

Determinación cualitativa de antígeno D en hematíes humanos
IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El reactivo provoca la aglutinación directa de los hematíes que contengan el antígeno D y la aglutinación indirecta de los hematíes de la Categoría D^{VI} en la fase antiglobulina del test. La ausencia de aglutinación generalmente es indicativo de la inexistencia del antígeno D (ver **Limitaciones**).

SIGNIFICADO CLÍNICO

En 1940 Levine y Stetson descubrieron el sistema Rh del grupo sanguíneo. El antígeno D es el más significativo clínicamente de los antígenos de hematíes que no son del sistema ABO. Los correspondientes anticuerpos han estado implicados en Reacciones transfusionales, así como en el Síndrome hemolítico del Recién Nacido.

Anti-D	Fenotipo	Caucasianos %	Afro-Americanos %
+	Rh D +vo	85	72
0	Rh D -vo	15	28

Expresión debilitada del antígeno RhD

El término colectivo D^{VI} es ampliamente utilizado para describir los hematíes que presentan una expresión del antígeno D inferior a la normal. El término D débil denota individuos con un número reducido de antígenos D completos por célula. El término D parcial denota individuos con epítomos del antígeno D ausentes. DVI (D^{VI}) es una categoría de antígeno D parcial en la que la mayoría de epítomos D están ausentes. El reactivo detectará la mayoría de ejemplos de hematíes D débil y D parcial por aglutinación directa, pero no células DVI. El reactivo detectará DVI y células D parcial en la fase IAT.

REACTIVOS

Anti-D de Spinreact es un reactivo escasamente proteico combinado que contiene anticuerpos humanos monoclonales IgM e IgG diluidos en un tampón fosfato con cloruro sódico (0,9 g%), albúmina bovina (3 g%) y potenciadores macromoleculares. Durante el tipado de las muestras de pacientes, aplicando las técnicas aquí recomendadas, el reactivo aglutinará directamente células RhD positivas (pero no D^{VI}) y una elevada proporción de fenotipos D débiles (D^{VI}). El reactivo es suministrado en la dilución óptima para su utilización en todas las técnicas aquí recomendadas sin necesidad de diluciones o adiciones suplementarias. Ver el lote y caducidad de cada referencia en la etiqueta del vial.

IgM / IgG	Clon / Línea celular
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

PRECAUCIONES

- Los reactivos son sólo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Si el vial del reactivo está roto o agrietado, descartar inmediatamente su contenido.
- No utilizar reactivos caducados (ver la etiqueta de vial).
- No utilizar reactivos que presenten precipitados.
- La manipulación del reactivo debe realizarse con la apropiada indumentaria de protección, tales como guantes desechables y bata de laboratorio.
- Los reactivos han sido filtrados a través de cápsulas de 0,2 µm para reducir la carga biológica. Una vez abierto el vial, el contenido debe permanecer viable hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando no haya una marcada turbidez la cual podría ser indicativa de deterioración o contaminación del reactivo.
- Los reactivos contienen < 0,1% de azida sódica. La azida sódica puede ser tóxica, si se ingiere y puede reaccionar con cobre o plomo de las tuberías y formar azidas metálicas explosivas. En caso de eliminación del producto, hacerlo con abundante agua del grifo.
- Los materiales utilizados en la producción de los productos fueron analizados en origen mediante tests microbiológicos aprobados y resultaron ser negativos para el antígeno HBs, HCV y para el anti-HIV (1/2). Sin embargo, deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.
- Ningún medio puede garantizar que los productos derivados de fuentes humanas o animales están libres de enfermedades infecciosas. Manipular y desechar con precaución los viales y su contenido.
- Para mayor información sobre la eliminación del producto o descontaminación en caso de derrame, ver las fichas de seguridad.

NOTAS

- Se recomienda la utilización de un control positivo (idealmente células R_{1r}), un control negativo (idealmente células rr) y un reactivo de control negativo para testar de forma paralela en cada tanda de tests. Los tests deben considerarse inválidos si los controles no muestran los resultados esperados.
- Durante el tipado de hematíes de un paciente es importante incluir un control negativo, debido a que los potenciadores macromoleculares del reactivo pueden provocar falsas reacciones positivas con las células recubiertas de IgG.
- Para determinación de la categoría D^{VI} testar las muestras sólo mediante las técnicas de **Antiglobulina Indirecta o Coombs Diamed-ID**.
- Los antígenos D débiles y variantes son mal detectados a través de placas de gel, placas microtitulo y porta. Por ello, se recomienda utilizar la técnica en tubo.
- La técnica antiglobulina en tubo sólo puede considerarse válida si todos los tests negativos reaccionan de forma positiva con células sensibilizadas con IgG.
- En las técnicas aquí recomendadas un volumen es aproximadamente 40 µl utilizando el gotero suministrado.
- La utilización de los reactivos y la interpretación de los resultados deben llevarse a cabo por personal cualificado y formado de acuerdo a los requisitos del país donde los reactivos están siendo utilizados.
- El usuario debe determinar la idoneidad de los reactivos para otras técnicas.

CONSERVACIÓN

No congelar. Los viales de reactivo deben ser conservados a 2-8°C. Almacenamientos prolongados, a temperaturas fuera de este rango, pueden provocar una aceleración de la pérdida de reactividad.

MATERIAL NECESARIO

- Tubos de vidrio (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Centrífuga de tubos.
- Baño o incubador equilibrado a 37°C ± 2°C.
- Pipetas volumétricas.
- Portaobjetos de vidrio para el microscopio.
- Stik aplicador.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,9%, pH 7,0 ± 0,2 a 22°C ± 1°C.
- Hematíes control Positivos (idealmente R_{1r}) y negativos (rr).
- Placas - *DiaMed ID* (Neutra).
- Placas - *DiaMed ID* (AHG/Coombs).
- Centrífuga *DiaMed ID*.
- Diluyente *DiaMed ID*.
- Incubador *DiaMed ID* equilibrado a 37°C ± 2°C.
- Agitados de placas.
- Lector automático de placas.
- Microplacas de pocillos "U" validadas.
- Centrífuga de microplacas.

