



AGROLABO

User Manual RapidVet-H Canine DEA 1

AGROLABO SpA Diagnostic Division
Via Masero 59, 10010 Scarmagno (TO) - Italy
Tel. +39 0125 731111 - Fax +39 0125 731190
www.agrolabo.it - agrolabo@agrolabo.it

RapidVet-H Canine DEA 1

Determinazione del gruppo sanguigno del cane

IMPORTANTE:

Leggere attentamente le istruzioni. Il materiale liofilizzato nel pozzetto "Positive Control" e nel pozzetto "Patient test" non è lo stesso. I risultati sono ottenuti usando solo il sangue del campione da analizzare in entrambi i pozzetti.

DESCRIZIONE E MODALITA' D'USO

E' noto che i cani non possiedono isoanticorpi verso gruppi sanguigni incompatibili, di conseguenza un'iniziale trasfusione incompatibile viene generalmente ben tollerata. Ma nel valutare le potenziali e future modalità della tecnica trasfusionale in ambito veterinario bisogna tenere conto del fatto che in seguito ad una trasfusione incompatibile gli anticorpi si formano in soli 5-7 giorni ed hanno lunga durata nel cane trasfuso e potrebbero determinare reazioni cliniche di rilievo in seguito a successive trasfusioni incompatibili. Inoltre nelle femmine lo sviluppo degli anticorpi per sensibilizzazione, risultante da trasfusioni di gruppi sanguigni incompatibili, deve essere valutato negli animali ottenuti per incrocio. Siccome gli anticorpi sono già presenti nel colostro, femmine con isoanticorpi verso un determinato gruppo sanguigno non dovrebbero essere incrociate con maschi di tale gruppo sanguigno, soprattutto se la femmina allatterà i suoi cuccioli. I piccoli infatti svilupperebbero isoeritrolisi e potrebbero essere suscettibili a malattia o addirittura morire a causa di anemia emolitica.

Otto antigeni specifici sono stati identificati sulla superficie degli eritrociti dei cani. Il gruppo sanguigno del cane accettato a livello internazionale, il DEA (Dog Erythrocyte Antigen), è basato su questi antigeni. Esso correntemente caratterizza otto comuni gruppi sanguigni, gli antigeni DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 6, DEA 7 e DEA 8.

DEA 1.1 e 1.2 sono i più importanti gruppi sanguigni e sono considerati parte del sottogruppo DEA 1. Studi scientifici recenti (utilizzando immunocromatografia e citometria di flusso) hanno evidenziato che tutti i componenti del sottogruppo DEA 1 (DEA 1.1, DEA 1.2 e probabilmente anche DEA 1.3) non sono gruppi sanguigni diversi, ma differenti espressioni dello stesso antigene presente sulla superficie dei globuli rossi. Uno di questi studi eseguito su 66 cani ha evidenziato che 46 soggetti, pari al 70% del totale, erano DEA 1 positivi.

Idealmente, tutto il sangue da utilizzare per le trasfusioni dovrebbe essere di gruppo DEA 1 negativo. Alcuni cani ottenuti da incroci mirati, come la razza Greyhounds, sono particolarmente adatti come donatori di sangue in quanto presentano bassa frequenza degli antigeni DEA 1 e DEA 7. Tuttavia fino al momento in cui la concezione di una banca canina del sangue non sarà largamente accettata, rendendo così disponibile sangue certificato, la tecnica della trasfusione non avrà largo sviluppo. Tenendo in considerazione che esiste un certo numero di soggetti in cui si verificano reazioni di autoagglutinazione e che con cani molto anemici si potrebbero ottenere risultati di tipizzazione non certi, la determinazione del gruppo sanguigno prima del verificarsi di un'emergenza clinica è consigliata. In questo modo identificando ogni cane come DEA 1 positivo o negativo fin dalla nascita si semplificherebbe notevolmente la scelta per future trasfusioni e/o incroci.

Un cane con gruppo sanguigno DEA 1 positivo può ricevere sangue di entrambi i tipi: DEA1 positivo e DEA 1 negativo. Un cane con gruppo DEA 1 negativo può ricevere solo sangue rigorosamente DEA 1 negativo. Si intende quindi utilizzare il Kit RapidVet-H Canine DEA 1 per determinare il gruppo sanguigno del cane e classificare gli animali come appartenenti al gruppo DEA 1 positivo o negativo.

