

**Determinación cualitativa de antígenos C, c, E, e en hematíes humanos IVD**

Conservar a 2-8°C

**PRINCIPIO DEL MÉTODO**

Los reactivos provocan la aglutinación directa de los hematíes que contengan el antígeno Rh correspondiente. La ausencia de aglutinación generalmente es indicativo de la inexistencia del correspondiente antígeno Rh (ver **Limitaciones**).

**SIGNIFICADO CLÍNICO**

En 1940 Levine y Stetson descubrieron el sistema Rh del grupo sanguíneo. Los principales antígenos Rh son, a parte del D, los C, E, c y e. El antígeno D es altamente inmunogénico. Los antígenos C y e son menos inmunogénicos que los E y c. Los correspondientes anticuerpos son clínicamente significativos puesto que pueden provocar Reacciones transfusionales, así como el Síndrome hemolítico del Recién Nacido.

Principales antígenos Rh				
D	C	E	c	e
85	70	30	80	98

Tabla 1: Frecuencia de cada antígeno en la población Caucásiana.

**REACTIVOS**

Los reactivos Spinreact IgM Monoclonales Anti-Rh contienen anticuerpos humanos monoclonales diluidos en cloruro sódico (0.9 g%), albúmina bovina (6 g%) y potenciadores macromoleculares. Cada 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.

Reactivo	Clon / Línea celular
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

Tabla 2: Líneas celulares humanas IgM / Clones usados.

**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 método 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 un heterocigoto) y un control negativo para testar de forma paralela en cada lote 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.
- Los antígenos Rhesus débiles pueden ser mal detectados a través de placas de gel, placas microtitulo y porta. Por ello, se recomienda utilizar la técnica en tubo.
- En las técnicas aquí recomendadas un volumen es aproximadamente 40µl 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 dónde 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.
- 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<sub>1</sub>r) y negativos (rr).
- Placas - *DiaMed ID* (Neutra).
- Centrífuga *DiaMed ID*.
- Diluyente *DiaMed ID*.
- 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**

**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-Rh 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-Rh 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 periodo 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 en Diluyente ID.
- Preparar hojas de aluminio para tantos microtubos como sean necesarios.
- Depositar en el microtubo apropiado: 50µl de suspensión de hematíes y 25 µl de reactivo Anti-Rh.
- Centrifugar las targetas *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-Rh 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.

**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 Rh apropiado en los hematíes testados.
- Negativo:** La ausencia de aglutinación de hematíes constituye un resultado negativo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento de la técnica, indica la ausencia del antígeno Rh apropiado 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.
- 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**

- Los reactivos Spinreact Anti-Rh no son adecuados para su utilización con células tratadas enzimáticamente o para el uso en técnicas indirectas antiglobulina.
- Algunos hematíes expresan variantes de antígeno Rh, pudiendo dar lugar a reacciones más débiles de las observadas en células control positivas seleccionadas aleatoriamente. Anti-C puede generar reacciones más débiles con el antígeno C de individuos R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>. De forma parecida, Anti-e puede provocar reacciones sensiblemente más débiles en ausencia de antígeno C, ej. R<sub>2</sub>r, r<sup>+</sup>r y rr.
- La supresión o disminución de la expresión de ciertos antígenos de grupos sanguíneos, puede inversamente dar lugar a falsas reacciones negativas. Por estos motivos, la asignación de genotipos, en base a los resultados del test, debe siempre realizarse con cautela.
- 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 utilización<sup>9</sup>.

**CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO**

- Los reactivos han sido caracterizados para todos los procedimientos aquí mencionados.
- Prviamente a su liberación, cada lote de Spinreact Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e, Anti-C+D+E y Anti-C+D Monoclonal es testado a través de las técnicas recomendadas frente a un panel de hematíes antígenos-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-negativo.
- 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* 6<sup>th</sup> Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
- Issitt PD. *Applied Blood Group Serology*, 3<sup>rd</sup> Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- Mollison PL. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 8<sup>th</sup> Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987, Chapter 7.
- Tipsett 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**

Monoclonal Anti-C	Ref: 1700031	5 ml
Monoclonal Anti-E	Ref: 1700033	5 ml
Monoclonal Anti-c	Ref: 1700035	5 ml
Monoclonal Anti-e	Ref: 1700037	5 ml

**Qualitative test for determination of the C,c,E,e antigen on human red blood cells.****IVD**

Store at 2-8°C

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

The reagents will cause direct agglutination (clumping) of test red cells that carry the corresponding Rh antigen. No agglutination generally indicates the absence of the corresponding Rh antigen (see **Limitations**).

**CLINICAL SIGNIFICANCE**

Levine and Stetson discovered the Rh blood group system in 1940. Apart from D the other major Rh antigens are C, E, c and e. The D antigen is highly immunogenic; the C and e antigens are less immunogenic than E and c. The corresponding antibodies are all clinically significant since they may cause both Transfusion Reactions and Haemolytic Disease of the Newborn.

Major Rh Antigens				
D	C	E	c	e
85	70	30	80	98

Table 1: Frequency of each antigen in Caucasian population.

**REAGENTS**

Spinreact Monoclonal IgM Anti-Rh blood grouping reagents are low protein reagents containing human monoclonal antibodies diluted with sodium chloride (0.9 g%), bovine albumin (6 g%) and macromolecular potentiators. Each reagent is supplied at optimal dilution for use with all recommended techniques stated below without need for further dilution or addition. For lot reference number and expiry date see **Vial Label**.

Reagent	Cell Line / Clone
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

Table 2: Human IgM Cell Lines / Clones used.

**PRECAUTIONS**

- The reagents are intended for *in vitro* diagnostic use only.
- If a reagent vial is cracked or leaking, discard the contents immediately.
- Do not use the reagents past the expiration date (see **Vial Label**).
- Do not use the reagents if a precipitate is present.
- Protective clothing should be worn when handling the reagents, 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 heterozygous) and a 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.
- Weak Rhesus antigens may be poorly detected by the gel card, microtitre plate and slide technique. It is recommended that weak Rhesus antigens are tested using the tube test technique.
- In the techniques here detailed 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.
- 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 R<sub>1</sub>r) and negative (rr) control red cells.
- DiaMed ID-Cards (Neutral).
- DiaMed ID-Centrifuge.
- DiaMed ID-Diluent: e.g. ID-CellStab.
- 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****A. Tube Method**

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in a labelled test tube: 1 volume Anti-Rh 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, 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-Rh 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 an 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-Rh 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 Anti-Rh 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.

**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 appropriate Rh 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 appropriate Rh 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.
- 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-Rh reagents are not suitable for use with enzyme treated cells or for use in indirect antiglobulin techniques.
- Some red cells express variant Rh antigens and may give weaker reactions than seen with randomly selected positive control cells. Anti-C may give weaker reactions with C antigen of R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> individuals. Similarly, Anti-e may give slightly weaker reactions in absence of C antigen, e.g. R<sub>2</sub>r, r'r and rr.
- Suppressed or diminished expression of certain blood group antigens may conversely give rise to false negative reactions. For these reasons, caution should always be exercised when assigning genotypes on the basis of test results.
- 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 mentioned in the **Recommended Techniques**.
- Any deviations from the **Recommended Techniques** should be validated prior to use<sup>9</sup>.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

- The reagents have been characterised by all the procedures here mentioned.
- Prior to release, each lot of Spinreact Monoclonal Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e, Anti-C+D+E and Anti-C+D is tested by the **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 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* 6<sup>th</sup> Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
- Issitt PD. *Applied Blood Group Serology*, 3<sup>rd</sup> Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- Mollison PL. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 8<sup>th</sup> 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**

Monoclonal Anti-C	Ref: 1700031	5 ml
Monoclonal Anti-E	Ref: 1700033	5 ml
Monoclonal Anti-c	Ref: 1700035	5 ml
Monoclonal Anti-e	Ref: 1700037	5 ml

**Determinación cualitativa de antígenos C, c, E, e en hematíes humanos IVD**

Conservar a 2-8°C

**PRINCIPIO DEL MÉTODO**

Los reactivos provocan la aglutinación directa de los hematíes que contengan el antígeno Rh correspondiente. La ausencia de aglutinación generalmente es indicativa de la inexistencia del correspondiente antígeno Rh (ver **Limitaciones**).

**SIGNIFICADO CLÍNICO**

En 1940 Levine y Stetson descubrieron el sistema Rh del grupo sanguíneo. Los principales antígenos Rh son, a parte del D, los C, E, c y e. El antígeno D es altamente inmunogénico. Los antígenos C y e son menos inmunogénicos que los E y c. Los correspondientes anticuerpos son clínicamente significativos puesto que pueden provocar Reacciones transfusionales, así como el Síndrome hemolítico del Recién Nacido.

Principales antígenos Rh				
D	C	E	c	e
85	70	30	80	98

Tabla 1: Frecuencia de cada antígeno en la población Caucásica.

**REACTIVOS**

Los reactivos Spinreact IgM Monoclonales Anti-Rh contienen anticuerpos humanos monoclonales diluidos en cloruro sódico (0,9 g%), albúmina bovina (6 g%) y potenciadores macromoleculares. Cada 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.

Reactivo	Clon / Línea celular
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

Tabla 2: Líneas celulares humanas IgM / Clones usados.

**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 método 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 un heterocigoto) y un control negativo para testar de forma paralela en cada lote 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.
- Los antígenos Rhesus débiles pueden ser mal detectados a través de placas de gel, placas microtitulo y porta. Por ello, se recomienda utilizar la técnica en tubo.
- En las técnicas aquí recomendadas un volumen es aproximadamente 40µl 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 dónde 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.
- 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<sub>1</sub>r) y negativos (rr).
- Placas - *DiaMed ID* (Neutra).
- Centrífuga *DiaMed ID*.
- Diluyente *DiaMed ID*.
- 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****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-Rh 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-Rh 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 periodo 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 en Diluyente ID.
- Preparar hojas de aluminio para tantos microtubos como sean necesarios.
- Depositar en el microtubo apropiado: 50µl de suspensión de hematíes y 25 µl de reactivo Anti-Rh.
- Centrifugar las targetas *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-Rh 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.

**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 Rh apropiado en los hematíes testados.
- Negativo:** La ausencia de aglutinación de hematíes constituye un resultado negativo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento de la técnica, indica la ausencia del antígeno Rh apropiado 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.
- 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**

- Los reactivos Spinreact Anti-Rh no son adecuados para su utilización con células tratadas enzimáticamente o para el uso en técnicas indirectas antiglobulina.
- Algunos hematíes expresan variantes de antígeno Rh, pudiendo dar lugar a reacciones más débiles de las observadas en células control positivas seleccionadas aleatoriamente. Anti-C puede generar reacciones más débiles con el antígeno C de individuos R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>. De forma parecida, Anti-e puede provocar reacciones sensiblemente más débiles en ausencia de antígeno C, ej. R<sub>2</sub>r, r<sup>+</sup>r y rr.
- La supresión o disminución de la expresión de ciertos antígenos de grupos sanguíneos, puede inversamente dar lugar a falsas reacciones negativas. Por estos motivos, la asignación de genotipos, en base a los resultados del test, debe siempre realizarse con cautela.
- 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 utilización<sup>9</sup>.

**CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO**

- Los reactivos han sido caracterizados para todos los procedimientos aquí mencionados.
- Prviamente a su liberación, cada lote de Spinreact Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e, Anti-C+D+E y Anti-C+D Monoclonal es testado a través de las técnicas recomendadas frente a un panel de hematíes antígenos-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-negativo.
- 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* 6<sup>th</sup> Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
- Issitt PD. *Applied Blood Group Serology*, 3<sup>rd</sup> Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- Mollison PL. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 8<sup>th</sup> Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987, Chapter 7.
- Tippeit 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**

Monoclonal Anti-C	Ref: 1700031	5 ml
Monoclonal Anti-E	Ref: 1700033	5 ml
Monoclonal Anti-c	Ref: 1700035	5 ml
Monoclonal Anti-e	Ref: 1700037	5 ml

**Qualitative test for determination of the C,c,E,e antigen on human red blood cells.****IVD**

Store at 2-8°C

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

The reagents will cause direct agglutination (clumping) of test red cells that carry the corresponding Rh antigen. No agglutination generally indicates the absence of the corresponding Rh antigen (see **Limitations**).

**CLINICAL SIGNIFICANCE**

Levine and Stetson discovered the Rh blood group system in 1940. Apart from D the other major Rh antigens are C, E, c and e. The D antigen is highly immunogenic; the C and e antigens are less immunogenic than E and c. The corresponding antibodies are all clinically significant since they may cause both Transfusion Reactions and Haemolytic Disease of the Newborn.

Major Rh Antigens				
D	C	E	c	e
85	70	30	80	98

Table 1: Frequency of each antigen in Caucasian population.

**REAGENTS**

Spinreact Monoclonal IgM Anti-Rh blood grouping reagents are low protein reagents containing human monoclonal antibodies diluted with sodium chloride (0.9 g%), bovine albumin (6 g%) and macromolecular potentiators. Each reagent is supplied at optimal dilution for use with all recommended techniques stated below without need for further dilution or addition. For lot reference number and expiry date see **Vial Label**.

Reagent	Cell Line / Clone
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

Table 2: Human IgM Cell Lines / Clones used.

**PRECAUTIONS**

- The reagents are intended for *in vitro* diagnostic use only.
- If a reagent vial is cracked or leaking, discard the contents immediately.
- Do not use the reagents past the expiration date (see **Vial Label**).
- Do not use the reagents if a precipitate is present.
- Protective clothing should be worn when handling the reagents, 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 heterozygous) and a 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.
- Weak Rhesus antigens may be poorly detected by the gel card, microtitre plate and slide technique. It is recommended that weak Rhesus antigens are tested using the tube test technique.
- In the techniques here detailed 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.
- 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 R<sub>1</sub>r) and negative (rr) control red cells.
- DiaMed ID-Cards (Neutral).
- DiaMed ID-Centrifuge.
- DiaMed ID-Diluent: e.g. ID-CellStab.
- 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****A. Tube Method**

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS.
- Place in a labelled test tube: 1 volume Anti-Rh 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, 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-Rh 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 an 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-Rh 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 Anti-Rh 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.

**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 appropriate Rh 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 appropriate Rh 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.
- 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-Rh reagents are not suitable for use with enzyme treated cells or for use in indirect antiglobulin techniques.
- Some red cells express variant Rh antigens and may give weaker reactions than seen with randomly selected positive control cells. Anti-C may give weaker reactions with C antigen of R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> individuals. Similarly, Anti-e may give slightly weaker reactions in absence of C antigen, e.g. R<sub>2</sub>r, r'r and rr.
- Suppressed or diminished expression of certain blood group antigens may conversely give rise to false negative reactions. For these reasons, caution should always be exercised when assigning genotypes on the basis of test results.
- 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 mentioned in the **Recommended Techniques**.
- Any deviations from the **Recommended Techniques** should be validated prior to use<sup>9</sup>.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

- The reagents have been characterised by all the procedures here mentioned.
- Prior to release, each lot of Spinreact Monoclonal Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e, Anti-C+D+E and Anti-C+D is tested by the **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 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 6<sup>th</sup> Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8<sup>th</sup> 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**

Monoclonal Anti-C	Ref: 1700031	5 ml
Monoclonal Anti-E	Ref: 1700033	5 ml
Monoclonal Anti-c	Ref: 1700035	5 ml
Monoclonal Anti-e	Ref: 1700037	5 ml