MUESTRAS

Para el tipado de antígenos debe utilizarse muestras de sangre recogidas con o sin anticoagulante. Si el test no se realiza de inmediato, conservar las muestras a 2-8°C. Las muestras en EDTA o citrato deben ser tipadas en 48 horas. Las muestras recogidas en ACD, CPD o CPDA-1 pueden ser testadas hasta 35 días desde su retirada. Todas las muestras de sangre deben ser lavadas con PBS al menos dos veces antes de realizar el test. Todas las muestras de sangre que muestren evidencias de lisis pueden dar lugar a resultados no fiables.

PROCEDIMIENTO (NO PARA CATEGORÍA D^{VI})
A. Método en Tubo

- Preparar una suspensión de hematíes a testar lavados al 2-3% en PBS.
- Añadir en un tubo identificado: 1 volumen de reactivo Anti-D y un volumen de la suspensión de hematíes.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente por aglutinación.
- Cualquier tubo que muestre un resultado negativo o cuestionable, debe ser incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Tras la incubación, repetir los pasos 3 y 4.

B. Método en Porta

- Preparar una suspensión de hematíes a testar al 35-45% en suero, plasma o PBS.
- Depositar en un porta identificado: 1 volumen del reactivo Anti-D y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
- Utilizando un *stik* aplicador limpio, mezclar el reactivo y las células en una área de unos 20 x 40 mm.
- Lentamente inclinar el porta de atrás a delante durante 30 segundos, ocasionalmente con un período adicional de mezcla de 2 minutos, manteniendo el porta a temperatura ambiente.
- Leer macroscópicamente tras 2 minutos sobre una luz difusa y no confundir las fibras de fibrina con la aglutinación.
- Cualquier reacción débil debe ser repetida con la técnica en tubo.

C. Técnica de Micro tipado DiaMed-ID

- Preparar una suspensión del 0,8% de hematíes a testar lavados en Diluyente ID.
- Preparar hojas de aluminio para tantos microtubos como sean necesarios.
- Depositar en el microtubo apropiado: 50 µl de suspensión de hematíes y 25 µl de reactivo Anti-D.
- Centrifugar las tarjetas *ID-Card(s)* durante 10 minutos a 90 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Leer macroscópicamente por aglutinación.

D. Técnica de Microplaca, usando pocillos "U"

- Preparar una suspensión de los hematíes a testar lavados al 2-3% en PBS.
- Depositar en el pocillo apropiado: 1 volumen de reactivo Anti-D y 1 volumen de suspensión de hematíes.
- Mezclar minuciosamente, preferiblemente usando un agitador de microplacas, cuidando de evitar cualquier contaminación cruzada.
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos (tiempo en función del usuario).
- Centrifugar la microplaca durante 1 minuto a 140 rcf o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Resuspender el botón celular mediante una agitación cuidadosamente controlada en un agitador de microplacas.
- Leer macroscópicamente o con un lector automático validado.
- Cualquier reacción débil debe ser repetida a través de la técnica en tubo.

PROCEDIMIENTO (PARA LA DETECCIÓN DE LA CATEGORÍA D^{VI})
A. Técnica antiglobulina indirecta

- Preparar una suspensión al 2-3% de los hematíes a testar lavados en PBS.
- Depositar en un tubo identificado: 1 volumen del reactivo Anti-D y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
- Mezclar minuciosamente e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- Lavar 4 veces los hematíes en PBS cuidando de decantar la solución salina entre lavados y resuspendiendo el botón celular tras cada lavado. Tras el último lavado, decantar completamente la solución salina.
- Añadir 2 volúmenes de antiglobulina humana o anti-IgG a cada botón celular.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente.

B. Técnica de Micro tipado DiaMed-ID

- Preparar una suspensión del 0,8% de hematíes a testar lavados en Diluyente ID.
- Preparar hojas de aluminio para tantos microtubos como sean necesarios.
- Depositar en el microtubo apropiado: 50 µl de suspensión de hematíes y 25 µl de reactivo Anti-D.
- Incubar las tarjetas *ID-Card(s)* durante 15 minutos a 37°C.
- Centrifugar las tarjetas *ID-Card(s)* durante 10 minutos a 1000 r.p.m.
- Leer macroscópicamente por aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo:** La aglutinación constituye un resultado positivo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la presencia del antígeno D en los hematíes testados.
- Negativo:** La ausencia de aglutinación de hematíes constituye un resultado negativo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la ausencia del antígeno D en los hematíes testados.
- Los resultados de células que aglutinen con el control negativo deben excluirse, puesto que la aglutinación es probablemente causada por el efecto de los potenciadores macromoleculares del reactivo en células sensibilizadas.

Estabilidad de las reacciones

- Leer los tests realizados en microplacas y tubos directamente tras la centrifugación.
- Las etapas de lavado deben completarse sin interrupción alguna y la centrifugación y lectura debe realizarse inmediatamente tras la adición del reactivo. Los retrasos pueden suponer la disociación de los complejos antígeno-anticuerpo, causando falsos negativos o resultados positivos débiles.
- Los tests en porta deben ser interpretados en 2 minutos a fin de asegurar la especificidad y evitar la posibilidad de que un resultado negativo sea incorrectamente interpretado como positivo debido al secado del reactivo.
- Los resultados, de tests realizados a otras temperaturas de las aquí recomendadas, deben ser interpretados con cautela.