PRINCIPIO DEL TEST

Il kit RapidVet-H Canine DEA 1 è basato su una reazione di agglutinazione che avviene quando un eritrocita che possiede l'antigene DEA 1 sulla sua membrana cellulare interagisce con un anticorpo monoclonale murino specifico per DEA 1 liofilizzato sulla carta. L'anticorpo monoclonale viene ricostituito con il diluente e mescolato con il sangue intero proveniente dal paziente. Tutti gli eritrociti DEA 1 positivi reagiscono con l'anticorpo causando l'agglutinazione. L'anticorpo è completamente inerte con tutti gli eritrociti DEA 1 negativi. I risultati sono interpretabili visivamente.

ATTENZIONE: Un certo numero di pazienti presenta una reazione di auto-agglutinazione eritrocitaria di vario grado dovuta a fattori serici.

Il test RapidVet-H Canine DEA 1 fornisce un pozzetto senza reagenti da usare per il riconoscimento di tali pazienti ("Auto-Agglutination Saline Screen").

Se il paziente presenta tale reazione, non sarà possibile tipizzarlo senza prima separare il siero e lavare i restanti eritrociti prima dell'esecuzione del test. Il lavaggio si effettua centrifugando il campione di sangue intero per 5 minuti a 2000 rpm. Si preleva il surnatante e si aggiunge uguale quantità di soluzione fisiologica.

Nel caso fosse ancora presente auto-agglutinazione si può ripetere il lavaggio.

COMPONENTI DEL KIT

- Carte di agglutinazione. Ogni carta ha 3 pozzetti identificati come "Auto-Agglutination Saline Screen", "Positive Control" e "Patient Test". Le carte sono sigillate individualmente in sacchetti di polietilene contenente un sacchetto di dissecante. Le carte devono essere conservate a temperatura ambiente (+20-25°C).
- Flacone di diluente: il flacone contiene 0,02 mol/L di tampone fosfato salino a pH 7,4 e dispensa circa 50 µl/goccia. Conservare il flacone a temperatura ambiente (+20-25°C).
- Sacchetto con pipette e bacchette: 1 pipetta e 3 bacchette per test.

Materiale richiesto non fornito: nessuno.

Preparazione dei reattivi: nessuna.

CONSERVAZIONE E SCADENZA

La carta di agglutinazione è stabile a temperatura ambiente (+20-25°C) per un periodo di 19 mesi dalla data di produzione. Sul retro di ogni carta è impressa la data di scadenza.

Il diluente è stabile per 24 mesi dalla data di produzione. La validità del reagente è indicata nell'etichetta del flacone.

N.B.: Ogni kit RapidVet-H Canine DEA 1 riporta una data di scadenza che è quella del componente con la validità più breve. Altri componenti possono avere una data di scadenza più lunga ma il loro utilizzo con componenti di altri kit è sconsigliato.

CAMPIONE

Utilizzare sangue intero di cane con anticoagulante (EDTA).

È possibile conservare i campioni in frigorifero (+2-8°C), ma si raccomanda di testare i campioni di sangue entro max 5 giorni dal prelievo.

