



REAGENTES MONOCLONAIS DE DETERMINAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Anti-D Clone 1 e Clone 2 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

Os reagentes contêm anticorpos contra o antígeno D em hemácias humanas e provocam a aglutinação (agregação) direta de hemácias humanas portadoras do antígeno D. A não ocorrência de aglutinação (ausência de agregação) indica, geralmente, a ausência do antígeno D em hemácias humanas (consulte **Limitações**).

REAGENTES

Os reagentes de determinação do grupo sanguíneo Lorne Monoclonal IgM Anti-D Clone 1 e Clone 2 são reagentes de baixo teor proteico, que contêm um anticorpo IgM monoclonal humano diluído 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, cada reagente provocará a aglutinação direta de células positivas para Rh D, incluindo a maioria das variantes (mas não a variante D^{VI}), e de uma elevada percentagem de fenótipos D (D^u) 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. Cada 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**.

Produto	Linha/clone celular
Anti-D Clone 1	RUM-1
Anti-D Clone 2	MS-201

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 epítopos do antígeno D em falta. As células D^{VI} constituem uma categoria D parcial que tem em falta a maioria dos epítopos D. Ambos os reagentes Clone 1 e Clone 2 permitem detetar a maioria dos exemplos de hemácias D parciais e fracas por aglutinação direta, mas não detetam células D^{VI}.

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 adiamento do teste, conserve as amostras a 2–8 °C. As amostras que apresentam 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

- Os reagentes destinam-se apenas a utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Se um frasco de reagente estiver partido ou apresentar fugas, elimine o conteúdo imediatamente.
- Não utilize os reagentes após o prazo de validade (consulte o **rótulo do frasco**).
- Não utilize os reagentes se estiver presente precipitado.
- Ao manusear reagentes deve utilizar-se vestuário de proteção, como luvas descartáveis e uma bata de laboratório.
- Os reagentes foram filtrados através de uma cápsula de 0,2 µm para reduzir a carga biológica, mas não são fornecidos estéreis. 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.
- Os reagentes contêm <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 os produtos 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 realizar a tipagem das hemácias de um doente diagnosticado com uma doença (como HDN, ALHA) 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).
- As variantes de antígeno D fracas e antígeno D parciais são deficientemente detetadas pelas técnicas em cartão de gel, placa de microtitulação e lâmina. Recomenda-se que as variantes D fracas e parciais sejam testadas utilizando a técnica de teste em tubo.
- 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 dos reagentes e a interpretação dos resultados devem ser realizadas por pessoal qualificado 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

- Pipetas volumétricas.
- Bio-Rad ID-Cards (NaCl, teste enzimático e aglutininas frias).
- Bio-Rad ID-Centrifuge.
- Bio-Rad ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Cassetes do sistema Ortho BioVue (neutras).
- Centrifugadora do sistema Ortho BioVue.
- Diluído de hemácias Ortho a 0,8%, 8%.
- 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).
- Centrifugadora para tubos de teste.
- Microplacas de poço em "U" validadas.
- Centrifugadora para microplacas.
- Agitador de placas.
- Solução PBS (pH 6,8–7,2) ou solução salina isotónica (pH 6,5–7,5).
- Hemácias de controlo positivo (idealmente R₁r) e controlo negativo (rr).

TÉCNICAS RECOMENDADAS

A. Técnica em tubo

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

- 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.
- Com cuidado, proceda à ressuspensão do botão de hemácias e leia macroscopicamente para detecção de aglutinação.
- Qualquer tubo que revele um resultado negativo ou questionável (como pode suceder com amostras D fracas) deverá ser incubado durante 15 minutos à temperatura ambiente.
- Após a incubação, repita os passos 3 e 4.

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

- Prepare uma suspensão a 0,8% de hemácias em ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Remova a película de alumínio dos microtubos necessários.
- Coloque no microtubo apropriado: 50 µl de suspensão de hemácias e 25 µl de reagente Lorne Anti-D.
- Centrifugue o(s) ID-Card(s) numa centrifugadora de cartões de gel Bio-Rad.
- Leia macroscopicamente para detecção de aglutinação.

C. Técnica Ortho BioVue (cassetes neutras)

- Prepare uma suspensão a 0,8% com diluente de hemácias Ortho a 0,8%.
- Remova a película de alumínio das câmaras de reação necessárias.
- Coloque na câmara de reação apropriada: 50 µl de suspensão de hemácias e 40 µl de reagente Lorne Anti-D.
- Centrifugue a(s) cassette(s) numa centrifugadora do Sistema Ortho BioVue
- Leia macroscopicamente para detecção de aglutinação.

D. Técnica de microplaca, utilizando poços em "U"

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

E. Técnica em lâmina

- Prepare uma suspensão de hemácias a 35–45% em soro, plasma, solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica, ou utilize sangue total anticoagulado (no seu próprio plasma).
- Coloque numa lâmina de vidro rotulada ou quadrado de papel rotulado: 1 volume de reagente Lorne Anti-D e 1 volume de suspensão de hemácias.
- Utilizando uma vareta aplicadora limpa, misture o reagente e as células sobre uma área de 20 x 40 mm.
- 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 a temperatura ambiente.
- Leia macroscopicamente ao fim de 1 minuto sobre uma luz difusa e não confunda cadeias de fibrina com aglutinação.
- Eventuais reações fracas deverão ser repetidas empregando a técnica em tubo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE TESTE

- Positivo:** a aglutinação das hemácias constitui um resultado de teste positivo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando a presença do antígeno D nas hemácias.
- 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 antígeno D nas hemácias.
- 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

- Leia todos os testes em tubos e microplacas imediatamente após a centrifugação.
- Os testes em lâmina deverão ser interpretados ao fim de um minuto, de modo a garantir a especificidade e evitar a possibilidade de um resultado negativo ser incorretamente interpretado como positivo devido a secagem do reagente.
- Deve ter-se precaução na interpretação dos resultados de testes realizados a temperaturas que não as recomendadas.

LIMITAÇÕES

- O reagente Lorne Anti-D não é adequado para utilização com células tratadas com enzimas, células suspensas em LISS ou para utilização em técnicas de antiglobulina indiretas (TAI).
- O sangue armazenado pode dar origem a reações mais fracas do que o sangue fresco.
- Ao realizar o teste com células sensibilizadas com IgG, p. ex., AIHA e HDN, é possível que se observe aglutinação positiva falsa devido à presença de potenciadores macromoleculares no reagente.
- 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

- Antes da libertação, cada lote de reagente monoclonal Lorne Anti-D 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).
- Os reagentes Anti-D de determinação do grupo sanguíneo D não devem reagir com células D^{VI} quando se utiliza(m) o(s) método(s) de utilização recomendados.
- A especificidade dos anticorpos monoclonais originais é demonstrada utilizando um painel de células negativas para antígeno.
- A potência dos reagentes 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.
- 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

- O utilizador é responsável pelo desempenho dos reagentes quando utilizados em qualquer outro método que não os mencionados em **Técnicas recomendadas**.
- Eventuais desvios relativamente às **Técnicas recomendadas** devem ser validados antes da utilização².

BIBLIOGRAFIA

- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
- Marion E. Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 192.
- 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
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
- 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
Anti-D Clone 1 Monoclonal	10 ml	730010	200
	1000 ml	730000*	20 000
	5000 ml	730000x5*	100 000
Anti-D Clone 2 Monoclonal	10 ml	710010	200
	1000 ml	710000*	20 000
	5000 ml	710000x5*	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