LIMITACIONES

- El reactivo Spinreact Anti-D no es adecuado para su utilización con células tratadas enzimáticamente o resuspendidas en LISS.
- La sangre almacenada puede dar lugar a reacciones más débiles que la sangre fresca.
- Puede observarse falsa aglutinación positiva en células sensibilizadas con IgG.
- Puede también ocurrir falsos resultados positivos o negativos debido a:
 - Contaminación de los materiales del test
 - Conservación inadecuada, concentración celular, tiempo o temperatura de incubación
 - Centrifugación inapropiada o excesiva
 - Desviación de las técnicas recomendadas
- El usuario es responsable del funcionamiento de los reactivos en cualquier otro método distinto de los mencionados como técnicas aquí detalladas.
- Cualquier desviación de las técnicas aquí recomendadas debería ser validada antes de su utilización⁹.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Los reactivos han sido caracterizados para todos los procedimientos aquí mencionados.
- Previamente a su liberación, cada lote de Spinreact Anti-D es testado, a través de las técnicas recomendadas frente a un panel de hematíes antígeno-positivo, a fin de asegurar la adecuada reactividad.
- La especificidad en origen de los anticuerpos monoclonales está demostrada frente a un panel de hematíes antígenos-negativos.
- La potencia del reactivo ha sido testado frente a un estándar de referencia de potencia mínima Anti-D 99/836, obtenido del *National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC)*.
- El Control de Calidad de los reactivos se llevó a cabo utilizando hematíes lavados dos veces en PBS, previa utilización.
- Los reactivos cumplen las recomendaciones de la última versión de las Guías para los Servicios de transfusión de sangre del Reino Unido.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Tipset 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.

PRESENTACIÓN

Anti-D IgG + IgM	Ref: 1700021	10 ml
------------------	--------------	-------





Anti-D IgG +IgM Monoclonal

Tube, Slide, DiaMed-ID and Microplate Tests Blood Grouping

Qualitative test for determination of D antigen on human red blood cells.

IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

The reagent will cause direct agglutination (clumping) of test red cells that carry the D antigen and indirect agglutination of test red cells that are Category D^{VI} in the anti-globulin phase of testing. No agglutination generally indicates the absence of the D antigen (see **Limitations**).

CLINICAL SIGNIFICANCE

Levine and Stetson discovered the Rh blood group system in 1940. The D antigen is the most clinically significant non-ABO red blood cell antigen and the corresponding antibodies have been implicated in causing both Transfusion Reactions and Haemolytic Disease of the Newborn.

Anti-D	Phenotype	Caucasians %	Afro-Americans %
+	Rh D +ve	85	72
0	Rh D -ve	15	28

Weakened expression of the RhD antigen

The collective term D^W is widely used to describe red cells which have a weaker expression of the D antigen than normal. The term weak D denotes individuals with a reduced number of complete D antigen sites per red cell. The term partial D denotes individuals with missing D antigen epitopes. DVI is a partial D category which misses most D epitopes. The reagent will detect most examples of partial and weak D red cells by direct agglutination, but will not detect DVI cells. This reagent will detect DVI and partial D cells in the IAT phase.

REAGENTS

Spinreact Monoclonal Anti-D blood grouping reagent is a low protein, blended reagent containing human monoclonal IgM and IgG diluted in a phosphate buffer containing sodium chloride (0.9 g%), bovine albumin (3 g%) and macromolecular potentiators. When typing patient samples, this reagent will directly agglutinate Rh D positive cells, including majority of variants (**but not D^{VI}**) and a high proportion of weak D (D^W) phenotypes when using the recommended techniques. The reagent is supplied at optimal dilution for use on patient samples with all recommended techniques stated below without need for further dilution or addition. For lot reference number and expiry date see **Vial Label**.

IgM / IgG	Cell Line / Clone
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

PRECAUTIONS

- The reagents is intended for *in vitro* diagnostic use only.
- If a reagent vial is cracked or leaking, discard the contents immediately.
- Do not use the reagent past the expiration date (see **Vial Label**).
- Do not use the reagent if a precipitate is present.
- Protective clothing should be worn when handling the reagent, such as disposable gloves and a laboratory coat.
- The reagents have been filtered through a 0.2 µm capsule to reduce the bio-burden. Once a vial has been opened the contents should remain viable up until the expiry date as long as there is no marked turbidity, which can indicate reagent deterioration or contamination.
- The reagents contain < 0.1% sodium azide. Sodium azide may be toxic if ingested and may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal flush away with large volumes of water.
- Materials used to produce the products were tested at source and found to be negative for HIV 1+2 and HCV antibodies and HBsAg using approved microbiological tests.
- No known tests can guarantee that products derived from human or animal sources are free from infectious agents. Care must be taken in the use and disposal of each vial and its contents.
- For information on disposal of the reagent and decontamination of a spillage site see **Material Safety Data Sheets**, available on request.

NOTES

- It is recommended a positive control (ideally R₁r cells), a negative control (ideally rr cells) and a reagent negative control be tested in parallel with each batch of tests. Tests must be considered invalid if controls do not show expected results.
- When typing red cells from a patient it is important that a reagent negative control is included since the macromolecular potentiators in the reagent may cause false positive reactions with IgG coated cells.
- Test samples for category D^{VI} determination by the **Indirect Antiglobulin** and **Coombs DiaMed-ID Techniques** only.
- Weak and variant D antigens are poorly detected by gel card, microtitre plate and slide techniques. It is recommended that that weak and partial variants are tested using the tube test technique.
- The antiglobulin tube technique can only be considered valid if all negative tests react positively with IgG sensitised red cells.
- In the here recommended techniques one volume is approximately 40µl when using the vial dropper provided.
- The use of reagents and interpretation of results must be carried out by properly trained and qualified personnel in accordance with requirements of the country where the reagents are in use.
- The user must determine suitability of the reagents for use in other techniques.

STORAGE

Do not freeze. Reagent vials should be stored at 2 - 8°C on receipt. Prolonged storage at temperatures outside this range may result in accelerated loss of reagent reactivity.

MATERIAL REQUIRED

- Glass test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- Test tube centrifuge.
- Water bath or dry heat incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Volumetric pipettes.
- Glass microscope slides.
- Applicator sticks.
- Phosphate Buffered Saline (PBS): NaCl 0.9%, pH 7.0 ± 0.2 at 22°C ± 1°C.
- Positive (ideally R₁r) and negative (rr) control red cells.
- DiaMed ID-Cards (Neutral).
- DiaMed ID-Cards (AHG/Coombs).
- DiaMed ID-Centrifuge.
- DiaMed ID-Diluent: e.g. ID-CellStab.
- DiaMed ID-Incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Plate shaker.
- Automatic plate reader.
- Validated "U" well microplates.
- Microplate centrifuge.