PROCEDURA D'ANALISI

1. Prelevare un minimo di 0,4 ml di sangue dal paziente con una siringa contenente EDTA come anticoagulante. Il test richiede solo 150 µl di sangue intero.
2. Rimuovere la carta dal sacchetto di plastica, scrivere il nome del cane e la data del test e posizionare la carta su una superficie piana.
3. Dispensare 1 goccia di diluente (50 µl) nel pozzetto segnato come "Auto-Agglutination Saline Screen".
4. Aspirare una piccola quantità del campione del paziente nella pipetta di plastica e depositare 1 goccia (50 µl) nel pozzetto denominato "Auto-Agglutination Saline Screen". Questo pozzetto non contiene reagenti. Usando una bacchetta, distribuire e mescolare il materiale dentro il pozzetto per circa 10 secondi. Buttare la pipetta e la bacchetta in appositi contenitori. (Per il corretto uso della pipetta guardare "NOTA"). Se non si osserva agglutinazione nel pozzetto "Auto-Agglutination Saline Screen" continuare la procedura. Se si osserva auto-agglutinazione procedere con il lavaggio dei globuli rossi come indicato precedentemente (paragrafo Principio del test) prima di tipizzare il campione.
5. Dispensare 1 goccia di diluente (50 µl) in ciascuno dei rimanenti pozzetti. Il diluente è necessario per la ricostituzione del materiale liofilizzato.
6. Aspirare una piccola quantità del campione del paziente nella pipetta di plastica e depositare 1 goccia (50 µl) nel pozzetto "Patient Test" e 1 goccia nel pozzetto "Positive Control". Usando una nuova bacchetta per ogni pozzetto, distribuire e mescolare il materiale esercitando una leggera pressione per circa 10 secondi. Smaltire la pipetta e le bacchette in appositi contenitori.
7. Ruotare delicatamente la carta al fine di consentire il mescolamento dei reagenti presenti nei pozzetti, avendo cura di evitare cross-contaminazione tra i diversi pozzetti.
8. Leggere il risultato del test dopo 1 minuto, avendo cura di posizionare la carta con un angolo di 20-30° per fare in modo che l'eccesso di sangue sia ad una estremità del pozzetto. Verificare se è avvenuta agglutinazione nel pozzetto "Patient Test".

NOTA: Uso della pipetta: prendere la pipetta tra le dita, dalla parte chiusa e più larga ed esercitare una pressione. Tenere il campione in posizione verticale e mettere la parte aperta della pipetta sulla superficie del campione. Ridurre la pressione delle dita in modo da far salire il campione all'interno. Tenendo la pipetta in posizione verticale posizionarsi direttamente sul pozzetto nel quale il campione deve essere dispensato. Schiacciare delicatamente in modo che solo 1 goccia cada all'interno del pozzetto (50 µl). La pipetta è predisposta per l'erogazione di una piccola quantità eccedente i 50 µl per compensare la quantità di campione trattenuta dalla bacchetta. Usare ogni pipetta e ogni bacchetta una sola volta. In nessun caso devono essere riutilizzate in quanto potrebbero verificarsi cross-contaminazioni che potrebbero causare risultati non attendibili.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Se il test è stato eseguito in modo corretto, nel pozzetto "Positive Control" saranno visibili grosse agglutinazioni.

NOTA: Il pozzetto "Positive Control" serve per verificare la corretta esecuzione del test e non ha altri scopi. Il materiale liofilizzato all'interno NON è lo stesso materiale all'interno del pozzetto "Patient Test".

Se non c'è agglutinazione visibile nel pozzetto "Patient Test", il soggetto è DEA 1 negativo. Se il campione del paziente mostra grosse agglutinazioni nel pozzetto "Patient Test" il soggetto è DEA 1 positivo. L'aspetto dell'agglutinazione può essere di diverso grado di intensità

da debole (DEA 1 pos +1) a forte (DEA 1 pos +4) come indicato in basso nella figura. Questo perché al contrario dell'uomo, ogni cane può avere più di un gruppo sanguigno: gli eritrociti portano gli antigeni per ognuno di tali gruppi. Quindi è possibile che un animale possa avere sugli eritrociti meno determinanti antigenici di un animale il cui gruppo sanguigno primario sia solo il gruppo DEA 1.

Se il paziente è molto anemico, la forma degli aggregati potrà essere in forma di piccole aggregazioni simili a capocchie di spillo, piuttosto che di grosse agglutinazioni.

La velocità di agglutinazione e le dimensioni degli aggregati nelle cellule di un paziente DEA 1 positivo possono essere diverse rispetto a quanto si verifichi nel pozzetto "Positive Control".

Ogni fine granulazione che si possa sviluppare dopo 1 minuto nel pozzetto "Patient Test" non deve essere considerata.

