,85 o 0,9 %), en un tubo de 12 x 75 mm , pipetear 25µl de eritrocitos lavados + 1ml de solución salina - otros volúmenes pueden ser usados.

2. En una microplaca con fondo U, pipetear 50µl de la suspensión de 2-3% en cada cavidad de la placa de microtitulación, según el número de muestras que deberán ser probadas y el plan de distribución a bordo.

3. Pipeta en cada cavidad 50µl del antisuero anti-D.

4. Mezcla por agitación suave, preferentemente con un agitador de microplacas, e incuba a temperatura ambiente (15 - 30 °C) por 15 minutos.

5. Centrifugar la microplaca 140 r.c.f. por 1 minuto.

6. Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

**REACCIÓN POSITIVA:** Aglutinación de los eritrocitos, lo que indica la presencia de

antígeno D en la muestra ensayada.

**REACCIÓN NEGATIVA:** Aglutinación de los eritrocitos, lo que indica la presencia de antígeno D en la muestra ensayada. En este caso, la búsqueda de antígeno "débil" D se debe realizar a través de la prueba de Coombs indirecta.

#### TEST DE COOMBS INDIRECTO A LA BÚSQUEDA DE "DEBIL" D

Si se realiza la técnica en el tubo, continúe la búsqueda de los "débiles D" en el mismo tubo, en caso contrario, siga este procedimiento:

1. Preparar una suspensión en 5% de eritrocitos lavados para ser sometidos a ensayo en solución salina fisiológica (lavan las células 3 veces en solución salina 0,85 % o 0,9 %), pipetear 50µl de eritrocitos lavados + 1ml de solución salina en un tubo de ensayo 12 x 75 mm . Otros volúmenes pueden ser utilizados).
2. En un tubo de ensayo etiquetado de 10 x 75 mm o 12 x 75 mm , pipetear 50µl de suspensión de eritrocitos a 5%.
3. Pipetear en el mismo tubo 50µl (1 gota) del antisuero anti-D (1).
4. Homogeneizar por agitación suave e incubar a 37°C por 15-30 minutos.
5. Lavar las células 3 veces en solución salina al 0,85 % o 0,9 %: llenar el tubo con solución salina, resuspender las células, mezclar bien a través de una suave agitación, centrifugar a 2,000 RPM (800 a 1,000 g) durante 1 minuto y desechar el sobrenadante. Repita el lavado 3 veces.
6. Despues de descartar el sobrenadante en el último lavado, pipetear 100 µl (2 gotas) de la anti-humano bajo suero de Coombs de **WAMA**, mezclar y centrifugar a 2,000 RPM (800 a 1,000 g) durante 1 minuto.
7. Resuspender suavemente el botón de eritrocitos y examinar la presencia de aglutinación.

**INTERPRETACIÓN:** aglutinación visible de los eritrocitos indica la presencia del antígeno "débil D" en la muestra ensayada, y debe ser declarada como D (Rh) positivo ("débil D"). Ausencia de aglutinación de los eritrocitos indica ausencia de antígeno D en la prueba de la muestra y, por lo tanto, D (Rh) negativo.

**PRECAUCIÓN:** Para realizar la prueba en busca de antígeno Rh y Coombs indirecto para "débil" D, un control de Rh debe utilizarse siempre. Recomendamos el uso del suero de control Rh de **WAMA**. Lo propósito para el uso de suero de control es identificar reacciones falsos-positivos a través de la presencia de anticuerpos autoinmunes, aglutininas frías o formación de royleas. La reacción falsa positiva detectada en la fase antiglobulina humana (suero de Coombs) generalmente indica que los glóbulos rojos son positivos en el test de Coombs directo. Para la correcta