SAMPLE

Blood samples drawn with or without anticoagulant may be used for antigen typing. If testing is delayed then store specimens at 2-8°C. EDTA and citrate samples should be typed within 48 hours. Samples collected into ACD, CPD or CPDA-1 may be tested up to 35 days from the date of withdrawal. All blood samples should be washed at least twice with PBS before being tested. Blood samples showing evidence of lysis may give unreliable results.

PROCEDURE (NOT CATEGORY D^{VI})

A. Tube Method

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in a labelled test tube: 1 volume of Anti-D reagent and 1 volume test red cell suspension.
- Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.

- Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination
- Any tubes, which show a negative or questionable result (which can happen with D^W or weak D samples), should be incubated for 15 minutes at room temperature.
- Following incubation, repeat steps 3 and 4.

B. Slide Method

- Prepare a 35-45% suspension of test red cells in serum, plasma or PBS.
- Place on a labelled glass slide: 1 volume of Anti-D reagent and 1 volume of test red cell suspension.
- Using a clean applicator stick, mix reagent and cells over an area of about 20 x 40 mm.
- Slowly tilt the slide back and forth for 30 seconds, with occasional further mixing during the 2-minute period, maintaining slide at room temperature.
- Read macroscopically after 2 minutes over a diffuse light and do not mistake fibrin strands as agglutination.
- Any weak reactions should be repeated by the tube technique.

C. DiaMed-ID Micro Typing Technique

- Prepare a 0.8% suspension of washed test red cells in ID-Diluent.
- Remove aluminium foil from as many microtubes as needed.
- Place in appropriate microtube: 50µl of test red cell suspension and 25µl of Anti-D reagent.
- Centrifuge the ID-Card(s) for 10 minutes at 90 rcf or for a suitable alternative time and force.
- Read macroscopically for agglutination.

D. Microplate Technique, using "U" wells

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in the appropriate well: 1 volume of Anti-D reagent and 1 volume test red cell suspension.
- Mix thoroughly, preferably using a microplate shaker, taking care to avoid cross-well contamination.
- Incubate at room temperature for 15 minutes (time dependant on user).
- Centrifuge the microplate for 1 minute at 140 rcf or for a suitable alternative time and force.
- Resuspend the cell buttons using carefully controlled agitation on a microplate shaker
- Read macroscopically or with a validated automatic reader.
- Any weak reactions should be repeated by the tube technique.

RECOMMENDED TECHNIQUES (TO DETECT CATEGORY D^{VI})

A. Indirect Antiglobulin Technique (IAT)

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in a labelled test tube: 1 volume of Anti-D reagent and 1 volume of test red cell suspension.
- Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
- Wash test red cells 4 times with PBS, taking care to decant saline between washes and resuspend each cell button after each wash. Completely decant saline after last wash.
- Add 2 drops of anti-human globulin or anti-IgG to each dry cell button.
- Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf for a suitable alternative time and force.
- Resuspend each cell button and read macroscopically.

B. DiaMed-ID Micro Typing Technique (AHG/Coombs cards)

- Prepare 0.8% suspension of washed test red cells in ID-Diluent.
- Remove aluminium foil from as many microtubes as needed.
- Place in appropriate microtube: 50µl of test red cell suspension and 25µl of Anti-D reagent.
- Incubate the ID-Card(s) for 15 minutes at 37°C.
- Centrifuge the ID-Card(s) for 10 minutes at 1000 rpm.
- Read macroscopically for agglutination.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

- Positive:** Agglutination of the test red cells constitutes a positive test result and within accepted limitations of test procedure, indicates the presence of the D antigen on the test red cells.
- Negative:** No agglutination of the test red cells constitutes a negative result and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the absence of the D antigen on the test red cells.
- Test results of cells that are agglutinated using the reagent negative control shall be excluded, as the agglutination is most probably caused by the effect of the macromolecular potentiators in the reagent on sensitised cells.

Stability of the reactions

- Read all tube and microplate tests straight after centrifugation.
- Complete washing steps without interruption and centrifuge and read tests immediately after reagent addition because delays may result in dissociation of antigen-antibody complexes, leading to false negative or weak positive reactions.
- Slide tests should be interpreted within two minutes to ensure specificity and to avoid the possibility a negative result may be incorrectly interpreted as positive due to drying of the reagent.
- Caution should be exercised in the interpretation of results of tests performed at temperatures other than those recommended.

LIMITATIONS

- Spinreact Anti-D reagent is not suitable for use with enzyme treated cells or cells suspended in LISS.
- Stored blood may give weaker reactions than fresh blood
- False positive agglutination may be seen when testing IgG sensitised cells.
- False positive or false negative results may also occur due to:
 - Contamination of test materials
 - Improper storage, cell concentration, incubation time or temperature
 - Improper or excessive centrifugation
 - Deviation from the recommended techniques
- The user is responsible for the performance of the reagents by any method other than those here mentioned.
- Any deviations from the here recommended techniques should be validated prior to use⁹.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- The reagent has been characterised by all the procedures here mentioned.
- Prior to release, each lot of Spinreact Anti-D, is tested by the here recommended techniques against a panel of antigen-positive red cells to ensure suitable reactivity.
- Specificity of source monoclonal antibodies is demonstrated using a panel of antigen-negative cells.
- The potency of the reagent has been tested against the following minimum potency reference standard obtained from National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC): Anti-D reference 99/836.
- The Quality Control of the reagents was performed using red cells that had been washed twice with PBS prior to use.
- The reagents comply with the recommendations contained in the latest issue of the Guidelines for the UK Blood Transfusion Services.

BIBLIOGRAPHY

- 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.

PACKAGING

Anti-D IgG + IgM	Ref: 1700021	10 ml
------------------	--------------	-------



Détermination qualitative de l'antigène D dans les hématies humaines IVD

A conserver à 2-8°C.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le réactif provoque l'agglutination directe des hématies qui contiennent l'antigène D et l'agglutination indirecte des hématies de la Catégorie D^{VI} dans la phase antiglobuline de l'essai. L'absence d'agglutination est en général le signe de l'inexistence de l'antigène D (voir **Limitations**).