LIMITI DELLA PROCEDURA

1. Per ottenere risultati attendibili è necessario che la procedura sia seguita accuratamente.
2. Usare una sola pipetta per dispensare il campione e una nuova bacchetta per ogni pozzetto. Il loro riutilizzo potrebbe causare cross-contaminazioni e risultati non attendibili.
3. La stabilità dei componenti del kit è variabile. Conservare i componenti come indicato sulle etichette. Non usare nessun componente dopo la data di scadenza. L'utilizzo di materiale scaduto può causare inattendibilità dei risultati.
4. Il diluente è fornito nel flacone con contagocce per minimizzare eventuali contaminazioni batteriche o di altro tipo. Non devono essere utilizzati altri diluenti provenienti da altre fonti.
5. Prelevare sempre un minimo di 0,4 ml di sangue nella provetta contenente EDTA. Una quantità minore di sangue causerebbe una elevata concentrazione di EDTA nel campione che deve essere testato.

RapidVet-H Canine DEA 1

Canine Blood Group Determination

IMPORTANT NOTE:

Please read the instructions carefully. The material lyophilized in the "Positive Control" and "Patient Test" wells is not the same. Test results are obtained using only the patient blood sample in both wells.

DESCRIPTION AND INTENDED USE

While it is broadly true that dogs do not possess isoantibodies to incompatible blood groups and thus will generally tolerate well an initial incompatible transfusion, sound practice of veterinary medicine dictates that, except in an emergency, incompatible transfusions be avoided. The half life of the transfused incompatible cells will be quite short and, thus, the intended therapeutic result may not even be attained. Also, the potential future needs of the canine patient must be considered. Antibodies resulting from a transfusion of incompatible blood may form in only 5 to 7 days and will have long-term viability. This eliminates the option of using incompatible blood in a future emergency situation. In addition, antibodies developed in bitches by sensitization resulting from transfusion of incompatible blood groups must be of special concern to breeders. Since antibodies are present in the colostrum, females with isoantibodies to a certain blood group should not be crossed with males of that blood group especially if they are expected to nurse the resulting puppies. The nursing puppies will develop isoerythrolysis and may be susceptible to disease or even die due to hemolytic anemia.

Eight specific antigens have been identified on the surface of the canine erythrocytes. The internationally accepted canine blood group system, the "DEA" (Dog Erythrocyte Antigen), is based on these antigens. It currently characterizes eight common blood groups, the antigens DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 6, DEA 7 and DEA 8.

DEA 1.1 and 1.2 are the most significant blood factors in the dog and are considered as a part of DEA 1 subgroup. Recent scientific studies (based on immunochromatography and flow cytometry) have shown that all the components of DEA 1 subgroup (DEA 1.1, DEA 1.2 and maybe also DEA 1.3) are not different blood groups, but different expressions of the same antigen present on the erythrocyte surface. One of these studies carried out on 66 dogs has shown that 46 patients (70% of the total) were DEA 1 positive.

Ideally, all transfused blood would be DEA 1 negative. Certain breeds such as the Greyhounds are particularly suitable as blood donors because of a low frequency of DEA 1 and DEA 7 antigens. However, until the concept of a canine blood bank is widely accepted thus making certified blood available, the transfusion technique will not be widely developed. Because a number of dogs auto-agglutinate and because a very anemic dog may give equivocal results, typing prior to an urgent need for the information is indicated. Identifying a particular dog as DEA 1 positive or negative at birth greatly simplifies future decision making.

A DEA 1 positive dog can receive both DEA 1 positive and negative blood.

A dog that is DEA 1 negative can receive only DEA 1 negative blood.

RapidVet-H Canine DEA 1 kit is intended for identifying blood group in dogs and classifying dogs as DEA 1 positive or DEA 1 negative.

TEST PRINCIPLE

The RapidVet-H Canine DEA 1 assay is based on the agglutination reaction that occurs when an erythrocyte which contains a DEA 1 antigen on its surface membrane interacts with a murine monoclonal antibody proven to be specific to DEA 1 which is lyophilized on the Test Card.

The monoclonal antibody is reconstituted with a diluent and is thoroughly mixed with whole blood from the patient. All DEA 1 positive erythrocytes react with the antibody causing agglutination. The antibody is completely nonreactive with all DEA 1 negative erythrocytes. The results are visually identified.

