



REACTIFS MONOCLONAUX POUR LA DETERMINATION DES GROUPES SANGUINS
MODE D'EMPLOI

Réactif monoclonal Anti-D Clone 1 et Clone 2 : Pour les techniques des tubes, des cartes Bio-Rad ID, des colonnes Ortho BioVue, des lames et des microplaques.

RÉSUMÉ

Le système Rh de groupes sanguins a été découvert en 1940. L'antigène D est l'antigène érythrocytaire non-ABO le plus important sur le plan clinique. Il est impliqué dans les réactions transfusionnelles hémolytiques et la maladie hémolytique du nouveau-né.

Anti-D	Phénotype	Caucasiens (%) ³	Afro-américains (%) ³
+	Rh D +	83	92
0	Rh D -	17	8

OBJECTIF

Les réactifs anti-D sont des réactifs de détermination des groupes sanguins qui ont pour objectif de déterminer de manière qualitative la présence ou l'absence d'antigènes Rh D sur les globules rouges de donneurs ou de patients nécessitant une transfusion sanguine lors de tests conformes aux techniques recommandées dans ce mode d'emploi.

PRINCIPE

Les réactifs contiennent des anticorps dirigés contre l'antigène D des globules rouges humains et entraîneront l'agglutination directe (amas) des globules rouges humains porteurs de l'antigène D. L'absence d'agglutination (pas d'amas) indique généralement l'absence de l'antigène D sur les globules rouges humains (voir **Limites**).

REACTIFS

Les réactifs monoclonaux IgM anti-D clone 1 et clone 2 pour la détermination des groupes sanguins de Lorne sont des réactifs à faible concentration en protéines contenant un anticorps monoclonal humain de type IgM dilué dans du chlorure de sodium (0,9 g%), de l'albumine bovine (2,0 g%) et des potentialisateurs macromoléculaires (1,5 g%). Lors du génotypage des échantillons de patients, chaque réactif entraînera l'agglutination directe des cellules Rh D positives, y compris la majorité des variants (sauf D^{VI}) et une grande proportion de phénotypes D faibles (D^U) lorsque les techniques recommandées sont utilisées. Les réactifs ne contiennent pas et ne sont pas composés de substances CMR, de perturbateurs endocriniens ni de substances qui pourraient entraîner une sensibilisation ou une réaction allergique chez l'utilisateur. Chaque réactif est fourni à une dilution optimale pour une utilisation sur des échantillons de patients avec toutes les techniques recommandées ci-dessous sans nécessiter de dilution ou d'ajout supplémentaire. Pour connaître le numéro de référence du lot et sa date d'expiration, consultez l'**étiquette sur le flacon**.

Produit	Lignée cellulaire/Clone
Anti-D clone 1	RUM-1
Anti-D clone 2	MS-201

EXPRESSION AFFAIBLIE DE L'ANTIGÈNE RhD

Le terme collectif D^U est largement utilisé pour décrire les globules rouges qui ont une expression plus faible de l'antigène D que la normale. L'expression « D faible » indique des individus portant un nombre réduit de sites d'antigène D complets par globule rouge. L'expression « D partiel » indique des individus avec des épitopes de l'antigène D absents. Les cellules DVI sont des cellules de type D partiel dans lesquelles la majorité des épitopes de l'antigène D sont manquants. Les réactifs clone 1 et clone 2 détecteront la plupart des exemples de globules rouges de type D partiel ou D faible par agglutination directe, mais ne détecteront pas les globules rouges de type DVI.

CONSERVATION

Les flacons de réactifs doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C dès leur réception. Une conservation prolongée à des températures en dehors de cette plage peut accélérer la perte d'efficacité du réactif. Ce réactif a fait l'objet d'études sur la stabilité dans les transports à 37 °C et -25 °C comme décrit dans le document BS EN ISO 23640:2015.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de sang peuvent être prélevés et placés dans de l'EDTA, du citrate, des anticoagulants CPDA, ou utilisés sous la forme d'échantillons coagulés. Les échantillons doivent être testés dès que possible après le prélèvement. En cas de retard du test, conservez les échantillons à une température comprise entre 2 et 8 °C. Les échantillons présentant une hémolyse ou une contamination microbienne flagrante ne doivent pas être testés. Les échantillons de sang présentant des signes clairs de lyse peuvent produire des résultats incertains. Il est préférable (mais pas indispensable) de laver tous les

échantillons de sang avec un tampon phosphate salin (PBS) ou une solution saline isotonique avant le test.

PRÉCAUTIONS

1. Les réactifs sont conçus pour le diagnostic *in vitro* uniquement.
2. Si un flacon de réactif est fendu ou s'il fuit, jetez son contenu immédiatement.
3. N'utilisez pas les réactifs après leur date d'expiration (voir **l'étiquette sur le flacon**).
4. N'utilisez pas les réactifs en présence d'un précipité.
5. Portez des vêtements de protection lors de la manipulation des réactifs, tels que des gants jetables et une blouse de laboratoire.
6. Les réactifs ont été filtrés dans une capsule de 0,2 µm afin de réduire leur charge biologique, mais ils ne sont pas fournis stériles. Dès qu'un flacon est ouvert, son contenu reste viable jusqu'à la date d'expiration tant qu'il n'y a pas de traces de turbidité, pouvant indiquer une détérioration ou une contamination du réactif.
7. Les réactifs contiennent < 0,1 % d'azote de sodium. L'azote de sodium peut être toxique s'il est ingéré et peut réagir avec les canalisations en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques explosifs. Éliminez-le dans de grandes quantités d'eau.
8. Les matériaux utilisés pour fabriquer les produits ont été testés à la source à l'aide de tests microbiologiques approuvés et considérés comme négatifs aux anticorps contre le VIH 1+2 et le VHC et à l'HBsAg.
9. Aucun test ne peut garantir que les produits dérivés de sources humaines ou animales ne comportent pas d'agents infectieux. Faites très attention lors de l'utilisation et de l'élimination de chaque flacon et de son contenu.

ÉLIMINATION DU RÉACTIF ET GESTION DES DÉVERSEMENTS

Pour plus d'informations sur l'élimination du réactif et sur la procédure de décontamination en cas de déversement, consultez la **Fiche de données de sécurité**, disponible sur demande.

CONTRÔLES ET CONSEILS

1. Il est recommandé de tester un contrôle positif (idéalement des cellules R₁r) et un contrôle négatif (idéalement des cellules rr) avec chaque série de tests. Les tests doivent être considérés comme non valides si les contrôles ne présentent pas les résultats attendus.
2. Lors du génotypage des globules rouges d'un patient ayant reçu le diagnostic d'une maladie dans laquelle les globules rouges sont recouverts d'anticorps ou d'autres protéines (telle que la maladie hémolytique du nouveau-né ou l'AHAI), il est important de tester les globules rouges du patient à l'aide du contrôle négatif monoclonal D de Lorne (référence : 650010).
3. Les variants de l'antigène D faibles et partiels sont faiblement détectés par les techniques des cartes de gel, des microplaques et des lames. Il est recommandé de tester les variants de l'antigène D faibles et partiels à l'aide de la technique des tubes.
4. Avant son utilisation, laissez le réactif se réchauffer à température ambiante. Dès que le réactif a été utilisé, remettez-le directement dans son emplacement de conservation à une température comprise entre 2 et 8 °C.
5. Dans **Techniques recommandées**, un volume représente approximativement 50 µl lorsque le flacon compte-gouttes fourni est utilisé.
6. L'utilisation des réactifs et l'interprétation des résultats doivent être assurées par du personnel formé et qualifié conformément aux exigences du pays où les réactifs sont utilisés.
7. L'utilisateur doit déterminer si les réactifs peuvent être utilisés avec d'autres techniques.

RÉACTIFS ET MATÉRIELS REQUIS

- Pipettes volumétriques.
- Cartes Bio-Rad ID (NaCl, test enzymatique et agglutinines froides).
- Centrifugeuse Bio-Rad ID.
- Solution Bio-Rad ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Cassettes Ortho BioVue (neutres).
- Centrifugeuse Ortho BioVue.
- Diluant de globules rouges Ortho à 0,8 %.
- Lames de microscope en verre ou cartons blancs
- Bâtonnets applicateurs.
- Tubes en verre (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Centrifugeuse pour tubes.
- Microplaques à puits en U validées.
- Centrifugeuse pour microplaques.
- Agitateur de microplaques.
- Solution PBS (pH = 6,8-7,2) ou solution saline isotonique (pH = 6,5-7,5).
- Globules rouges de contrôle positifs (idéalement R₁r) et négatifs (rr).

TECHNIQUES RECOMMANDÉES

A. Technique des tubes

1. Préparez une suspension à 2-3 % de globules rouges dans une solution PBS ou saline isotonique.
2. Placez dans un tube étiqueté : 1 volume du réactif anti-D de Lorne et 1 volume de la suspension de globules rouges.
3. Mélangez complètement et centrifugez tous les tubes 20 secondes à 1 000 rcf ou selon une période et une force alternatives appropriées.
4. Attendez la resuspension du culot de globules rouges, puis lisez l'agglutination au niveau macroscopique.
5. Tous les tubes qui présentent un résultat négatif ou douteux (comme cela peut survenir avec les échantillons D faibles) doivent être incubés pendant 15 minutes à température ambiante.
6. Après l'incubation, répétez les étapes 3 et 4.

B. Technique Bio-Rad ID (NaCl, cartes de test enzymatique et d'agglutinines froides)

1. Préparez une suspension à 0,8 % de globules rouges dans une solution ID-CellStab or ID-Diluent 2.
2. Retirez le film en aluminium du nombre de microtubes requis.
3. Placez le microtube approprié : 50 µl de suspension de globules rouges et 25 µl de réactif anti-D de Lorne.
4. Centrifugez la ou les cartes ID dans une centrifugeuse de cartes de gel Bio-Rad.
5. Lisez l'agglutination au niveau macroscopique.

C. Technique Ortho BioVue (cartes neutres)

1. Préparez une suspension à 0,8 % de globules rouges dans une solution à 0,8 % de diluant de globules rouges Ortho.
2. Retirez le film en aluminium du nombre de chambres de réaction requis.
3. Placer dans une chambre de réaction appropriée : 50 µl de suspension de globules rouges et 40 µl de réactif anti-D de Lorne.
4. Centrifugez la ou les cassettes dans la centrifugeuse Ortho BioVue.
5. Lisez l'agglutination au niveau macroscopique.

D. Technique sur microplaque avec puits en U

1. Préparez une suspension à 2-3 % de globules rouges dans une solution PBS ou saline isotonique.
2. Placez dans le puits approprié : 1 volume du réactif anti-D de Lorne et 1 volume de suspension de globules rouges.
3. Mélangez complètement, de préférence à l'aide d'un agitateur de microplaques, en prenant soin d'éviter la contamination entre les puits.
4. Laissez incubé à température ambiante pendant 15 minutes (le temps dépend de l'utilisateur).
5. Centrifugez la microplaque 1 minute à 140 rcf ou selon une période et une force alternatives appropriées.
6. Attendez la resuspension du culot de globules rouges en utilisant une technique d'agitation soigneusement contrôlée sur l'agitateur de microplaques.
7. Lisez au niveau macroscopique ou à l'aide d'un lecteur automatique validé.
8. Toute réaction faible doit être retestée par la technique des tubes.

E. Technique des lames

1. Préparez une suspension à 35-45 % de globules rouges dans du sérum, du plasma, ou une solution PBS ou saline isotonique ou utilisez du sang total anticoagulé (dans son propre plasma).
2. Placez sur une lame en verre ou un carton blanc étiqueté(e) : 1 volume du réactif anti-D de Lorne et 1 volume de la suspension de globules rouges.
3. À l'aide d'un bâtonnet applicateur propre, mélangez le réactif et les cellules sur une surface d'environ 20 x 40 mm.
4. Toujours à température ambiante, inclinez lentement la lame d'avant en arrière pendant 30 secondes et procédez à de nouveaux mélanges occasionnels pendant 1 minute.
5. Lisez au niveau macroscopique après 1 minute sur une lumière diffuse sans prendre les filaments de fibrines pour de l'agglutination.
6. Toute réaction faible doit être retestée par la technique des tubes.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU TEST

1. **Positif** : l'agglutination des globules rouges indique un résultat positif et, dans les limites acceptées de la procédure de test, la présence d'un antigène D sur les globules rouges.
2. **Négatif** : l'absence d'agglutination des globules rouges indique un résultat négatif et, dans les limites acceptées de la procédure de test, l'absence d'un antigène D sur les globules rouges.
3. Les résultats de test présentant des cellules qui sont agglutinées à l'aide du contrôle négatif doivent être exclus, car l'agglutination est probablement due à l'effet des potentialisateurs macromoléculaires sur les cellules sensibilisées.

STABILITÉ DES RÉACTIONS

1. Lisez tous les tubes et microplaques immédiatement après la centrifugation.
2. Les tests sur lames doivent être interprétés en une minute afin de garantir la spécificité et d'éviter la possibilité d'interpréter un résultat négatif comme positif à cause du séchage du réactif.
3. Il convient de faire preuve de prudence lors de l'interprétation des résultats des tests à des températures autres que celles recommandées.

LIMITES

1. Le réactif anti-D de Lorne ne convient pas à une utilisation avec des cellules ayant subi un traitement enzymatique ou suspendues dans une solution à faible concentration ionique ni à une utilisation dans des tests indirects à l'antiglobuline (TIA).
2. Le sang conservé pourrait donner des résultats plus faibles que le sang frais.
3. Une agglutination faussement positive peut être observée en raison de la présence de potentialisateurs macromoléculaires dans le réactif lors du test de cellules sensibilisées aux IgG (par exemple, dans les cas d'AHAI ou de maladie hémolytique du nouveau-né).
4. Des résultats faux positifs ou faux négatifs pourraient également survenir à cause de :
 - La contamination des matériaux de test
 - Un stockage, une concentration cellulaire, un temps d'incubation ou une température incorrect(e)
 - Une centrifugation excessive ou incorrecte
 - Le non-respect des techniques recommandées

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE SPÉCIFIQUES

1. Avant sa commercialisation, chaque lot de réactif monoclonal anti-D de Lorne a été testé à l'aide des méthodes de test recommandées énumérées dans le mode d'emploi. Les tests étaient conformes aux exigences de test publiées dans la version actuelle du document « Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom » (Lignes directrices pour les services de transfusion de sang au Royaume-Uni) et dans les spécifications techniques communes.
2. Les réactifs anti-D de détermination des groupes sanguins ne doivent pas réagir avec les cellules DVI lorsque les méthodes recommandées sont utilisées.
3. La spécificité des anticorps monoclonaux sources est démontrée à l'aide d'un panel de cellules négatives à l'antigène.
4. La puissance des réactifs a été testée à l'aide de l'étalon de référence d'une puissance minimale obtenu auprès du NIBSC (National Institute of Biological Standards and Controls, Institut national des étalons et contrôles biologiques) suivant :
 - Étalon de référence anti-D 99/836.
5. Le contrôle qualité des réactifs a été réalisé à l'aide de globules rouges dont les phénotypes ont été vérifiés par un centre de transfusion sanguine du Royaume-Uni et lavés à l'aide d'une solution PBS ou saline isotonique avant utilisation.

AVIS DE NON-RESPONSABILITÉ

1. L'utilisateur est responsable des performances des réactifs s'il utilise une méthode non mentionnée dans la section **Techniques recommandées**.
2. Le non-respect des **techniques recommandées** doit être validé avant utilisation⁶.

RÉFÉRENCES

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.

RÉACTIFS DISPONIBLES

	Taille de flacon	Numéro de référence	Tests par flacon
Réactif monoclonal anti-D clone 1	10 ml	730010	200
	1 000 ml	730000*	20 000
	5 000 ml	730000x5*	100 000
Réactif monoclonal anti-D clone 2	10 ml	710010	200
	1 000 ml	710000*	20 000
	5 000 ml	710000x5*	100 000

*Cette taille est destinée à un usage pour fabrication ultérieure et n'est donc pas accompagnée du marquage CE.



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Royaume-Uni
Tél : +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