SIGNIFICATION CLINIQUE

En 1940, Levine et Stetson ont découvert le système Rh du groupe sanguin. L'antigène D est le plus significatif des antigènes d'hématies qui n'appartiennent pas au système ABO. Les anticorps correspondants ont été impliqués dans les réactions transfusionnelles, ainsi que dans la maladie hémolytique du nouveau-né.

Anti-D	Phénotype	Caucasiens %	Afro-Américains %
+	Rh D +vo	85	72
0	Rh D -vo	15	28

Expression faible de l'antigène RhD

L'Anti-D de Spinreact est un réactif très peu protéique combiné qui contient des anticorps humains monoclonaux IgM et IgG dilués dans un tampon phosphate avec du chlorure de sodium (0,9 g%), de l'albumine bovine (3 g%) et des améliorateurs macromoléculaires. Pendant le typage des échantillons de patients, en appliquant les techniques ici recommandées, le réactif agglutinera directement les cellules RhD positives (mais pas D^{VI}) et une proportion élevée de phénotypes D faibles (D⁺). Le réactif est fourni dans la dilution maximale afin qu'il puisse être utilisé avec toutes les techniques que nous recommandons, sans besoin de dilutions ni d'additions supplémentaires. Se reporter au lot et à la date de péremption de chaque référence, inscrits sur l'étiquette du flacon.

RÉACTIFS

L'Anti-D de Spinreact est un réactif très peu protéique combiné qui contient des anticorps humains monoclonaux IgM et IgG dilués dans un tampon phosphate avec du chlorure de sodium (0,9 g%), de l'albumine bovine (3 g%) et des améliorateurs macromoléculaires. Pendant le typage des échantillons de patients, en appliquant les techniques ici recommandées, le réactif agglutinera directement les cellules RhD positives (mais pas D^{VI}) et une proportion élevée de phénotypes D faibles (D⁺). Le réactif est fourni dans la dilution maximale afin qu'il puisse être utilisé avec toutes les techniques que nous recommandons, sans besoin de dilutions ni d'additions supplémentaires. Se reporter au lot et à la date de péremption de chaque référence, inscrits sur l'étiquette du flacon.

IgM / IgG	Clone / Ligne cellulaire
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

PRÉCAUTIONS

- Les réactifs sont uniquement destinés à un usage diagnostic *in vitro*.
- Si le flacon du réactif est cassé ou fêlé, jeter immédiatement son contenu.
- Ne pas utiliser de réactifs périmés. (voir l'étiquette du flacon).
- Ne pas utiliser de réactifs qui présentent des précipités.
- La manipulation du réactif doit être réalisée avec un vêtement de protection approprié : gants jetables et blouse de laboratoire.
- Les réactifs ont été filtrés à travers des capsules de 0,2 µm pour réduire leur charge biologique. Une fois que le flacon est ouvert, le contenu restera viable jusqu'à la date de péremption à condition qu'aucune turbidité marquée n'apparaisse, celle-ci pouvant indiquer la détérioration ou contamination du réactif.
- Les réactifs contiennent < 0,1 % d'azide de sodium. L'azide de sodium peut être toxique, en cas d'ingestion et peut réagir avec le cuivre ou le plomb des tuyauteries et former des composés explosifs. En cas d'élimination du produit, laisser couler longtemps l'eau du robinet.
- Les matériaux utilisés dans la fabrication des produits ont été analysés à l'origine au moyen d'essais microbiologiques approuvés et se sont avérés négatifs pour l'antigène HBs, HCV et pour l'anti-HIV (1/2). Toutefois, ils doivent être traités avec précaution, c'est-à-dire comme des agents potentiellement infectieux.
- Aucune méthode ne peut garantir que les produits provenant de sources humaines ou animales sont exempts de maladies infectieuses. Manipuler et jeter avec précaution les flacons et leur contenu.
- Pour de plus amples informations sur l'élimination du produit ou la décontamination en cas de déversement, consulter les fiches de sécurité.

NOTES

- Il est recommandé d'utiliser un contrôle positif (idéalement des cellules R_{1r}), un contrôle négatif (idéalement des cellules rr) et un réactif à contrôle négatif pour tester parallèlement chaque série d'essais. Les essais doivent être considérés comme non valables si les contrôles ne présentent pas les résultats attendus.
- Pendant le typage des hématies d'un patient, il est important d'inclure un contrôle négatif vu que les améliorateurs macromoléculaires du réactif peuvent provoquer de fausses réactions positives avec les cellules recouvertes d'IgG.
- Pour déterminer la catégorie D^{VI}, tester les échantillons uniquement avec les techniques de **test indirect à l'antiglobuline** ou de **Coombs Diamed-ID**.
- Les antigènes D faibles et les variantes sont insuffisamment détectés par les plaques de gel, plaques microtitre et lame. C'est pourquoi il est recommandé d'utiliser la technique du tube.
- La technique à l'antiglobuline en tube ne peut être considérée comme valable si tous les essais négatifs réagissent de manière positive par rapport aux cellules sensibilisées à l'IgG.
- Dans les techniques que nous recommandons, un volume équivaut environ à 40 µl quand on utilise le compte-gouttes fourni.
- L'utilisation des réactifs et l'interprétation des résultats doivent être réalisées par un personnel qualifié et formé en accord avec les réglementations en vigueur de chaque pays.
- L'utilisateur doit déterminer si le réactif convient pour une utilisation avec d'autres techniques.

CONSERVATION

Ne pas congeler. Les flacons de réactif doivent être conservés à 2-8°C. Des stockages prolongés à des températures non comprises dans cette plage peuvent accélérer la perte de réactivité.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- Tubes en verre (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Centrifugeuse de tubes.
- Bain ou incubateur équilibré à 37°C ± 2°C.
- Pipettes volumétriques.
- Lames porte-objets en verre pour le microscope.
- Stick applicateur.
- Tampon phosphate salin (PBS) : NaCl 0,9%, pH 7,0 ± 0,2 à 22°C ± 1°C.
- Hématies de contrôle positives (idéalement R_{1r}) et négatives (rr).
- Plaques - *DiaMed ID* (Neutre).
- Plaques - *DiaMed ID* (AHG/Coombs).
- Centrifugeuse *DiaMed ID*.
- Diluant *DiaMed ID*.
- Incubateur *DiaMed ID* équilibré à 37°C ± 2°C.
- Agitateurs de plaques.
- Lecteur automatique de plaques.
- Microplaques à puits fond « U » validées.
- Centrifugeuse de microplaques.

ÉCHANTILLONS

Pour le typage d'antigènes, il faut utiliser des échantillons de sang prélevés avec ou sans anticoagulant. Si l'essai n'est pas réalisé dans l'immédiat, conserver les échantillons à 2-8°C. Les échantillons dans de l'EDTA ou du citrate doivent être typés dans les 48 heures. Les échantillons prélevés dans de l'ACD, CPD ou CPDA-1 peuvent être utilisés pendant 35 jours maximum à partir de leur prélèvement. Tous les échantillons de sang doivent être lavés avec du PBS au moins deux fois, avant de réaliser l'essai. Tous les échantillons de sang avec des évidences de lyse peuvent donner des résultats non fiables.

PROCÉDURE (PAS POUR CATÉGORIE D^{VI})

A. Méthode en Tube

- Préparer une suspension d'hématies lavées à 2-3 % dans du PBS pour l'essai.
- Mettre dans un tube identifié : 1 volume de réactif Anti-D et 1 volume de la suspension d'hématies.
- Mélanger minutieusement et centrifuger les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et un temps alternatifs adaptés.
- Remettre en suspension soigneusement le bouton cellulaire, puis lire de manière macroscopique par agglutination.
- Tout tube qui présente un résultat négatif ou contestable doit être incubé pendant 15 minutes à température ambiante.
- Après l'incubation, répéter les étapes 3 et 4.

B. Méthode sur lame

- Préparer une suspension d'hématies à 35-45 % dans du sérum, plasma ou PBS, pour l'essai.
- Déposer sur une lame identifiée : 1 volume de réactif Anti-D et 1 volume de la suspension d'hématies.
- En utilisant un *stick* applicateur propre, mélanger le réactif et les cellules sur une zone de 20 X 40 mm.
- Pencher lentement la lame porte-objets de l'arrière vers l'avant pendant 30 secondes ; à certaines occasions, mélanger pendant 2 minutes supplémentaires, en maintenant la lame à température ambiante.
- Lire de manière macroscopique 2 minutes après, contre une lumière diffuse et ne pas confondre les fibres de fibrine avec l'agglutination.
- Toute réaction doit être répétée avec la technique du tube.

C. Technique de Micro-typage DiaMed-ID

- Préparer une suspension de 0,8% d'hématies lavées dans du diluant D, pour l'essai.
- Préparer des feuilles d'aluminium pour autant de microtubes que nécessaire.
- Déposer dans le microtube approprié : 50µl de suspension d'hématies et 25 µl de réactif Anti-ABO.
- Centrifuger les cartes *ID-Card(s)* pendant 10 minutes à 90 rcf (g) ou à une force et un temps alternatifs adaptés.
- Lire de manière macroscopique par agglutination.

D. Technique de Microplaque, avec utilisation de puits fond «U»

- Préparer une suspension d'hématies lavées à 2-3 % dans du PBS, pour l'essai.
- Déposer dans le puits approprié : 1 volume de réactif Anti-D et 1 volume de la suspension d'hématies.
- Mélanger minutieusement, de préférence en utilisant un agitateur de microplaques, en prenant soin d'éviter toute contamination croisée.
- Incuber à température ambiante pendant 15 minutes (temps en fonction de l'utilisateur).
- Centrifuger la microplaque pendant 1 minute à 140 rcf (g) ou à une force et un temps alternatifs adaptés.
- Remettre en suspension le bouton cellulaire avec une agitation dément contrôlée dans un agitateur de microplaques.
- Lire de manière macroscopique ou avec un lecteur automatique valide.
- Toute réaction doit être répétée avec la technique du tube.

PROCÉDURE (POUR LA DÉTECTION DE LA CATÉGORIE D^{VI})

A. Technique antiglobuline indirecte

- Préparer une suspension à 2-3 % d'hématies lavées dans du PBS avant l'essai.
- Déposer sur un tube identifié : 1 volume de réactif Anti-D et 1 volume de la suspension d'hématies.
- Mélanger minutieusement et incuber à 37°C pendant 15 minutes.
- Laver 4 fois les hématies dans du PBS en veillant à ce que la solution saline décante entre les lavages et en remettant en suspension le bouton cellulaire après chaque lavage. Après le dernier lavage, décanter complètement la solution saline.
- Ajouter 2 volumes d'antiglobuline humaine ou anti-IgG à chaque bouton cellulaire.
- Mélanger soigneusement et centrifuger les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (g) ou à une force et un temps alternatifs adaptés.
- Remettre en suspension soigneusement le bouton cellulaire et lire avec un microscope.

B. Technique de Micro-typage DiaMed-ID

- Préparer une suspension de 0,8% d'hématies lavées dans du diluant ID, avant l'essai.
- Préparer des feuilles d'aluminium pour autant de microtubes que nécessaire.
- Déposer dans le microtube approprié : 50µl de suspension d'hématies et 25 µl de réactif Anti-D.
- Incuber les cartes *ID-Card(s)* pendant 15 minutes à 37°C.
- Centrifuger les cartes *ID-Card(s)* pendant 10 minutes à 1000 r.p.m.
- Lire de manière macroscopique par agglutination.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Positif** : L'agglutination constitue un résultat positif ; dans les limites acceptées pour la mise en œuvre de la technique, elle signale la présence appropriée d'antigène D dans les hématies.
- Négatif** : L'absence d'agglutination d'hématies constitue un résultat négatif ; dans les limites acceptées pour la mise en œuvre de la technique, elle signale l'absence de l'antigène approprié D dans les hématies.
- Les résultats de cellules qui s'agglutinent avec le contrôle négatif doivent être exclus, vu que l'agglutination est probablement causée par l'effet des améliorateurs macromoléculaires du réactif sur les cellules sensibilisées.