WARNING: A certain number of canine patients exhibit auto-agglutination of varying degrees due to serum factors that cause agglutination of the patient's own red cells.

The RapidVet-H Canine DEA 1 provides a reagent-free well to be used for recognition of such patients ("Auto-Agglutination Saline Screen").

If a patient exhibits this under test conditions, it will not be possible to definitively type this patient without separating the serum and serially washing the remaining red cells before performing the test. Red blood cell washing is carried out by centrifuging the sample at 2000 rpm for 5 minutes. After centrifugation, the supernatant is collected and the same volume of physiologic solution is added. Then, the operator must suspend the sample again and check if agglutination still appears. If so, he has to repeat the washing procedure again.

KIT COMPONENTS

- Agglutination Test Cards. Each card has 3 visually defined wells identified as "Auto-Agglutination Saline Screen", "Positive Control", "Patient Test". The cards are packaged individually in sealed polyethylene sleeves each containing a desiccant bag. Store at room temperature (+20-25°C).
- Diluent bottle. The clear plastic bottle contains 0.02 mol/mL phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4. The dropping tip dispenses 50 µL. Store at room temperature (+20-25°C).
- 1 bag with pipette and stirrers: 1 pipette and 3 stirrers for each test.

Materials required but not provided: none.

Reagent preparation: none.

STORAGE AND SHELF LIFE

The agglutination Test Cards are stable at room temperature (+20-25°C) for a period of 19 months from date of manufacture. The expiry date is printed on the back of each card.

The diluent is stable for 24 months from the date of manufacture. The validity of the reagent is indicated on the label.

Note: Each RapidVet-H Canine DEA 1 kit has an expiry date which is that of the component with the shortest validity. Other components may have a longer expiry date but their use with components of other kits should not be performed.

SAMPLE

Use canine whole blood with anticoagulant (EDTA).

Samples can be stored in the refrigerator (+2-8°C). It is recommended to perform the test within max 5 days after drawing.

TEST PROCEDURE

1. Draw minimum 0.4 ml blood from the patient into a syringe containing EDTA as an anticoagulant. The assay requires only 150 µl of whole blood.
2. Remove the Test Card from its plastic sleeve, write the name of the dog and test date on the card, and place the Test Card on a flat surface.
3. Add 1 drop of diluent (50 µl) from the dropping bottle into the well marked as "Auto-Agglutination Saline Screen".
4. Aspirate a small amount of patient sample into the pipette and release 1 drop (50 µl) into the well marked "Auto-Agglutination Saline Screen". This well does not contain reagents. Using a stirrer, distribute and mix the materials inside the well for about 10 seconds. Dispose the pipette and the stirrer in appropriate containers. (See "Note" for correct use of the pipette). If no agglutination is observed in the "Auto-Agglutination Saline Screen well", continue the procedure. If auto-agglutination is observed, wash the cells as indicated above before proceeding. Dispose the pipette and the stirrers in appropriate containers.
5. Add 1 drop of diluent (50 µl) from the dropping bottle into each of the remaining wells. The diluent is required for reconstitution of the lyophilized reagents.
6. Aspirate a small amount of patient sample into a pipette and release 1 drop (50 µl) into the well marked "Patient Test", and 1 drop into the well marked "Positive Control". Using a new stirrer for each well, distribute and mix the material by gentle pressure for about 10 seconds.
7. Gently turn the card to allow the reagents on the wells to mix, taking care to avoid cross contamination among the wells.
8. Set the card at a 20-30° angle to allow excess blood to run to the bottom of the wells and read the results after 1 minute. Check for agglutination in the "Patient Test" well.

NOTE: Use of the pipette: Hold the plastic tube between your fingers with the closed and widest side and apply pressure. Hold the specimen tube vertically and place the open end of the plastic tube on the surface of the specimen. Reduce finger pressure to draw up the sample. Hold the pipette in a vertical position directly over the well to which the sample is to be delivered. Squeeze gently and allow one free drop to fall into the well (50 µl). The pipette is designed to expel slightly in excess of 50 µl to compensate for a small amount of specimen retained by the stirrer. Use each pipette only once, then discard. Under no circumstances should the pipette be used more than once as cross-contamination can occur causing inaccurate test results.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

If the assay has been performed correctly, visible, large spots agglutination will be visible in the well marked "Positive Control".

