



REAGENTE DE GRUPO SANGUÍNEO MONOCLONAL
Somente para uso diagnóstico in-vitro – Pronto para uso

Anti-D Clone 1 e Anti-D Clone 2 - Para técnicas em Tubo, Microplaca e Lâmina

SUMÁRIO

O grupo sanguíneo Rh foi descoberto em 1940. O antígeno D é, clinicamente, o mais significativo fora do sistema ABO, e está implicado tanto nas reações de transfusões hemolíticas como em doenças hemolíticas dos recém-nascidos.

Anti-D	Fenótipo	Caucasianos %	Afro-Americanos %
+	Rh D +ve	85	72
0	Rh D -ve	15	28

PRINCÍPIO

Os reagentes causam aglutinação direta das células vermelhas teste que carregam o antígeno D após centrifugação. A ausência de aglutinação geralmente indica a ausência do antígeno D (ver LIMITAÇÕES)

REAGENTES

Os reagentes do grupo sanguíneo IgM monoclonal Anti-D Clone 1 e Clone 2 Lorne são reagentes de baixa proteína contendo um anticorpo monoclonal IgM humano diluído em cloreto de sódio 0,9%, albumina bovina 3% e potencializadores macromoleculares.

Durante a tipificação de amostras de pacientes, usando-se as técnicas recomendadas, cada reagente irá aglutinar diretamente células Rh D positivas, incluindo a maioria das variantes (exceto D^{VI}) e uma grande proporção de fenótipos D fracos (D^{VI}).

Cada reagente é fornecido em uma diluição ótima para ser usado com todas as técnicas recomendadas, sem a necessidade de diluição ou adição posterior. O número de referência do lote e a data de validade estão impressos nas etiquetas individuais dos frascos.

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

EXPRESSÃO ENFRAQUECIDA DO ANTÍGENO RhD

O termo coletivo D^U é largamente utilizado para descrever células vermelhas com uma expressão mais fraca do antígeno D do que o normal. O termo D fraco indica um indivíduo com um número reduzido de sítios de antígenos D por célula vermelha. O termo D parcial indica indivíduos com falta de epitópos D. Células D^{VI} é uma categoria D parcial onde falta a maioria dos epitópos D. Os reagentes Clone 1 e Clone 2 detectam a maioria das células vermelhas D fraca e parcial por aglutinação mas não detectam células D^{VI}.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os frascos originais devem ser armazenados a 2-8° C. Não congelar. O armazenamento prolongado a temperaturas fora das especificações pode resultar em perda acelerada da reatividade.

COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue colhidas com ou sem anticoagulante podem ser usadas para tipagem antigênica. Se ocorrer algum atraso no teste, armazenar as amostras a 2-8°C. Amostras colhidas em EDTA ou citrato devem ser analisadas em 48 horas. Amostras colhidas em ACD, CPD ou CPDA-1 podem ser testadas até 35 dias após coleta. Todas as amostras devem ser lavadas no mínimo duas vezes com tampão PBS ou Solução Fisiológica 0,9% antes de serem testadas. Amostras com evidência de lise podem fornecer resultados não confiáveis.

PRECAUÇÕES

1. O reagente é somente para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Se o frasco estiver rachado ou vazando, descartar o conteúdo imediatamente.
3. Não utilizar reagentes fora da data de validade (ver etiquetas).
4. Não utilizar reagentes se houver presença de precipitados.
5. Durante a manipulação dos reagentes, deve-se utilizar equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas descartáveis e aventais de proteção (jalecos).
6. O reagente foi esterilizado por filtração através de um filtro de 0.2 µm para reduzir a contaminação. Uma vez que o frasco for aberto, o conteúdo permanece viável até a data de vencimento, desde que não haja nenhuma turbidez que indique contaminação ou deterioração.
7. Este reagente possui azida sódica (<0,1%) e é classificado pelas Diretrizes Aplicáveis da Comunidade Européia (CE) como nocivo (Xn).

8. Os materiais usados foram testados como negativos para HBsAg e anticorpos anti HIV1+2 e HCV com técnicas microbiológicas aprovadas.
9. Nenhum teste pode garantir que produtos derivados de fontes animais ou humanas estejam livres de agentes infecciosos, portanto, todo o cuidado deve ser tomado no manuseio e descarte de cada frasco e seu conteúdo.

DESCARTE DO FRASCO DE REAGENTE E CONTEÚDO

Para informação de descarte do reagente e descontaminação, seguir as disposições da resolução sobre o regulamento técnico para gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, bem como outras práticas de biossegurança equivalentes, revisão em vigor.

Caso necessário, consultar o MSDS (Material Safety Data Sheets) que pode ser disponibilizado quando requerido.

CONTROLES E AVISOS

1. Recomenda-se que sejam testados um Controle Positivo (células de R1r) e um Controle Negativo (células rr) em paralelo a cada bateria de testes. O teste deve ser considerado inválido se os controles não demonstrarem os resultados esperados.
2. Quando tipificar células vermelhas de um paciente é importante o uso de um controle negativo, pois os potencializadores macromoleculares podem causar reações falso positivas com células revestidas com IgG, exemplo: no caso de AIHA ou HDN. Recomenda-se o Controle Negativo para Reagente Monoclonal Anti-D Lorne.
3. As variantes do antígeno D parcial e fraco são fracamente detectadas pela técnica de cartões de gel, placa e lâmina. Recomenda-se o uso da técnica em tubos.
4. Nas Técnicas Recomendadas um volume corresponde a aproximadamente 40 µl, quando usado o conta-gotas fornecido com o frasco.
5. O uso dos reagentes e a interpretação dos resultados devem ser realizados por pessoal treinado e qualificado, de acordo com os requerimentos do país onde o reagente está sendo usado.
6. O usuário deve determinar a adequação do reagente para o uso em outras técnicas.

MATERIAL NECESSÁRIO

- Bastões aplicadores
- Leitor de placas automático
- Lâminas de vidro para microscopia
- Tubos-teste de vidro (10 x 75mm ou 12 x 75mm)
- Centrífuga de microplaca
- Agitador de placa
- Tampão Salina Fosfato (PBS): NaCl 0,9% pH 7,0 ± 0,2 a 22°C ± 1°C ou Solução Fisiológica 0,9%.
- Controles de células vermelhas positivo (ideal R1r) e negativo (rr)
- Tubos teste de centrífuga
- Microplacas "U" validadas.
- Pipetas volumétricas

TÉCNICAS RECOMENDADAS

Técnica em Tubo

1. Preparar uma suspensão de células vermelhas a testar a 2-3%, lavadas em PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
2. Colocar em um tubo teste etiquetado: 1 volume de Reagente Anti-D Lorne e 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar.
3. Misturar totalmente e centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
4. Ressuspender suavemente a base de células vermelhas e ler a aglutinação macroscopicamente.
5. Qualquer tubo apresentando um resultado negativo ou questionável, deve ser incubado por 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Após incubação, repetir etapas 3 e 4.

Técnica em Microplaca Usando Cavidades em "U"

1. Preparar uma suspensão de células vermelhas a testar a 2-3%, lavadas em PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
2. Colocar na cavidade adequada: 1 volume de Reagente Anti-D Lorne e 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar.
3. Misturar totalmente, preferivelmente utilizando um agitador de microplacas, tomando cuidado para evitar a contaminação cruzada entre as cavidades.
4. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.

- Centrifugar a microplaca por 1 minuto a 140 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
- Ressuspender suavemente a base de células vermelhas usando agitação controlada em um agitador de microplacas.
- Ler a aglutinação macroscopicamente ou com um leitor validado.
- Qualquer reação fraca deve ser repetida pela técnica em tubo.

Técnica em Lâmina

- Preparar uma suspensão de células vermelhas a testar a 35-45% em PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
- Colocar em uma lâmina de vidro marcada: 1 volume de Reagente Anti-D Lorne e 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar.
- Usando um bastão aplicador limpo, misturar os reagentes em uma área de cerca de 20x40mm.
- Inclinar vagarosamente a lâmina por 30 segundos, com agitações posteriores ocasionais durante um período de 2 minutos mantendo a temperatura ambiente.
- Ler macroscopicamente após 2 minutos em uma luz difusa e não confundir a presença de fibrina com aglutinação.
- Qualquer reação fraca deve ser repetida pela técnica em tubo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Positivo:** A aglutinação das células vermelhas a testar constitui um resultado positivo e, dentro das limitações aceitas do procedimento, indica a presença do antígeno D nas células teste.
- Negativo:** Nenhuma aglutinação das células vermelhas teste constitui um resultado negativo e, dentro das limitações aceitas do procedimento, indica a ausência do antígeno D nas células a testar.
- Os resultados dos testes, cujo controle negativo forneceu aglutinação, devem ser excluídos, pois a aglutinação deve ser provavelmente causada pelo efeito dos potencializadores macromoleculares do reagente.

ESTABILIDADE DAS REAÇÕES

- Muito cuidado na interpretação dos resultados dos testes realizados em outras temperaturas que não as recomendadas.
- Ler todos os tubos e microplacas logo após a centrifugação.
- Os testes em lâminas devem ser interpretados dentro de 2 minutos, para assegurar a especificidade e evitar a possibilidade de um resultado negativo ser incorretamente interpretado como positivo, devido ao ressecamento do reagente.

LIMITAÇÕES

- Anti-D Lorne não é adequado para o uso com células tratadas com enzimas, células suspensas em LISS ou para o uso em técnicas de antiglobulina indireta.
- O sangue armazenado pode fornecer resultados mais fracos que o sangue fresco.
- Agglutinação falso-positiva pode ser observada devido a presença dos potencializadores macromoleculares do reagente, quando testado em células sensibilizadas por IgG, exemplo: AIHA, HDN.
- Resultados falso-positivos ou falso-negativos podem ocorrer devido a:
 - Contaminação do material teste.
 - Concentração celular inadequada.
 - Tempo de incubação ou temperatura inadequada
 - Centrifugação inadequada ou excessiva.
 - Armazenamento inadequado dos materiais do teste.
 - Desvio das técnicas recomendadas.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

- O reagente foi caracterizado pelos procedimentos mencionados nas **Técnicas Recomendadas**.
- Antes de ser liberado, cada lote de Anti-D Clone 1 e Clone 2 foi testado pelas **Técnicas Recomendadas** contra um painel de células vermelhas antígeno positivas para assegurar a reatividade adequada.
- Os reagentes Anti-D não devem reagir com as células DVI usando os métodos recomendados para uso. Não é recomendado o prosseguimento de testes de resultados negativos usando procedimentos com antiglobulinas.
- A especificidade dos anticorpos monoclonais é demonstrada usando um painel de células antígeno negativas.
- A potência dos reagentes foi testada contra os padrões de referência mínimos obtidos do NIBSC (National Institute of Biological Standards and Controls).
 - Anti-D referência 99/836.
- O controle de qualidade deste reagente foi realizado usando células vermelhas lavadas 2 vezes com tampão PBS ou Solução Fisiológica 0,9% antes do uso.
- Os reagentes estão de acordo com recomendações do último artigo "Guidelines for the UK Blood Transfusion Services".

GARANTIA

O usuário é responsável pelo desempenho dos reagentes e outras técnicas não recomendadas. Qualquer desvio das Técnicas Recomendadas deve ser validado antes do uso.

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e as instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.







BIBLIOGRAFIA

- Kholer G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975, **256**, 495-497.
- Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man 6th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987, Chapter 7.
- Tippett P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. Medical. Laboratory Science 1988; **45**, 88-93
- Thompson KM, Hughes-Jones NC. Production and characteristics of monoclonal anti-Rh. Bailliere's Clinical Haematology 1990; April
- 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. H.M.S.O. Current Edition.
- 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

Anti-D Clone 1 Monoclonal	10 ml
	10 X 10 ml
Anti-D Clone 2 Monoclonal	10 ml
	10 X 10 ml

QUADRO DE SÍMBOLOS

REF	Numero do catálogo		Prazo de validade
	Para diagnóstico in vitro		Número de lote
	Fabricante		Ler as Instruções de Uso
	Conservar a		

INFORMAÇÕES AO CONSUMIDOR

Fabricado por:
Lorne Laboratories Ltda
 Unit 1 Danehill
 Cutbush Park Industrial Estate
 Lower Earley
 READING
 Berks, RG6 4UT
 United Kingdom

Importado e Distribuído por:
Kovalent do Brasil Ltda.
 Rua Cristóvão Sardinha, 110 – Jd. Bom Retiro
 São Gonçalo – RJ – CEP 24722-350
 www.kovalent.com.br
 CNPJ: 04.842.199/0001-56
 Farm. Resp.: Jorge A. Janoni CRF: 2648-RJ

SAC: sac@kovalent.com.br - (21) 3907-2534