Stabilité des réactions

- Les essais réalisés sur microplaques et tubes immédiatement après la centrifugation.
- Les étapes de lavage doivent être réalisées sans aucune interruption et la centrifugation et la lecture doivent être réalisées immédiatement après l'ajout du réactif. Les retards peuvent impliquer la dissociation des complexes antigène-anticorps, et produire de faux négatifs ou de faibles résultats positifs.
- Les essais sur lame doivent être interprétés dans un intervalle de 2 minutes afin de garantir leur spécificité et d'éviter la possibilité qu'un résultat négatif soit interprété à tort comme positif, en raison du dessèchement du réactif.
- Les résultats des essais réalisés à des températures distinctes de celles recommandées doivent être interprétés avec précaution.

LIMITATIONS

- Le réactif Spinreact Anti-D n'est pas adapté pour une utilisation avec des cellules traitées de manière enzymatique ou remises en suspension dans une solution LISS.
- Le sang stocké peut donner lieu à des réactions plus faibles que le sang frais.
- On peut observer une fausse agglutination positive dans des cellules sensibilisées avec l'IgG.
- Il peut également se produire de faux résultats positifs ou négatifs en raison de :
 - La contamination des matériaux de l'essai
 - La conservation inadéquate, la concentration cellulaire, le temps ou la température d'incubation.
 - La centrifugation inappropriée ou excessive
 - Un écart par rapport aux techniques recommandées
 - L'utilisateur est responsable du fonctionnement des réactifs s'il recourt à toute autre méthode distincte de celles susmentionnées.
 - Tout écart par rapport aux techniques ici recommandées doit être validé avant utilisation⁸.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

- Les réactifs ont été définis pour toutes les mises en œuvre que nous avons détaillées.
- Avant leur mise sur le marché, chaque lot de Spinreact Anti-D est testé par le biais des techniques que nous avons recommandées, et avec un panel d'hématies antigènes-positif, afin de garantir la réactivité adaptée.
- La spécificité à l'origine des anticorps monoclonaux est prouvée par rapport à un panel d'hématies antigènes-négatif.
- La puissance des réactifs a été testée au regard des standards de référence de puissance minimale qui suivent, ceux-ci ayant été obtenus auprès du *National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC)*.
- La puissance des réactifs a été testée au regard des standards de référence de puissance minimale Anti-D 99/836, obtenus auprès du *National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC)*.
- Les réactifs satisfont aux recommandations de la dernière version des Guides pour les Services de transfusion de sang du Royaume-Uni.

BIBLIOGRAPHIE

- 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.*
- Tipsett P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. Medical Laboratory Science 1988; 45: 89-93*
- 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.*

PRÉSENTATION

Anti-D IgG + IgM	Réf. : 1700021	10 mL
------------------	----------------	-------



1434

Anti-D IgG +IgM**Para técnicas em Tubo, Microplaca e Lâmina**
Grupos sanguíneos**Determinação qualitativa de antígeno D em células vermelhas IVD**

Conservar a 2-8°C

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O reagente causa a aglutinação direta das células vermelhas teste que carregam o antígeno D, e a aglutinação indireta das células vermelhas categorizadas como D^{VI} na fase antiglobulina do teste. A ausência de aglutinação geralmente indica a ausência do antígeno D (ver LIMITAÇÕES).

SIGNIFICADO CLÍNICO

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 nas doenças hemolíticas dos recém-nascidos.

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

Expressão enfraquecida do antígeno RhD

O termo coletivo D⁺ é largamente usado 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 células vermelhas. O termo D parcial indica indivíduos com falta de epitópos D. A célula D^{VI} é uma categoria D parcial onde falta a maioria das epitópos D. O Reagente Anti-D DuoClone detectará a maioria das células vermelhas D fraca e parcial por aglutinação direta, mas não detectará células D^{VI}. Este reagente detectará D^{VI} e células "D parcial" na fase IAT.

REAGENTES

O reagente de grupo sanguíneo Anti-D DuoClone Monoclonal Spinreact é um reagente com baixa proteína, contendo IgM e IgG anti-D monoclonais diluídos em tampão fosfato, contendo cloreto de sódio 0,9%, albumina bovina 3% e potencializadores macromoleculares. Na tipificação das amostras de pacientes, usando as técnicas recomendadas, este reagente irá aglutinar diretamente células RhD positivas, incluindo a maioria de variantes (exceto D^{VI}) e uma grande proporção de fenótipos fracos D(D⁺). 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.

IgM / IgG	Linha Celular /Clone
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

PRECAUÇÕES

- O reagente é somente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Se o frasco estiver rachado ou vazando, descartar o conteúdo imediatamente.
- Não utilizar reagentes fora da data de validade (ver etiquetas).
- Não utilizar reagentes se houver presença de precipitados.
- Durante a manipulação dos reagentes, deve-se utilizar equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas descartáveis e aventais de proteção (jalecos).
- 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.
- Este reagente possui azida sódica (<0,1%) e é classificado pelas Diretrizes Aplicáveis da Comunidade Europeia (CE) como nocivo (Xn).
- Os materiais usados foram testados como negativos para HBsAg e anticorpos anti HIV1+2 e HCV com técnicas microbiológicas aprovadas.
- Nenhuma 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.
- Para mais informações sobre a eliminação do produto ou descontaminação no caso de derrame, consulte as fichas de segurança.

NOTAS

- 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.
- 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 a utilização do Controle Negativo para Reagente Monoclonal Anti-D Spinreact.
- As variantes do antígeno D parcial e fraco são frequentemente detectadas pela técnica de cartões de gel, placa e lâmina. Recomenda-se o uso da técnica em tubos.
- A determinação de amostras teste de categoria D^{VI} é feita somente pela Técnica de Antiglobulina Indireta.
- A técnica em tubo de antiglobulina somente pode ser considerada válida se todos os testes negativos reagirem positivamente com células vermelhas sensibilizadas por IgG.
- Nas Técnicas Recomendadas um volume corresponde a aproximadamente 40 µl, quando usado o conta-gotas fornecido com o frasco.
- 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.
- O usuário deve determinar a adequação do reagente para o uso em outras técnicas.

CONSERVAÇÃO

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

MATERIAL NECESSÁRIO

- Bastões aplicadores
- Leitor de placas automático
- Lâminas de vidro para microscopia
- Tubos teste de vidro (10 x 75mm ou 12 x 75mm)
- Centrifuga 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)
- Placas - DiaMed ID (Neutra).
- Placas - DiaMed ID (AHG/Coombs).
- Centrifuga DiaMed ID.
- Solvente DiaMed ID.
- Incubadora DiaMed ID equilibrada a 37°C ± 2°C.
- Tubos teste de centrifuga
- Microplacas "U" validadas.
- Pipetas volumétricas
- Banho maria ou incubadora equilibrada a 37°C ± 2°C.

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 de 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 a 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.

TECNICAS RECOMENDADAS (NÃO PARA CATEGORIA D^{VI})**A. Técnica em Tubo**

- Preparar uma suspensão de células vermelhas a testar a 2-3% lavadas em tampão PBS.
- Colocar em um tubo teste etiquetado: 1 volume de Reagente DuoClone Spinreact e 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar.
- Centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
- Ressuspender suavemente a base de células vermelhas e ler a aglutinação macroscopicamente.
- Qualquer tubo que apresentar um resultado negativo ou duvidoso (que pode ocorrer com amostras D^{VI} ou D fraca), deve ser incubado por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Após a incubação, repetir as etapas 3 e 4.

B. Técnica em Lâmina

- Preparar uma suspensão a 35-45% de células vermelhas a testar em PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
- Colocar em uma lâmina de vidro marcada: 1 volume de Reagente DuoClone Spinreact 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 vagorosamente 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.

C. Técnica de Microtipagem DiaMed-ID

- Preparar uma suspensão com 0,8% de hemácias a testar lavadas em Solvente ID.
- Preparar folhas de alumínio para tantos micro tubos quantos sejam necessários.
- Depositar no micro tubo apropriado: 50 µl da suspensão de hemácias e 25µl do reagente Anti-D.
- Centrifugar as placas ID-Card(s) durante 10 minutos a 90 rcf (g) ou a uma força e tempo alternativos adequados.
- Ler macroscopicamente por aglutinação.

D. Método em Microplaca Usando Cavidades em 'U'

- Preparar uma suspensão de células vermelhas a testar a 2-3% lavadas em tampão PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
- Colocar na cavidade adequada: 1 volume de Reagente DuoClone Spinreact e 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar.
- Misturar totalmente, preferivelmente com um agitador de microplacas, tomando cuidado para evitar a contaminação cruzada entre as cavidades.
- 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.

TECNICAS RECOMENDADAS (PARA A DETECÇÃO DE CATEGORIA D^{VI})**A. Técnica de antiglobulina indireta (IAT)**

- Preparar uma suspensão de células vermelhas a testar a 2-3% lavadas em PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
- Colocar em um tubo teste etiquetado: 1 volume de Reagente DuoClone Spinreact e 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar.
- Misturar totalmente e incubar a temperatura de 37°C por 15 minutos.
- Lavar as células vermelhas teste 4 vezes com PBS ou Solução Fisiológica 0,9%, tomando cuidado para decantar a salina entre as lavagens e ressuspender cada base de células vermelhas após cada lavagem. Decantar completamente a salina após a última lavagem.
- Adicionar 2 volumes de anti-globulina humana ou anti-IgG a cada base de células seca.
- Misturar e Centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
- Ressuspender suavemente a base de células vermelhas e ler a aglutinação macroscopicamente.

B. Técnica de Microtipagem DiaMed-ID

- Preparar uma suspensão com 0,8% de hemácias a testar lavadas em Solvente ID.
- Preparar folhas de alumínio para tantos micro tubos quantos sejam necessários.
- Depositar no micro tubo apropriado: 50µl da suspensão de hemácias e 25µl do reagente Anti-D.
- Incubar as placas ID-Card(s) durante 15 minutos a 37°C.
- Centrifugar as placas ID-Card(s) durante 10 minutos a 1000 r.p.m.
- Ler macroscopicamente por aglutinação.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Positivo:** A aglutinação das células vermelhas teste constitui um resultado positivo e, dentro das limitações aceitas do procedimento, indica a presença do antígeno D nas células vermelhas teste.
- Negativo:** A ausência de aglutinação das células vermelhas a testar constitui um resultado negativo e, dentro das limitações aceitas do procedimento, indica a ausência do antígeno D nas células vermelhas teste.
- 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.
- Completar todas as etapas de lavagem sem interrupção, centrifugar e ler imediatamente após a adição de antiglobulina humana. Um atraso pode resultar na dissociação dos complexos antígeno-anticorpo, levando a resultados falso-negativos ou reações fracamente positivas.
- Os testes de 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 Spinreact não é adequado para o uso com células tratadas com enzimas ou células suspensas em LISS.
- O sangue armazenado pode fornecer resultados mais fracos que o sangue fresco.
- Aglutinação falso-positiva pode ser observada quando testada células sensibilizadas por IgG.
- 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.
 - Desvio das técnicas recomendadas.
- O utilizador é responsável pelo funcionamento dos reagentes em qualquer outro método, diferente dos mencionados como técnicas aqui detalhadas.
- Qualquer desvio às técnicas aqui recomendadas deverá ser validada antes da sua utilização.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

- O reagente foi caracterizado pelos procedimentos mencionados nas **Técnicas Recomendadas**.
- Antes de ser liberado, cada lote de Anti-D DuoClone Monoclonal Spinreact foi testado pelas **Técnicas Recomendadas** contra um painel de células vermelhas antígeno positivas, para assegurar a reatividade adequada.
- A especificidade dos anticorpos monoclonais é demonstrada usando um painel de antígenos de células negativas.
- A potência dos reagentes foi testada contra os padrões de referência mínimos obtidos do NIBSC. Anti-D referência 99/836.
- O controle de qualidade deste reagente foi realizado usando células vermelhas lavadas 2 vezes com 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".

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.

APRESENTAÇÃO

Anti-D IgG + IgM	Ref: 1700021	10 ml
------------------	--------------	-------