NOTE: The "Positive Control" well has no other purpose than to control the correct performance of the test. The material lyophilized in "Positive Control" well is NOT the same as that in "Patient Test" well.

If no agglutination is visible in the well marked "Patient Test", the dog is DEA 1 negative. If the patient sample shows large agglutination in the well marked "Patient Test", the dog is DEA 1 positive. The appearance of agglutination may be different according to the intensity: from weak (DEA 1 pos +1) to strong (DEA 1 pos +4), as it is shown in the picture below.

This is due to the fact that unlike humans, each dog may have more than one primary blood type: the erythrocytes carry antigens for each of these groups. Therefore, it is possible that a dog can have less antigenic determinants on the erythrocyte surface than a dog whose primary blood type is DEA 1.

If the patient is very anemic, the pattern of agglutination may be in the form of discrete, small aggregations each like the head of a large pin rather than large agglutination. The speed of agglutination and the size of the clumps of cells of a DEA 1 positive patient may be different from those appearing in the "Positive Control" well.

Any fine, granular appearance developing after 1 minute in the "Patient Test" well should be disregarded in determining the results.

LIMITS OF THE PROCEDURE

1. To obtain reliable results it is essential that correct procedure is followed.
2. Always use a new dispensing pipette for each specimen and a new stirrer for each well. Reusing any device will cause cross-contamination and unreliable results.
3. The stability of the individual components of the kit varies. Store the components as indicated on the labels. Do not use any component after the expiration date. Use of expired materials may cause unreliable results.
4. The diluent is supplied in a vial with dropper to minimize any bacterial or other contamination. Diluent from other sources in the laboratory should not be used.
5. Always draw minimum 0.4 ml of blood in a syringe or tube containing EDTA. A smaller amount will cause too high concentration of EDTA in the sample to be tested.

ESEMPIO DI RISULTATI
EXAMPLE OF RESULTS

Auto-Agglutination

RapidVet-H
 (Canine DEA 1)

Dog _____ Date _____



Auto-Agglutination Saline Screen



Positive Control



Patient Test

RHHC-001

A Product of AGROLABO S.p.A.
 Via Masero, 10010 Scarmagno (TO) Italy
 RapidVet is a trademark of dms laboratories, inc.

DEA negative sample

RapidVet-H
 (Canine DEA 1)

Dog _____ Date _____



Auto-Agglutination Saline Screen



Positive Control



Patient Test

RHHC-001

A Product of AGROLABO S.p.A.
 Via Masero, 10010 Scarmagno (TO) Italy
 RapidVet is a trademark of dms laboratories, inc.

DEA 1 positive sample medium agglutination

RapidVet-H
 (Canine DEA 1)

Dog _____ Date _____



Auto-Agglutination Saline Screen



Positive Control



Patient Test

RHHC-001

A Product of AGROLABO S.p.A.
 Via Masero, 10010 Scarmagno (TO) Italy
 RapidVet is a trademark of dms laboratories, inc.

DEA 1 positive sample strong agglutination

RapidVet-H
 (Canine DEA 1)

Dog _____ Date _____



Auto-Agglutination Saline Screen



Positive Control



Patient Test

RHHC-001

A Product of AGROLABO S.p.A.
 Via Masero, 10010 Scarmagno (TO) Italy
 RapidVet is a trademark of dms laboratories, inc.

Positive for agglutination



+1



+2



+3



+4

Negative for agglutination



-



AGROLABO
User Manual RapidVet-H Canine DEA I

Manufactured under licence from:

Kansas State University and dmslaboratories inc.
RapidVet is a trademark of dmslaboratories inc.

Manufactured by;

Agrolabo SpA

Head Office, Laboratories
and Production Centre
Diagnostic Division
Via Masero 59
10100 Scarmagno (TO)
Italy
Tel +39 0125 731111
Fax +39 0125 731190
E-mail agrolabo@agrolabo.it
www.agrolabo.it
shop.agrolabo.it