

REAGENTES MONOCLONAIS DE DETERMINAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Anti-D Duoclone Monoclonal: Para técnicas em tubo, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, microplaca e lâmina.

RESUMO

O sistema de grupos sanguíneos Rh foi descoberto em 1940. O antígeno D é o antígeno clinicamente mais significativo em hemácias não ABO, e tem sido implicado na causa de reações transfusionais hemolíticas e da doença hemolítica do recém-nascido.

Anti-D	Fenótipo	Caucasianos, % ³	Afroamericanos, % ³
+	Rh D +vo	83	92
0	Rh D -vo	17	8

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Os reagentes Anti-D são reagentes de determinação do grupo sanguíneo destinados a serem utilizados para determinar qualitativamente a presença ou ausência do antígeno Rh D nas hemácias de doadores de sangue ou de doentes que necessitem de uma transfusão de sangue, quando testadas em conformidade com as técnicas recomendadas nestas Instruções de utilização.

PRINCÍPIO

O reagente contém anticorpos contra o antígeno D em hemácias humanas e provoca a aglutinação (agregação) direta de hemácias humanas portadoras do antígeno D, bem como a aglutinação indireta de hemácias humanas que são de Categoria D^{VI} na fase antiglobulina do teste. A não ocorrência de aglutinação (ausência de agregação) indica, geralmente, a ausência do antígeno D em hemácias humanas (consulte **Limitações**).

REAGENTE

O reagente de determinação do grupo sanguíneo Lorne Monoclonal Anti-D Duoclone é um reagente de baixo teor proteico, combinado, que contém anticorpos anti-D IgM e IgG monoclonais humanos diluídos num tampão fosfato com cloreto de sódio (0,9 g%), albumina bovina (2,0 g%) e potenciadores macromoleculares (1,5 g%). Ao realizar a tipagem de amostras de doentes, este reagente provocará a aglutinação direta de células positivas para Rh D, incluindo a maioria das variantes (**mas não a variante D^{VI}**), de uma elevada percentagem de fenótipos D (D⁺) fracos quando se utilizam as técnicas recomendadas. Os reagentes não contêm nem consistem em substâncias cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução (CMR), substâncias passíveis de causarem a desregulação do sistema endócrino nem substâncias passíveis de causarem sensibilização ou uma reação alérgica no utilizador. O reagente é fornecido na diluição ideal para utilização em amostras de doentes com todas as técnicas recomendadas indicadas abaixo, sem necessidade de diluição ou acréscimo adicional. Para obter informações sobre o número de referência do lote e o prazo de validade, consulte o **rótulo do frasco**.

IgM/IgG	Linha/clone celular
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

EXPRESSÃO ENFRAQUECIDA DO ANTIGÉNIO RhD

O termo coletivo D^u é amplamente utilizado para descrever hemácias que têm uma expressão do antígeno D mais fraca do que o normal. O termo "D fraco" refere-se a indivíduos com um número reduzido de locais do antígeno D completo por hemácia. O termo "D parcial" refere-se a indivíduos com epítomos do antígeno D em falta. D^{VI} é uma categoria D parcial que tem em falta a maioria dos epítomos D. O reagente Duoclone permite detetar a maioria dos exemplos de hemácias D parciais e fracas por aglutinação direta, mas não deteta células D^{VI}. Este reagente permite detetar células D^{VI} e D parciais na fase TAI.

CONSERVAÇÃO

Após receção, os frascos de reagente devem ser conservados entre 2–8 °C. A conservação prolongada a temperaturas fora deste intervalo pode resultar em perda acelerada de reatividade do reagente. Este reagente foi submetido a estudos de estabilidade durante o transporte a 37 °C e -25 °C, conforme descrito no documento BS EN ISO 23640:2015.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras de sangue podem ser colhidas em anticoagulantes EDTA, citrato e CPDA, ou como amostras coaguladas. As amostras devem ser testadas assim que possível após a colheita. Em caso de adiantamento do teste, conserve as amostras entre 2–8 °C. As amostras que apresentem hemólise visível ou contaminação microbiana não devem ser utilizadas para teste. As amostras de sangue que revelem evidências de lise podem apresentar resultados pouco fiáveis. É preferível (mas não essencial) lavar todas as amostras de sangue com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica antes de testá-las.

PRECAUÇÕES

- O reagente destina-se apenas a utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Se um frasco de reagente estiver partido ou apresentar fugas, elimine o conteúdo imediatamente.
- Não utilize o reagente após o prazo de validade (consulte o **rótulo do frasco**).
- Não utilize o reagente se estiver presente precipitado.
- Ao manusear reagentes deve utilizar-se vestuário de proteção, como luvas descartáveis e uma bata de laboratório.
- O reagente foi filtrado através de uma cápsula de 0,2 µm para reduzir a carga biológica, mas não é fornecido estéril. Quando um frasco é aberto, o conteúdo do mesmo deverá manter-se viável até ao fim do prazo de validade, desde que não exista turvação acentuada, a qual pode indicar deterioração ou contaminação do reagente.
- O reagente contém <0,1% de azida de sódio. A azida de sódio pode ser tóxica se ingerida e pode reagir com tubagens de chumbo e cobre, formando azidas metálicas explosivas. Aquando da eliminação, enxague com grandes volumes de água.
- Os materiais utilizados para produzir o reagente foram testados na origem e demonstraram ser negativos para anticorpos contra o VIH 1, VIH 2 e VHC, bem como para HBsAg, utilizando testes microbiológicos aprovados.
- Nenhum teste conhecido pode garantir que os produtos de origem humana ou animal estão isentos de agentes infecciosos. Deve ter-se cuidado na utilização e eliminação de cada frasco e respetivo conteúdo.

ELIMINAÇÃO DO REAGENTE E CONTROLO DE DERRAMES

Para obter informações sobre a eliminação do reagente e a descontaminação de um derrame, consulte a **Ficha de Dados de Segurança**, disponível mediante pedido.

CONTROLOS E RECOMENDAÇÕES

- Recomenda-se que seja testado um controlo positivo (idealmente células R₁r) e um controlo negativo (idealmente células rr) em paralelo com cada lote de testes. Os testes devem ser considerados inválidos se os controlos não apresentarem os resultados esperados.
- Ao classificar o tipo de hemácias de um doente diagnosticado com uma doença (como HDN, AIHA) que provoque o revestimento das hemácias com anticorpos ou outras proteínas, é importante testar as hemácias do doente utilizando o controlo negativo do reagente Lorne (Monoclonal D Negative Control) (número de catálogo: 650010). Os testes devem ser considerados inválidos se as hemácias se aglutinarem utilizando o Lorne Monoclonal D Negative Control (número de catálogo: 650010).
- Teste as amostras para determinação da categoria D^{VI} utilizando apenas o teste de antiglobulina indireta, o Coombs Bio-Rad, Bio-Rad-ID e as técnicas Coombs Ortho BioVue.
- Os antígenos D fracos e variantes são mal detetados pelas técnicas em cartão de gel, placa de microtitulação e lâmina. Recomenda-se que as variantes fracas e parciais sejam testadas utilizando a técnica de teste em tubo.
- A técnica em tubo da antiglobulina só pode ser considerada válida se todos os testes negativos reagirem positivamente com hemácias sensibilizadas com IgG.
- Antes da utilização, deixe o reagente aquecer até à temperatura ambiente. Assim que o reagente tiver sido utilizado, volte a armazená-lo a 2–8 °C.
- Nas **Técnicas recomendadas**, um volume corresponde a cerca de 50 µl quando é utilizado o conta-gotas do frasco fornecido.
- A utilização do reagente e a interpretação dos resultados devem ser realizadas por profissionais qualificados e com a devida formação, de acordo com os requisitos em vigor no país onde os reagentes são utilizados.
- O utilizador tem de determinar a adequabilidade dos reagentes para utilização com outras técnicas.

REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Globulina anti-humana, isto é., Lorne AHG Elite (número de catálogo: 435010) ou IgG anti-humana, p. ex., Lorne Anti-Human IgG (número de catálogo: 402010).
- Pipetas volumétricas.
- Lâminas de microscópio de vidro ou quadrados de papel branco.
- Varetas aplicadoras.
- Tubos de teste de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Banho-maria ou incubadora de calor seco calibrada para 37 °C ± 2 °C.
- Centrifugadora para tubos de teste.
- Agente de lavagem de células Coombs.
- Microplacas de poço em "U" validadas.
- Centrifugadora para microplacas.
- Agitador de placas.
- Leitor de placas automático.

- Bio-Rad ID-Cards (LISS/Coombs) (NaCl, teste enzimático e aglutininas frias).
- Bio-Rad ID-Centrífuge.
- Bio-Rad ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Bio-Rad ID-Incubator calibrada para 37 °C ± 2 °C.
- Cassetes do Ortho BioVue System (AHG/Coombs e neutras).
- Centrífugadora Ortho BioVue System.
- Bloco de aquecimento do Ortho BioVue System calibrado para 37 °C ± 2 °C.
- Diluente de hemácias Ortho a 0,8%
- Hemácias sensibilizadas com IgG, p. ex., Lorne Coombs Control Cells (número de catálogo: 970010).
- Solução PBS (pH 6,8–7,2) ou solução salina isotônica (pH 6,5–7,5).
- Hemácias de controlo positivo (idealmente R₁r) e controlo negativo (rr).

TÉCNICAS RECOMENDADAS (NÃO PARA CATEGORIA D^{VI})

A. Técnica em tubo

1. Prepare uma suspensão a 2–3% de hemácias em solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotônica.
2. Coloque num tubo de teste rotulado: 1 volume de reagente Lorne Duoclone e 1 volume de suspensão de hemácias.
3. Misture bem e, em seguida, centrifugue todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (força centrífuga relativa) ou utilizando um período de tempo e uma força alternativos adequados.
4. Com cuidado, proceda à ressuspensão do botão de hemácias e leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.
5. Qualquer tubo que revele um resultado negativo ou questionável (o que pode acontecer com amostras D^U ou D fracas) deverá ser incubado durante 15 minutos à temperatura ambiente.
6. Após a incubação, repita os passos 3 e 4.

B. Técnica Bio-Rad-ID (cartões de NaCl, teste enzimático e aglutininas frias)

1. Prepare uma suspensão a 0,8% de hemácias em ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
2. Remova a película de alumínio dos microtubos necessários.
3. Coloque no microtubo apropriado: 50 µl de suspensão de hemácias de teste e 25 µl de reagente Lorne Duoclone.
4. Centrifugue o(s) ID-Card(s) numa centrífugadora de cartões de gel.
5. Leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.

C. Técnica Ortho BioVue (cassetes neutras)

1. Prepare uma suspensão a 0,8% de hemácias em diluente de hemácias Ortho a 0,8%
2. Remova a película de alumínio das câmaras de reação necessárias.
3. Coloque na câmara de reação apropriada: 50 µl de suspensão de hemácias de teste e 40 µl de reagente Lorne Duoclone.
4. Centrifugue a(s) cassette(s) numa centrífugadora Ortho BioVue System.
5. Leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.

D. Técnica de microplaca, utilizando poços em “U”

1. Prepare uma suspensão a 2–3% de hemácias em solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotônica.
2. Coloque no poço apropriado: 1 volume de reagente Lorne Duoclone e 1 volume de suspensão de hemácias.
3. Misture bem, utilizando preferencialmente um agitador de microplacas, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada entre poços.
4. Incube a temperatura ambiente durante 15 minutos (tempo dependente do utilizador).
5. Centrifugue a microplaca durante 1 minuto a 140 rcf ou utilizando um período de tempo e uma força alternativos adequados.
6. Proceda à ressuspensão dos botões de hemácias, utilizando agitação cuidadosamente controlada, num agitador de microplacas
7. Leia macroscopicamente ou com um leitor automático validado.
8. Eventuais reações fracas deverão ser repetidas empregando a técnica em tubo.

E. Técnica em lâmina

1. Prepare uma suspensão de hemácias a 35–45% em soro, plasma, solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotônica, ou utilize sangue total anticoagulado (no seu próprio plasma).
2. Coloque numa lâmina de vidro rotulada ou quadrado de papel rotulado: 1 volume de reagente Lorne Duoclone e 1 volume de suspensão de hemácias de teste.
3. Utilizando uma vareta aplicadora limpa, misture o reagente e as células sobre uma área de 20 x 40 mm.
4. Incline lentamente a lâmina para trás e para a frente durante 30 segundos, com mistura adicional ocasional durante um período de 1 minuto, mantendo a lâmina à temperatura ambiente.
5. Leia macroscopicamente ao fim de 1 minuto sobre uma luz difusa e não confunda cadeias de fibrina com aglutinação.
6. Eventuais reações fracas deverão ser repetidas empregando a técnica em tubo.

TÉCNICAS RECOMENDADAS (PARA DETETAR A CATEGORIA D^{VI})

A. Técnica de antiglobulina indireta (TAI)

1. Prepare uma suspensão a 2–3% de hemácias em solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotônica.
2. Coloque num tubo de teste rotulado: 1 volume de Lorne Duoclone e 1 volume de suspensão de hemácias de teste.

3. Misture bem e incube a 37 °C durante 15 minutos.
4. Lave as hemácias uma vez, no mínimo, com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotônica, tendo o cuidado de decantar a solução salina entre lavagens e de ressuspender cada botão de células após cada lavagem. Decante completamente a solução salina após a última lavagem.
5. Adicione 2 gotas de AHG ou anti-IgG a cada botão de células secas.
6. Misture bem e centrifugue todos os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf ou utilizando um período de tempo e uma força alternativos adequados.
7. Proceda à ressuspensão de cada botão de células e leia macroscopicamente.
8. Confirme a validade de todas as reações negativas com hemácias sensibilizadas com IgG.

B. Técnica Bio-Rad-ID (cartões LISS/Coombs)

1. Prepare uma suspensão a 0,8% de hemácias em ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
2. Remova a película de alumínio dos microtubos necessários.
3. Coloque no microtubo apropriado: 50 µl de suspensão de hemácias e 25 µl de reagente Lorne Duoclone.
4. Incube o(s) ID-Card(s) durante 15 minutos a 37 °C.
5. Centrifugue o(s) ID-Card(s) numa centrífugadora de cartões de gel.
6. Leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.

C. Técnica Ortho BioVue (cassetes AHG/Coombs)

1. Prepare uma suspensão a 0,8% de hemácias em diluente de hemácias Ortho a 0,8%.
2. Remova a película de alumínio das câmaras de reação necessárias.
3. Coloque na câmara de reação apropriada: 50 µl de suspensão de hemácias de teste e 40 µl de reagente Lorne Duoclone.
4. Incube a(s) cassette(s) durante 15 minutos a 37 °C.
5. Centrifugue a(s) cassette(s) numa centrífugadora Ortho BioVue System.
6. Leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE TESTE

1. **Positivo:** a aglutinação das hemácias constitui um resultado de teste positivo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando a presença do antigénio D nas hemácias.
2. **Negativo:** a não ocorrência de aglutinação das hemácias constitui um resultado negativo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando a ausência do antigénio D nas hemácias.
3. Os resultados de testes de células que são aglutinadas utilizando o controlo negativo do reagente devem ser excluídos, uma vez que a aglutinação é muito provavelmente causada pelo efeito dos potenciadores macromoleculares presentes no reagente sobre as células sensibilizadas.

ESTABILIDADE DAS REAÇÕES

1. Leia todos os testes em tubos e microplacas imediatamente após a centrifugação.
2. Realize os passos de lavagem sem interrupção e proceda à centrifugação e leitura dos testes imediatamente após a adição de globulina anti-humana, pois o adiamento da leitura pode resultar em dissociação de complexos antigénio-anticorpo, conduzindo a reações negativas falsas ou positivas fracas.
3. Os testes em lâmina deverão ser interpretados, no máximo, ao fim de 1 minuto, de modo a garantir a especificidade e evitar a possibilidade de um resultado negativo poder ser incorretamente interpretado como positivo devido a secagem do reagente.
4. Deve ter-se precaução na interpretação dos resultados de testes realizados a temperaturas que não as recomendadas.

LIMITAÇÕES

1. O reagente Lorne Anti-D não é adequado para utilização com células tratadas com enzimas ou células suspensas em solução salina de baixa força iónica (LISS, Low Ionic Strength Saline).
2. A utilização de outras soluções que não as descritas na secção “Técnicas recomendadas” deste documento para criar suspensões de hemácias tem de ser validada antes da utilização. Algumas soluções podem dar origem a reações positivas falsas ou negativas falsas.
3. O sangue armazenado pode dar origem a reações mais fracas do que o sangue fresco.
4. Existe a possibilidade de se observar aglutinação positiva falsa ao testar células sensibilizadas com IgG.
5. Também podem ocorrer resultados positivos falsos ou negativos falsos devido a:
 - Contaminação dos materiais de teste
 - Inadequação da conservação, concentração de células, tempo de incubação ou temperatura.
 - Centrifugação inadequada ou excessiva
 - Desvio das técnicas recomendadas

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

1. Antes da libertação, cada lote de reagente Lorne Anti-D Duoclone Monoclonal foi testado utilizando os métodos de teste recomendados indicados nestas Instruções de utilização. Os testes cumpriram os requisitos de teste indicados na versão/edição atual das “Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom” (Linhas de Orientação para os Serviços de Transusão de Sangue no Reino Unido) e das “Common Technical Specifications” (Especificações Técnicas Comuns).
2. A especificidade dos anticorpos monoclonais originais é demonstrada utilizando um painel de células negativas para antigénio.
3. A potência do reagente foi testada comparativamente com o seguinte padrão de referência de potência mínima do Instituto Nacional de Padrões

e Controlos Biológicos (NIBSC, National Institute of Biological Standards and Controls):

- padrão de referência Anti-D 99/836.

4. O controlo de qualidade dos reagentes foi realizado utilizando hemácias com fenótipos que foram verificados por um centro de transfusões de sangue no Reino Unido e tinham sido lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica antes da utilização.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE

1. O utilizador é responsável pelo desempenho do reagente quando utilizado em qualquer outro método que não os mencionados em **Técnicas recomendadas**.
2. Eventuais desvios relativamente às **Técnicas recomendadas** devem ser validados antes da utilização⁶.

BIBLIOGRAFIA

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. Marion E. Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 192.
4. Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. Transfusion Medicine 1995, **5**, 171-184
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
6. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 1995, **5**, 145-150.

APRESENTAÇÕES DISPONÍVEIS DO REAGENTE

Tamanho do frasco	Número de catálogo	Testes por frasco
10 ml	740010	200
1000 ml	740000*	20 000
5000 ml	740000x5*	100 000

*Esta apresentação é apenas para Utilização em Fabrico Posterior (FFMU, For Further Manufacturing Use), pelo que não possui a marca CE.



Lorne Laboratories Limited

Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate

Danehill

Lower Earley

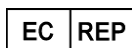
Berkshire, RG6 4UT

Reino Unido

Tel.: +44 (0) 118 921 2264

Fax: +44 (0) 118 986 4518

E-mail: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Fl.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta