



REAGENTES MONOCLONAIS DE DETERMINAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

RESUMO

O antígeno K foi descrito em 1946. O antígeno está completamente desenvolvido aquando do nascimento e pode ser fortemente imunogénico. Os anticorpos anti-K têm sido implicados em reações transfusionais hemolíticas e na doença hemolítica do recém-nascido.

Anti-K	Anti-k	Fenótipo	Caucasianos ¹	Afroamericanos ¹
+	0	K+k-	0,2%	Raro
+	+	K+k+	8,8%	2%
0	+	K-k+	91%	98%
0	0	K _o	Muito raro	

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O reagente é um reagente de determinação do grupo sanguíneo destinado a ser utilizado para determinar qualitativamente a presença ou ausência do antígeno Kell (KEL1) nas hemácias de dadores 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 K em hemácias humanas e provoca a aglutinação (agregação) direta de hemácias humanas portadoras do antígeno Kell. A não ocorrência de aglutinação (ausência de agregação) indica, geralmente, a ausência do antígeno Kell (**Limitações**).

REAGENTE

O reagente de determinação do grupo sanguíneo Lorne Monoclonal Anti-K é um reagente de baixo teor proteico que contém anticorpos IgM monoclonais, clone MS-56, diluídos num tampão fosfato com cloreto de sódio, albumina bovina e potenciadores macromoleculares (4,0 g%). O reagente não contém nem consiste 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 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**.

CONSERVAÇÃO

Após receção, os frascos de reagente devem ser armazenados a 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, armazene as amostras a 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 heterozigótico) e um controlo negativo 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 de hemácias de um doente, é importante que seja incluído um controlo negativo do reagente (Lorne Monoclonal Rh Control, número de catálogo: 640010), uma vez que os potenciadores macromoleculares presentes no reagente podem provocar reações positivas falsas com células revestidas com IgG.
- Antígenos K fracos poderão ser deficientemente detetados pelas técnicas em cartão de gel, placa de microtitulação e lâmina. Recomenda-se que os antígenos K fracos sejam testados 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 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 do reagente para utilização com outras técnicas.

REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Técnica em tubo

- Tubos de teste de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Centrifugadora capaz de girar a 1000 g durante 20 segundos.
- Solução PBS (pH 6,8–7,2) ou solução salina isotónica (pH 6,5–7,5).
- Hemácias de controlo positivo (idealmente Kk) e controlo negativo (kk).

Técnica de microtipagem Bio-Rad-ID

- Bio-Rad ID-Cards (NaCl, testes enzimáticos e aglutininas frias).
- Bio-Rad ID-Centrifuge.
- Bio-Rad ID-CellStab ou ID-Diluent 2.

Técnica de tipagem Ortho BioVue

- Cassetes do Ortho BioVue System (neutras).
- Centrifugadora Ortho BioVue System.
- Ortho 0,8% Red Cell Diluent.

Técnica em placa de microtitulação

- Placas de microtitulação de poço em "U" validadas.
- Centrifugadora para placa de microtitulação.
- Agitador de placas de microtitulação.

Técnica em lâmina

- Lâminas de microscópio de vidro ou quadrados de papel branco.
- Varetas aplicadoras.
- Temporizador ou cronómetro

Todas as técnicas

- Pipetas volumétricas.

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 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 deteção de aglutinação.
- Qualquer tubo que revele um resultado negativo ou questionável 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, testes enzimáticos 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 nos ID-Card(s) de NaCl, testes enzimáticos e aglutininas frias.
3. Coloque no microtubo apropriado: 50 µl de suspensão de hemácias e 25 µl de reagente Lorne.
4. Centrifugue o(s) ID-Card(s) numa Bio-Rad ID Centrifuge.
5. Leia macroscopicamente para deteção de aglutinação.

C. Técnica Ortho BioVue (cassetes neutras)

1. Prepare uma suspensão a 0,8% de hemácias em Ortho Red Cell Diluent a 0,8%.
2. Remova a película de alumínio das câmaras de reação na(s) cassette(s) neutra(s) necessária(s).
3. Coloque na câmara de reação apropriada: 50 µl de suspensão de hemácias e 40 µl de reagente Lorne.
4. Centrifugue a(s) cassette(s) numa centrifugadora 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 isotónica.
2. Coloque no poço apropriado: 1 volume de reagente Lorne 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 à 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 a 35–45% de hemácias em soro, plasma, solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica. Se isto não for possível, também pode ser utilizado sangue total anticoagulado como amostra.
2. Coloque numa lâmina de vidro rotulada ou quadrado de papel rotulado: 1 volume de reagente Lorne e 1 volume de suspensão de hemácias.
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 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.

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 antígeno K 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 antígeno K 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. 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.
3. Deve ter-se precaução na interpretação dos resultados de testes realizados a temperaturas que não as recomendadas.

LIMITAÇÕES

1. O sangue armazenado pode dar origem a reações mais fracas do que o sangue fresco.
2. 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 deste reagente 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 Transfusão 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 antígeno.
3. O controlo de qualidade do reagente foi realizado utilizando hemácias com fenótipos que foram verificados por um centro de transfusões de sangue no Reino Unido e que 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 utilização⁵.

BIBLIOGRAFIA

1. Marion E. Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 186.
2. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 12.
3. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
5. 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.

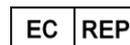
APRESENTAÇÕES DISPONÍVEIS DO REAGENTE

Tamanho do frasco	Número de catálogo	Testes por frasco
10 ml	760010	200
1000 ml	760000*	20 000

*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 Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta