



Anti-D IgG + IgM Monoclonal

Tests en Tubo, Porta, Bio-Raid-ID, Ortho BioVue y Microplacas Grupos sanguíneos

Determinación cualitativa de antígeno D en hemáties humanas IVD

Conservar a 2-8 °C.

RESUMEN

El sistema Rh de grupo sanguíneo fue descubierto en 1940. El antígeno D es el más clínicamente significativo de los antígenos de hemáties que no son del sistema ABO y ha estado implicado en Reacciones transfusionales, así como en el Síndrome hemolítico del Recién Nacido.

Anti-D	Fenotipo	Caucasianos % ³	Afro-Americanos % ³
+	Rh D +vo	83	92
0	Rh D -vo	17	8

USO PREVISTO

Los reactivos Anti-D son reactivos de agrupación sanguínea destinados a ser utilizados para determinar cualitativamente la presencia o ausencia del antígeno Rh D en los hemáties de donantes de sangre o pacientes que requieren una transfusión de sangre, cuando se analizan de acuerdo con los procedimientos establecidos en estas IDU.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los reactivos contienen anticuerpos contra el antígeno D de los hemáties humanos y provocarán la aglutinación directa de los hemáties humanos que contengan el antígeno D y la aglutinación indirecta de los hemáties humanos de la Categoría DVI en la fase de antiglobulina del test. La ausencia de aglutinación generalmente es indicativa de la inexistencia del antígeno D (ver Limitaciones).

EXPRESIÓN DEBILITADA DEL ANTÍGENO RHD

El término colectivo Du es ampliamente utilizado para describir los hemáties 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 (DVI) 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 hemáties 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 escasmamente proteico combinado que contiene anticuerpos humanos monoclonales IgM e IgG diluidos en un tampón fosfato con cloruro sódico (0,9 g%), albúmina bovina (2,0 g%) y potenciadores macromoleculares (1,5 g%). Durante el tipado de las muestras de pacientes, aplicando los métodos aquí recomendados, el reactivo aglutinará directamente células RHD positivas, incluyendo la mayoría de las variantes (pero no DVI) y una elevada proporción de fenotipos D débiles (Du). Los reactivos no contienen ni consisten en sustancias CMR, o sustancias disruptoras endocrinas o que puedan resultar en sensibilización o reacción alérgica por parte del usuario. El reactivo es suministrado en la dilución óptima para su utilización en todos los métodos aquí recomendados sin necesidad de diluciones o adiciones suplementarias. Ver el número de referencia de lote y la caducidad en la etiqueta del vial.

IgM / IgG	Cion / 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, pero no son suministrados estériles. 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 anticuerpos contra VIH 1+2 y VHC, y para el antígeno HBs.
- 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 células R1r) y un control negativo (idealmente células rr) 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 hemáties de un paciente diagnosticado con una enfermedad que hace que los hemáties se cubran con anticuerpos u otras proteínas (como EHRN, anemia hemolítica inmunitaria), es importante analizar los hemáties del paciente utilizando un reactivo de control negativo. Las pruebas deben considerarse inválidas si los hemáties se aglutinan con el control negativo.
- Para determinación de la categoría DVI testar las muestras sólo mediante las técnicas de Antiglobulina Indirecta o Coombs Bio-Raid-ID o Coombs Ortho BioVue.
- Los antígenos D débiles y las variantes de antígenos D 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.
- Antes de usar, dejar que el reactivo alcance la temperatura ambiente. Tan pronto como se haya utilizado el reactivo, almacenarlo de nuevo a 2-8 °C.
- En métodos aquí recomendados, un volumen es aproximadamente 50µL 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

Los viales de reactivo deben almacenarse a 2-8 °C al recibirlos. El almacenamiento prolongado a temperaturas fuera de este rango puede resultar en una pérdida acelerada de la reactividad del reactivo. Este reactivo ha sido sometido a estudios de estabilidad en transporte a 37 °C y -25 °C como se describe en el documento BS EN ISO 23640:2015.

MATERIAL NECESARIO PERO NO PROPORCIONADO

- Anti-globulina humana o Anti-IgG humano.
- Pajillos aplicadores.
- Lector de placas automático.
- Lavador de células Coombs.
- Tarjetas Bio-Rad ID-Card (LISS/COOMBS y NaCl, prueba enzimática y crioaglutininas).
- Centrífuga Bio-Rad ID-Card.
- Bio-Rad ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Incubadora Bio-Rad ID equilibrada a 37 °C ± 2 °C.
- Portaobjetos de vidrio para microscopio o cartulinas blancas.
- Tubos de ensayo de vidrio (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Células sensibilizadas con IgG.
- Centrífuga de microplacas.
- Casetas de Ortho BioVue System (AHG/Coombs y neutros).
- Centrífuga Ortho BioVue System.
- Bloque térmico Ortho BioVue System equilibrado a 37 °C ± 2 °C.
- Diluyente de hemáties Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- Agitador de placas.
- Solución de PBS (pH 6.8-7.2) o solución salina isotónica (pH 6.5-7.5).
- Hemáties para control positivo (idealmente R1r) y negativo (idealmente rr).
- Centrífuga de tubos de ensayo.
- Microplacas de pocillos en "U" validadas.
- Pipetas volumétricas.
- Baño termostático o incubadora equilibradas a 37 °C ± 2 °C.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre se pueden recolectar en EDTA, citrato, anticoagulantes CPDA o como una muestra coagulada. Las muestras deben analizarse lo antes posible después de la recolección. Si se produce un retraso en la prueba, almacene las muestras a 2-8 °C. Las muestras que presenten hemólisis grave o contaminación microbiana no deben utilizarse para la prueba. Las muestras de sangre que muestran evidencia de lisis pueden dar resultados poco fiables. Es preferible (pero no esencial) lavar todas las muestras de sangre con PBS o solución salina isotónica antes de realizar la prueba.

PROCEDIMIENTOS (NO PARA CATEGORÍA DVI)

A. Método en Tubo

- Preparar una suspensión de hemáties al 2-3% en PBS o solución salina isotónica.
- Añadir en un tubo identificado: 1 volumen de reactivo Anti-D y un volumen de la suspensión de hemáties.
- 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 en busca de aglutinación.

- Cualquier tubo que muestre un resultado negativo o cuestionable (lo que puede pasar en muestras Du o muestras D débiles) debe ser incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Tras la incubación, repetir los pasos 3 y 4.

B. Método Bio-Rad ID (NaCl, prueba enzimática y tarjetas de crioaglutininas)

- Preparar una suspensión de hemáties al 0,8% en ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Retirar el papel de aluminio de tantos microtubos como sea necesario.
- Colocar en un microtubo apropiado: 50 µL de suspensión de hemáties y 25 µL de reactivo Spinreact Anti-D.
- Centrifugar las tarjetas ID-Card en la centrífuga de tarjetas de gel Bio-Rad.
- Leer macroscópicamente en busca de aglutinación.

C. Método Ortho BioVue (tarjetas neutras)

- Preparar una suspensión de hemáties al 0,8% en Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- Retirar el papel de aluminio de tantas cámaras de reacción como sea necesario.
- Colocar en la cámara de reacción adecuada: 50 µL de suspensión de hemáties y 40 µL de reactivo Spinreact Anti-D.
- Centrifugar los casetes en una centrífuga Ortho BioVue System.
- Leer macroscópicamente en busca de aglutinación.

D. Método de Microplaca, usando pocillos "U"

- Preparar una suspensión al 2-3% de hemáties en PBS o solución salina isotónica.
- Depositar en el pocillo apropiado: 1 volumen de reactivo Anti-D y 1 volumen de suspensión de hemáties.
- 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 con el método en tubo.

E. Método en Porta

- Preparar una suspensión de hemáties al 35-45% en suero, plasma, PBS o solución salina isotónica, o usar sangre entera con anticoagulante (en su propio plasma).
- Depositar en un portaobjetos de vidrio o en una tarjeta identificadas: 1 volumen del reactivo Anti-D y 1 volumen de la suspensión de hemáties.
- Utilizando un pabillo aplicador limpio, mezclar el reactivo y las células en un área de unos 20 x 40 mm.
- Inclinar lentamente el portaobjetos hacia adelante y hacia atrás durante 30 segundos, y seguir mezclando ocasionalmente durante el período de 1 minuto, manteniendo el portaobjetos a temperatura ambiente.
- Leer macroscópicamente tras 1 minuto sobre una luz difusa y no confundir las fibras de fibrina con la aglutinación.
- Cualquier reacción débil debe ser repetida con el método en tubo.

PROCEDIMIENTOS (PARA LA DETECCIÓN DE LA CATEGORÍA DVI)

A. Método antiglobulina indirecta

- Preparar una suspensión de hemáties al 2-3% en PBS o solución salina isotónica.
- Depositar en un tubo identificado: 1 volumen del reactivo Anti-D y 1 volumen de la suspensión de hemáties.
- Mezclar minuciosamente e incubar a 37 °C durante 15 minutos.
- Lavar los hemáties al menos una vez con PBS o solución salina isotónica 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 gotas de antiglobulina humana o anti-IgG a cada botón celular seco.
- 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.
- Confirmar validez de todas las reacciones negativas con hemáties sensibilizados con IgG.

B. Método Bio-Rad ID (tarjetas LISS/COOMBS)

- Preparar una suspensión de hemáties al 0,8% en ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Retirar el papel de aluminio de tantos microtubos como sea necesario.
- Colocar en un microtubo apropiado: 50 µL de suspensión de hemáties y 25 µL de reactivo Spinreact Anti-D.
- Incubar las tarjetas 15 minutos a 37 °C.
- Centrifugar las tarjetas ID-Card en la centrífuga de tarjetas de gel Bio-Rad.
- Leer macroscópicamente en busca de aglutinación.

C. Método Ortho BioVue (tarjetas AHG/Coombs)

- Preparar una suspensión de hemáties al 0,8% en Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- Retirar el papel de aluminio de tantas cámaras de reacción como sea necesario.
- Colocar en la cámara de reacción adecuada: 50 µL de suspensión de hemáties y 40 µL de reactivo Spinreact Anti-D.
- Incubar las tarjetas 15 minutos a 37 °C.
- Centrifugar los casetes en una centrífuga Ortho BioVue System.
- Leer macroscópicamente en busca de aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo: La aglutinación de los hemáties constituye un resultado positivo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la presencia del antígeno D en los hemáties testados.
- Negativo: La ausencia de aglutinación de hemáties constituye un resultado negativo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la ausencia del antígeno D en los hemáties testados.
- Los resultados de células que aglutinan 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 inmediatamente tras la centrifugación.
- Las etapas de lavado deben completarse sin interrupción alguna y la centrifugación y lectura debe realizarse inmediatamente tras la adición del de la anti-globulina humana, ya que 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 un máximo de 1 minuto 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 suspendidas en LISS.
- El uso de disoluciones diferentes a las descritas en los Procedimientos a la hora de preparar las suspensiones de hemáties tiene que ser validada previamente. Algunas disoluciones pueden dar lugar a falsos positivos o falsos negativos.
- La sangre almacenada puede dar lugar a reacciones más débiles que la sangre fresca.
- Puede observarse falsa aglutinación positiva en células sensibilizadas con IgG.
 - Contaminación de los materiales del test.
 - Conservación inadecuada, concentración celular, tiempo o temperatura de incubación
 - Centrifugación inapropiada o excesiva
 - Desviación de los métodos recomendados
- El usuario es responsable del funcionamiento de los reactivos en cualquier otro método distinto de los aquí detallados.
- Cualquier desviación de los métodos aquí recomendados debería ser validada antes de su utilización.⁹

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Previamente a su liberación, cada lote de Spinreact Anti-D es testado usando los métodos listados en estas IDU. Las pruebas cumplieron con los requisitos establecidos en la versión/edición actual de las "Directrices para los servicios de transfusión de sangre en el Reino Unido" y las "Especificaciones técnicas comunes".
- La especificidad en origen de los anticuerpos monoclonales está demostrada frente a un panel de hemáties antígenos-negativos.
- La potencia del reactivo ha sido testado frente al 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 realizó utilizando hemáties con fenotipos que fueron verificados por un centro de transfusión de sangre del Reino Unido y habían sido lavados con PBS o solución salina isotónica antes de su uso.

BIBLIOGRAFÍA

- Issitt PD, Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- AABB Technical Manual, 16th Edition, AABB 2008.
- Marion E. Reid and Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens and Antibodies, SBB Books, New York 2007, Page 192.
- 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, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
- 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, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue and Microplate Test Blood Grouping

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

IVD

Store at 2-8 °C

SUMMARY

The Rh blood group system was discovered in 1940. The D antigen is the most clinically significant non-ABO red blood cell antigen and has been implicated in causing Haemolytic Transfusion Reactions and Haemolytic Disease of the Newborn.

Anti-D	Phenotype	Caucasians % ³	Afro-Americans % ³
+	Rh D +ve	83	92
0	Rh D -ve	17	8

INTENDED PURPOSE

The Anti-D reagents are blood grouping reagents intended to be used to qualitatively determine the presence or absence of the Rh D antigen on the red cells of blood donors or patients requiring a blood transfusion when tested in accordance with the procedures stated in this IFU.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The reagents contain antibodies against the D antigen on human red cells and will cause direct agglutination (clumping) of human red cells that carry the D antigen and indirect agglutination of test red cells that are Category DVI in the antiglobulin phase of testing. No agglutination (no clumping) generally indicates the absence of the D antigen on human red cells (see Limitations).

WEAKENED EXPRESSION OF THE RhD ANTIGEN

The collective term Du 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 anti-D diluted in a phosphate buffer containing sodium chloride (0.9 g%), bovine albumin (2.0 g%) and macromolecular potentiators (1.5 g%). When typing patient samples, this reagent will directly agglutinate Rh D positive cells, including majority of variants (but not DVI) and a high proportion of weak D (Du) phenotypes when using the recommended techniques. The reagents do not contain or consist of CMR substances, or endocrine disrupting substances or that could result in sensitisation or an allergic reaction by the user. The reagent is supplied at optimal dilution for use on patient samples with all procedures 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 are 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, but is not supplied sterile. 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 that a positive control (ideally R1r cells) and a negative control (ideally rr cells) 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 who is diagnosed with a disease that causes the red cells to become coated with antibody or other proteins (such as HDN, AIHA), it is important to test the patients red cells using reagent negative control. Tests must be considered invalid if red cells are agglutinated using Monoclonal D Negative Control.
- Test samples for category DVI determination by the Indirect Antiglobulin Test, Coombs Bio-Rad-ID and Coombs Ortho BioVue 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.
- Before use, let the reagent warm up to room temperature. As soon as the reagent has been used, put the reagent back in the storage at 2-8 °C.
- In the procedures one volume is approximately 50 µL 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 the suitability of the reagents for use in other techniques.

STORAGE

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. This reagent has undergone transportation stability studies at 37 °C and -25°C as described in document BS EN ISO 23640:2015.

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Anti-human globulin or Anti-Human IgG.
- Applicator sticks.
- Automatic plate reader.
- Coombs cell washer.
- Bio-Rad ID-Cards (LISS/Coombs) and (NaCl, enzyme test and cold agglutinins).
- Bio-Rad ID-Centrifuge.
- Bio-Rad ID-CellStab or ID- Diluent 2.
- Bio-Rad ID-Incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Glass microscope slides or white card tiles.
- Glass test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- IgG sensitised red cells.
- Microplate centrifuge.
- Ortho BioVue System Cassettes (AHG/Coombs) and (Neutral).
- Ortho BioVue System Centrifuge.
- Ortho BioVue System Heat Block equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- Plate shaker.
- PBS solution (pH 6.8-7.2) or isotonic saline solution (pH 6.5-7.5).
- Positive (ideally R1r) and negative (rr) control red cells.
- Test tube centrifuge.
- Validated "U" well microplates.
- Volumetric pipettes.
- Water bath or dry heat incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Blood samples can be collected into EDTA, citrate samples CPDA anticoagulants or as a clotted sample. The samples should be tested as soon as possible following collection. If a delay in testing should occur, store the samples at 2-8 °C. Samples displaying gross haemolysis or microbial contamination should not be used for testing. Blood samples showing evidence of lysis may give unreliable results. It is preferable (but not essential) to wash all blood samples with PBS or isotonic saline before being tested.

PROCEDURES (NOT CATEGORY D^{VI})

A. Tube Technique

- Prepare a 2-3% suspension of red cells in PBS or isotonic saline.
- Place in a labelled test tube: 1 volume of Anti-D reagent and 1 volume of 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 Du or weak D samples), should be incubated for 15 minutes at room temperature.
- Following incubation, repeat steps 3 and 4.

B. Bio-Rad ID Technique (NaCl, Enzyme test and Cold agglutinins cards)

- Prepare a 0.8% suspension of red cells in ID CellStab or ID-Diluent 2.
- Remove aluminium foil from as many microtubes as needed.
- Place in appropriate microtube: 50µL of red cell suspension and 25µL Spinreact Anti D reagent.
- Centrifuge the ID-Card(s) in a Bio-Rad gel card centrifuge.
- Read macroscopically for agglutination.

C. Ortho BioVue Technique (Neutral cards)

- Prepare a 0.8% suspension of red cells in 0.8% Ortho Red Cell Diluent.
- Remove aluminium foil from as many reaction chambers as needed.
- Place in appropriate reaction chamber: 50µL of red cell suspension and 40µL of Spinreact Anti D reagent.
- Centrifuge cassette(s) for 5 minutes in an Ortho BioVue System Centrifuge.
- Read macroscopically for agglutination.

D. Microplate Technique, using "U" wells

- Prepare a 2-3% suspension of red cells in PBS or isotonic saline.
- Place in the appropriate well: 1 volume of Spinreact Anti-D reagent and 1 volume of 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.

E. Slide Technique

- Prepare a 35-45% suspension of red cells in serum, plasma or PBS or isotonic saline or use anti-coagulated whole blood (in its own plasma).
- Place on a labelled glass slide or card tile: 1 volume of Spinreact Anti-D reagent and 1 volume of 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 1 minute period, maintaining slide at room temperature.
- Read macroscopically after 1 minute over a diffuse light and do not mistake fibrin strands as agglutination.
- Any weak reactions should be repeated by the tube technique.

PROCEDURES (TO DETECT CATEGORY D^{VI})

A. Indirect Antiglobulin Technique (IAT)

- Prepare a 2-3% suspension of red cells in PBS or isotonic saline.
- Place in a labelled test tube: 1 volume of Spinreact Anti-D reagent and 1 volume of test red cell suspension.
- Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
- Wash red cells at least once with PBS or isotonic saline, 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.
- Confirm validity of all negative reactions with IgG sensitised red cells.

B. Bio-Rad-ID Technique (LISS/Coombs cards)

- Prepare 0.8% suspension of red cells in ID-CellStab or ID-Diluent 2.
- Remove aluminium foil from as many microtubes as needed.
- Place in appropriate microtube: 50 µL of red cell suspension and 25 µL of Spinreact Anti-D reagent.
- Incubate the ID-Card(s) for 15 minutes at 37°C.
- Centrifuge the ID-Card(s) in a Bio-Rad gel card centrifuge.
- Read macroscopically for agglutination.

C. Ortho BioVue Technique (AHG/Coombs cards)

- Prepare a 0.8% suspension of red cells in 0.8% Ortho Red Cell Diluent.
- Remove aluminium foil from as many reaction chambers as needed.
- Place in appropriate reaction chamber: 50µL of red cell suspension and 40µL of Spinreact Anti-D reagent.
- Incubate the cassette(s) for 15 minutes at 37°C.
- Centrifuge cassette(s) in an Ortho BioVue System Centrifuge.
- Read macroscopically for agglutination.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

- Positive: Agglutination of the 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 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 immediately after centrifugation.
- Complete washing steps without interruption and centrifuge and read tests immediately after addition of anti-human globulin because delays may result in dissociation of antigen-antibody complexes, leading to false negative or weak positive reactions.
- Slide tests should be interpreted after a maximum of 1 minute 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.
- The use of solutions for making red cell suspensions other than those described in the "Procedure" sections in the document must be validated prior to use. Some solutions may give rise to false positive or false negative reactions.
- 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 procedures.
- The user is responsible for the performance of the reagents by any method other than those here mentioned.
- Any deviations from the recommended procedures should be validated prior to use.⁶

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- Prior to release, each lot of this reagent was tested using the recommended test methods listed in this IFU. The tests complied with the test requirements as stated in the current version/issue of the "Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom" and the "Common Technical Specifications".
- 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 with phenotypes that were verified by a UK blood transfusion centre and had been washed with PBS or isotonic saline prior to use.

BIBLIOGRAPHY

- Issitt PD, Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- AABB Technical Manual, 16th Edition, AABB 2008.
- Marion E. Reid and Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens and Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 192.
- 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. 6th Edition 2002. The Stationary Office.
- 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





Anti-D IgG + IgM Monoclonal

Essais en Tube, sur Lame, Bio-Raid-ID, Ortho BioVue et Microplaques Groupes sanguins

Détermination qualitative de l'antigène D dans les hématies humaines

IVD

A conserver à 2-8°C.

SOMMAIRE

Le système de groupe sanguin Rh a été découvert en 1940. L'antigène D est l'antigène érythrocytaire non ABO le plus cliniquement significatif et a été impliqué dans les réactions transfusionnelles hémolytiques et la maladie hémolytique du nouveau-né.

Anti-D	Phénotype	Caucasiens % ³	Afro-Américains % ³
+	Rh D +vo	83	92
0	Rh D -vo	17	8

BUT PRÉVU

Les réactifs Anti-D sont des réactifs de groupage sanguin destinés à être utilisés pour déterminer qualitativement la présence ou l'absence de l'antigène Rh D sur les globules rouges des donneurs de sang ou des patients nécessitant une transfusion sanguine lorsqu'ils sont testés conformément aux procédures indiquées dans cette notice d'utilisation.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les réactifs contiennent des anticorps contre l'antigène D sur les globules rouges humains et provoqueront l'agglutination directe des hématies qui contiennent l'antigène D et l'agglutination indirecte des hématies de la Catégorie DVI 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).

EXPRESSION FAIBLE DE L'ANTIGÈNE RHD

Le terme collectif Du est largement utilisé pour décrire les hématies qui présentent une expression de l'antigène D inférieure à la normale. Le terme D faible correspond à des individus ayant un nombre réduit d'antigènes D complets par cellule. Le terme D partiel correspond à des individus avec une absence d'épitopes de l'antigène D. DVI (DVI) est une catégorie d'antigène D partiel dans laquelle la majorité des épitopes D sont absents. Le réactif détectera la majorité des exemples d'hématies D faible et D partiel par agglutination directe, mais pas les cellules DVI. Le réactif détectera la DVI et les cellules D partiel dans la phase TIA.

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 (2,0 g%) et de potentialisateurs macromoléculaires (1,5 %). Pendant le typage des échantillons de patients, en appliquant les techniques ici recommandées, le réactif agglutinera directement les cellules RHD positives (mais pas DVI) et une proportion élevée de phénotypes D faibles (Du). Les réactifs ne contiennent pas ou constitués de substances CMR, ou de substances perturbatrices du système endocrinien ou pouvant entraîner une sensibilité ou une réaction allergique de l'utilisateur. 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 diagnostique 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 R1r), 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 valides si les contrôles ne présentent pas les résultats attendus.
- Lors du typage des globules rouges d'un patient chez qui on a diagnostiqué une maladie qui provoque l'enrobage des globules rouges d'anticorps ou d'autres protéines (telles que HDN, AHA), il est important de tester les globules rouges du patient à l'aide d'un réactif de contrôle négatif. Les tests doivent être considérés comme invalides si les globules rouges sont agglutinés à l'aide du contrôle négatif monoclonal D.
- Pour déterminer la catégorie DVI, 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.
- Avant utilisation, laissez le réactif se réchauffer à température ambiante. Dès que le réactif a été utilisé, put le réactif de nouveau en stockage à 2-8 °C.
- Dans les techniques que nous recommandons, un volume équivaut environ à 50 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

Les flacons de réactifs doivent être conservés à 2-8 °C à réception. Un stockage prolongé à des températures en dehors de cette plage peut entraîner une perte accélérée de la réactivité du réactif. Ce réactif a subi des études de stabilité au transport à 37 °C et -25 °C comme décrit dans le document BS EN ISO 23640:2015.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Anti-globuline humaine ou IgG anti-humaine.
- Bâtons applicateurs.
- Lecteur de plaques automatique.
- Laveur de cellules Coombs.
- Cartes d'identité Bio-Rad (LISS/Coombs et NaCl, test enzymatique et agglutinines froides).
- Centrifugeuse Bio-Rad ID.
- Bio-Rad-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Incubateur Bio-Rad ID équilibré à 37 °C ± 2 °C.
- Lames de microscope en verre ou blanche tuiles de cartes.
- Tubes à essai en verre (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Globules rouges sensibilisés aux IgG.
- Centrifuger pour microplaques.
- Ortho BioVue System Cassettes (AHG/Coombs et neutre).
- Centrifuger Ortho BioVue System.
- Diluant Ortho 0,8% pour les globules rouges.
- Secours d'essais.
- Solution PBS (pH 6,8-7,2) ou Isotonique solution saline (pH 6,5-7,5).
- Globules rouges de contrôle positifs (idéalement R1r) et négatifs (rr).
- Centrifuger pour tubes à essai.
- Microplaques à puits "U" validées.
- Pipettes volumétriques.
- Bain-marie ou incubateur à chaleur sèche équilibré à 37 °C ± 2 °C.

ÉCHANTILLONS COLLECTÉS ET PRÉPARATION

Des échantillons de sang peuvent être prélevés sur EDTA, des échantillons de citrate, des anticoagulants CPDA ou sous forme d'échantillon coagulé. Les échantillons doivent être testés dès que possible après le prélèvement. En cas de retard dans le test, conserver les échantillons à 2-8 °C. Les échantillons présentant une hémolyse importante ou une contamination microbienne ne doivent pas être utilisés pour les tests. Les échantillons de sang montrant des signes de lyse peuvent donner des résultats peu fiables. Il est préférable (mais pas indispensable) de laver tous les échantillons de sang avec du PBS ou une solution saline isotonique avant de les tester.

PROCÉDURES (PAS POUR CATÉGORIE DVI)

A. Technique du Tube

- Préparer une suspension d'hématies à 2-3 % dans du PBS ou solution saline isotonique.
- 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 (ce qui peut arriver avec des échantillons Du ou D faibles) doit être incubé pendant 15 minutes à température ambiante.
- Après l'incubation, répéter les étapes 3 et 4.

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

- Préparer une suspension à 0,8 % de globules rouges dans ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Retirer la feuille d'aluminium d'autant de microtubes que nécessaire.
- Placer dans un microtube approprié : 50 µL de suspension de globules rouges et 25 µL de réactif Spinreact Anti D.
- Centrifuger la ou les cartes d'identité dans une centrifugeuse pour carte gel Bio-Rad.
- Lire macroscopiquement pour l'agglutination.

C. Technique Ortho BioVue (cartes neutres)

- Préparer une suspension à 0,8 % de globules rouges dans du diluant Ortho Red Cell à 0,8 %.
- Retirer la feuille d'aluminium d'autant de chambres de réaction que nécessaire.
- Placer dans une chambre de réaction appropriée : 50 µL de suspension de globules rouges et 40 µL de réactif Spinreact Anti D.
- Centrifuger les cassettes pendant 5 minutes dans une centrifugeuse Ortho BioVue System.
- Lire macroscopiquement pour l'agglutination.

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

- Préparer une suspension d'hématies à 2-3 % dans du PBS ou solution saline isotonique.
- 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.

E. Méthode sur lame

- Préparer une suspension de 35-45% de globules rouges dans du sérum, du plasma ou du PBS ou une solution saline isotonique ou utiliser du sang tout anticoagulé (dans son propre plasma).
- Déposer sur une lame identifiée : 1 volume de réactif Anti-D et 1 volume de la suspension d'hématies.
- En utilisant un bâton 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 1 minute supplémentaires, en maintenant la lame à température ambiante.
- Lire de manière macroscopique 1 minute 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.

PROCÉDURE (POUR LA DÉTECTION DE LA CATÉGORIE DVI)

A. Technique antiglobuline indirecte

- Préparer une suspension de 2 à 3 % de globules rouges dans du PBS ou une solution saline isotonique.
- Déposer sur un tube identifié : 1 volume de réactif Anti-D et 1 volume de la suspension d'hématies.
- Mélanger minutieusement et incubé 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 par macroscopie.

B. Technique Bio-Rad-ID (cartes LISS/Coombs)

- Préparer une suspension à 0,8 % de globules rouges dans ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Retirer la feuille d'aluminium d'autant de microtubes que nécessaire.
- Placer dans un microtube approprié : 50 µL de suspension de globules rouges et 25 µL de réactif Spinreact Anti-D.
- Incuber la ou les cartes d'identité pendant 15 minutes à 37 °C.
- Centrifuger la ou les cartes d'identité dans une centrifugeuse pour carte gel Bio-Rad.
- Lire macroscopiquement pour l'agglutination.

C. Technique Ortho BioVue (cartes AHG/Coombs)

- Préparer une suspension à 0,8 % de globules rouges dans du diluant Ortho Red Cell.
- Retirer la feuille d'aluminium d'autant de chambres de réaction que nécessaire.
- Placer dans une chambre de réaction appropriée : 50 µL de suspension de globules rouges et 40 µL de réactif Spinreact Anti-D.
- Incuber la ou les cassettes pendant 15 minutes à 37 °C.
- Centrifuger les cassettes dans une centrifugeuse du système Ortho BioVue.
- Lire macroscopiquement pour l'agglutination.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Positif : L'agglutination d'hématies constitue un résultat de test positif et, 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

- Lire 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 1 minute 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 LIS.
- L'utilisation de solutions pour la fabrication de suspensions de globules rouges autres que celles décrites dans les rubriques « Mode opératoire » du document doit être validée avant utilisation. Certaines solutions peuvent donner lieu à des réactions faussement positives ou faussement négatives.
- 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, la concentration cellulaire, le temps ou la température d'incubation inadéquats.
 - 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 utilisation⁶.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

- Avant leur mise sur le marché, chaque lot de ce réactif a été testé à l'aide des méthodes de test recommandées répertoriées dans cette notice d'utilisation. Les tests étaient conformes aux exigences de test énoncées dans la version/le numéro actuel des « Directives pour les services de transfusion sanguine au Royaume-Uni » et les « Spécifications techniques communes ». La spécificité à l'origine des anticorps monoclonaux est prouvée par rapport à un panel d'hématies antigènes-négatif.
- L'activité du réactif a été testée par rapport à la norme de référence d'activité minimale suivante obtenue auprès du National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC) : Anti-D référence 99/836.
- Le contrôle qualité des réactifs a été effectué en utilisant des globules rouges avec des phénotypes qui ont été vérifiés par un centre de transfusion sanguine du Royaume-Uni et ont été lavés avec du PBS ou une solution saline isotonique avant utilisation.

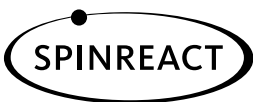
BIBLIOGRAPHIE

- Issitt PD, Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- AABB Technical Manual, 16th Edition, AABB 2008.
- Marion E. Reid and Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens and Antibodies, SBB Books, New York 2007, Page 192.
- 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, 6th Edition 2002, The Stationary Office.
- 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	Ref. : 1700021	10 mL
------------------	----------------	-------





Anti-D IgG + IgM Monoclonal

Para técnicas em Tubo, Microplaca, Bio-Raid-ID, Ortho BioVue e Lâmina Grupos sanguíneos

Determinação qualitativa de antígeno D em células vermelhas

IVD

Conservar a 2-8 °C

RESUMO

O sistema de grupos sanguíneos Rh foi descoberto em 1940. O antígeno D é o antígeno clinicamente mais significativo em hemácias não ABO, e tem sido implicado na causa de reações transfusionais hemolíticas e da doença hemolítica do recém-nascido.

Anti-D	Fenótipo	Caucasianos % ³	Afro-Americanos % ³
+	Rh D +vo	83	92
0	Rh D -vo	17	8

FINALIDADE PREVISTA

Os reagentes Anti-D são reagentes de determinação do grupo sanguíneo D em hemácias humanas a serem utilizados para determinar qualitativamente a presença ou ausência do antígeno Rh D nas hemácias de doadores de sangue ou de doentes que necessitem de uma transfusão de sangue, quando testadas em conformidade com as técnicas recomendadas nestas instruções de utilização.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os reagentes contêm anticorpos contra o antígeno D em hemácias humanas e provocam a aglutinação (agregação) direta de hemácias humanas portadoras do antígeno D. A não ocorrência de aglutinação (ausência de agregação) indica, geralmente, a ausência do antígeno D em hemácias humanas (consulte Limitações).

EXPRESSIONO ENFRAQUECIDA DO ANTIGENO RH D

O termo coletivo Du é amplamente utilizado para descrever hemácias que têm uma expressão do antígeno D mais fraca do que o normal. O termo "D fraco" refere-se a indivíduos com um número reduzido de locais do antígeno D completo por hemácia. O termo "D parcial" refere-se a indivíduos com epitótipos do antígeno D em falta. DVI é uma categoria D parcial que tem em falta a maioria dos epitótipos D. O reagente Duocloné permite detectar a maioria dos exemplos de hemácias D parciais e fracos por aglutinação direta, mas não detecta células DVI. Este reagente permite detectar células DVI e D parciais na fase TAI.

REAGENTES

O reagente de determinação do grupo sanguíneo Spinreact Monoclonal Anti-D Duocloné é um reagente de baixo teor proteico, combinado, que contém anticorpos anti-D IgM e IgG monoclonais humanos diluídos num tampão fosfato com cloreto de sódio (0,9 g%), albumina bovina (2,0 g%) e potenciadores macromoleculares (1,5 g%). Ao realizar a tipagem de amostras de doentes, este reagente provocará a aglutinação direta de células positivas para Rh D, incluindo a maioria das variantes (mas não a variante DVI), de uma elevada percentagem de fenótipos D (Du) fracos quando se utilizam as técnicas recomendadas. Os reagentes não contêm nem consistem em substâncias cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução (CMR), substâncias passíveis de causarem a desregulação do sistema endócrino nem substâncias passíveis de causarem sensibilização ou uma reação alérgica no utilizador. O reagente é fornecido na diluição ideal para utilização em amostras de doentes com todas as técnicas recomendadas indicadas abaixo, sem necessidade de diluição ou acréscimo adicional. Para obter informações sobre o número de referência do lote e o prazo de validade, consulte o rótulo do frasco.

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

PRECAUÇÕES

- Os reagentes destinam-se apenas a utilização em diagnóstico in vitro.
- Se um frasco de reagente estiver partido ou apresentar fugas, elimine o conteúdo imediatamente.
- Não utilize os reagentes após o prazo de validade (consulte o rótulo do frasco).
- Não utilize os reagentes se estiver presente precipitado.
- Ao manusear reagentes deve utilizar-se vestuário de proteção, como luvas descartáveis e uma bata de laboratório.
- Os reagentes foram filtrados através de uma câpsula de 0,2 µm para reduzir a carga biológica, mas não são fornecidos estéreis. Quando um frasco é aberto, o conteúdo do mesmo deverá manter-se viável até ao fim do prazo de validade, desde que não exista turvação acentuada, a qual pode indicar deterioração ou contaminação do reagente.
- Os reagentes contêm <0,1% de azida de sódio. A azida de sódio pode ser tóxica se ingerida e pode reagir com tubagens de chumbo e cobre, formando azidas metálicas explosivas. Aquando da eliminação, enxague com grandes volumes de água.
- Os materiais utilizados para produzir os produtos foram testados na origem e demonstraram ser negativos para anticorpos contra o VIH 1, VIH 2 e VHC, bem como para HBsAg, utilizando testes microbiológicos aprovados.
- Nenhum teste conhecido pode garantir que os produtos de origem humana ou animal estão isentos de agentes infecciosos. Deve ter-se cuidado na utilização e eliminação de cada frasco e respetivo conteúdo.
- Para obter informações sobre a eliminação do reagente e a descontaminação de um derrame, consulte a Ficha de Dados de Segurança, disponível mediante pedido.

NOTAS

- Recomenda-se que seja testado um controlo positivo (idealmente células R1r) e um controlo negativo (idealmente células rr) em paralelo com cada lote de testes. Os testes devem ser considerados inválidos se os controlos não apresentarem os resultados esperados.
- Ao realizar a tipagem das hemácias de um doente diagnosticado com uma doença (como HDN, AIHA) que provoca o revestimento das hemácias com anticorpos ou outras proteínas, é importante testar as hemácias do doente utilizando o controlo negativo do reagente. Os testes devem ser considerados inválidos se as hemácias se aglutinarem utilizando o Spinreact Monoclonal D Negative Control.
- Teste as amostras para determinação da categoria DVI utilizando apenas o teste de antioglobulina indireta, o Coombs Bio-Rad, Bio-Rad-ID e as técnicas Coombs Ortho BioVue.
- Os antígenos D fracos e variantes são mal detetados pelas técnicas em cartão de gel, placa de microtitulação e lâmina. Recomenda-se que as variantes fracas e parciais sejam testadas utilizando a técnica de teste em tubo.
- A técnica em tubo da antioglobulina só pode ser considerada válida se todos os testes negativos reagirem positivamente com hemácias sensibilizadas com IgG.
- Antes da utilização, deixe o reagente aquecer até à temperatura ambiente. Assim que o reagente tiver sido utilizado, volte a armazená-lo a 2-8 °C.
- Nas técnicas recomendadas, um volume corresponde a cerca de 50 µl quando é utilizado o conta-gotas do frasco fornecido.
- A utilização dos reagentes e a interpretação dos resultados devem ser realizadas por pessoal qualificado e com a devida formação, de acordo com os requisitos em vigor no país onde os reagentes são utilizados.
- O utilizador tem de determinar a adequabilidade dos reagentes para utilização com outras técnicas.

CONSERVAÇÃO

Após receção, os frascos de reagente devem ser conservados entre 2-8 °C. A conservação prolongada a temperaturas fora deste intervalo pode resultar em perda acelerada de reatividade do reagente. Este reagente foi submetido a estudos de estabilidade durante o transporte a 37 °C e -25 °C, conforme descrito no documento BS EN ISO 23640:2015.

REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Globulina anti-humana ou IgG anti-humana.
- Bastões aplicadores.
- Leitor automático de placas.
- Lavador de células Coombs.
- Cartões de identificação Bio-Rad (LISS / Coombs) e (NaCl, teste enzimático e aglutininas frias).
- Centrífuga Bio-Rad ID.
- Bio-Rad ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Incubador Bio-Rad ID equilibrado a 37 °C ± 2 °C.
- Lâminas de vidro para microscópio ou ladrilhos de cartão branco.
- Tubos de ensaio de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Eritrócitos sensibilizados com IgG.
- Centrífuga de microplaca.
- Cassetes Ortho BioVue System (AHG / Coombs) e (Neutro).
- Centrífuga de sistema Ortho BioVue.
- Bloco de aquecimento do sistema Ortho BioVue equilibrado a 37 °C ± 2 °C.
- Diluído de glóbulos vermelhos Ortho 0,8%.
- Agitador de placas.
- Solução PBS (pH 6,8-7,2) ou solução salina isotónica (pH 6,5-7,5).
- Glóbulos vermelhos de controlo positivo (idealmente R1r) e negativo (rr).
- Centrífuga de tubo de ensaio.
- Microplacas com poço "U" validado.
- Pipetas volumétricas.
- Banho-maria ou incubadora de calor seco equilibrada a 37 °C ± 2 °C.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras de sangue podem ser colhidas em anticoagulantes EDTA, citrato e CPDA, ou como amostras coaguladas. As amostras devem ser testadas assim que possível após a colheita. Em caso de adiamento do teste, conserve as amostras a 2-8 °C. As amostras que apresentem hemólise visível ou contaminação microbiana não devem ser utilizadas para teste. As amostras de sangue que revelem evidências de lise podem apresentar resultados pouco fiáveis. É preferível (mas não essencial) lavar todas as amostras de sangue com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica antes de testá-las.

PROCEDIMENTOS (NÃO PARA CATEGORIA DV)

A. Técnica em Tubo

- Preparar uma suspensão de células vermelhas a 2-3% em PBS ou solução salina isotónica.
- Colocar em um tubo teste etiquetado: 1 volume de Reagente Anti-D Spinreact e 1 volume de suspensão de células vermelhas.
- Centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
- Resuspender 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 Du ou D fraca), deve ser incubado por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Após a incubação, repetir as etapas 3 e 4.

B. Técnica de ID Bio-Rad (NaCl, teste de enzima e cartões de aglutininas frias)

- Preparar uma suspensão de glóbulos vermelhos a 0,8% em ID CellStab ou ID-Diluent 2.
- Remova a folha de alumínio de quantos microtubos forem necessários.
- Coloque no microtubo apropriado: 50 µL de suspensão de hemácias e 25 µL de reagente Anti D Spinreact.
- Centrifugue o (s) cartão (ões) de identificação em uma centrífuga de cartão de gel Bio-Rad.
- Leia macroscopicamente para aglutinação.

C. Técnica Ortho BioVue (cartões neutros)

- Preparar uma suspensão de glóbulos vermelhos a 0,8% em Diluído de glóbulos vermelhos Ortho 0,8%.
- Remova a folha de alumínio de quantas câmaras de reação forem necessárias.
- Coloque na câmara de reação apropriada: 50 µL de suspensão de hemácias e 40 µL de reagente Anti D Spinreact.
- Centrifugue o (s) cassette (s) por 5 minutos em uma centrífuga Ortho BioVue System.
- Leia macroscopicamente para aglutinação.

D. Método em Microplaca Usando Cavidades em 'U'

- Preparar uma suspensão de células vermelhas a testar a 2-3% em PBS ou solução salina isotónica
- Colocar na cavidade adequada: 1 volume de Reagente Anti-D Spinreact e 1 volume de suspensão de células vermelhas.
- 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.
- Resuspender 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.

E. Técnica em Lâmina

- Preparar uma suspensão a 35-45% de células vermelhas a testar em PBS ou solução salina isotónica
- Colocar em uma lâmina de vidro marcada ou ladrilho de cartão: 1 volume de Reagente Anti D 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 vagarosamente a lâmina por 1 minuto com agitações posteriores ocasionais durante um período de 1 minutos mantendo a temperatura ambiente.
- Ler macroscopicamente após 1 minutos em uma luz difusa e não confundir a presença de fibrina com aglutinação.
- Qualquer reação fraca deve ser repetida pela técnica em tubo.

PROCEDIMENTOS (PARA A DETECÇÃO DE CATEGORIA DV)

A. Técnica de antioglobulina indirecta (IAT)

- Preparar uma suspensão de células vermelhas a 2-3% em PBS ou solução salina isotónica.
- Colocar em um tubo teste etiquetado: 1 volume de Reagente Anti D Spinreact e 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar.
- Misturar totalmente e incubar a temperatura de 37° C por 15 minutos.
- Lave os glóbulos vermelhos pelo menos uma vez com PBS ou solução salina isotónica, tendo o cuidado de decantar a solução salina entre as lavagens e resuspender cada botão de célula após cada lavagem. Decantar completamente o soro fisiológico 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.
- Resuspender suavemente a base de células vermelhas e ler a aglutinação macroscopicamente.

B. Técnica Bio-Rad-ID (cartões LISS / Coombs)

- Preparar uma suspensão de glóbulos vermelhos a 0,8% em ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Remova a folha de alumínio de quantos microtubos forem necessários.
- Coloque no microtubo apropriado: 50 µL de suspensão de hemácias e 25 µL de reagente Spinreact Anti-D.
- Incube o (s) cartão (ões) de identidade por 15 minutos a 37 °C.
- Centrifugue o (s) cartão (ões) de identificação em uma centrífuga de cartão de gel Bio-Rad.
- Leia macroscopicamente para aglutinação.

C. Técnica Ortho BioVue (cartões AHG / Coombs)

- Preparar uma suspensão de glóbulos vermelhos a 0,8% em Diluído de glóbulos vermelhos Ortho 0,8%.
- Remova a folha de alumínio de quantas câmaras de reação forem necessárias.
- Coloque na câmara de reação apropriada: 50 µL de suspensão de hemácias e 40 µL de reagente Spinreact Anti-D.
- Incubar o (s) cassette (s) por 15 minutos a 37 °C.
- Centrifugue cassetes em uma centrífuga Ortho BioVue System.
- Leia macroscopicamente para aglutinação.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Positivo: a aglutinação das hemácias constitui um resultado de teste positivo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando a presença do antígeno D nas hemácias.
- Negativo: a não ocorrência de aglutinação das hemácias constitui um resultado negativo e dentro das limitações aceites do procedimento de teste, indicando a ausência do antígeno D nas hemácias.
- Os resultados de testes de células que são aglutinadas utilizando o controlo negativo do reagente devem ser excluídos, uma vez que a aglutinação é muito provavelmente causada pelo efeito dos potenciadores macromoleculares presentes no reagente sobre as células sensibilizadas.

ESTABILIDADE DAS REAÇÕES

- Leia todos os testes em tubos e microplacas imediatamente após a centrifugação.
- Realize os passos de lavagem sem interrupção e proceda à centrifugação e leitura dos testes imediatamente após a adição de globulina anti-humana, pois o adiamento da leitura pode resultar em dissociação de complexos antígeno-anticorpo, conduzindo a reações negativas falsas ou positivas fracas.
- Os testes em lâmina deverão ser interpretados, no máximo, ao fim de 1 minuto, de modo a garantir a especificidade e evitar a possibilidade de um resultado negativo poder ser incorretamente interpretado como positivo devido a secagem do reagente.
- Deve ter-se precaução na interpretação dos resultados de testes realizados a temperaturas que não as recomendadas.

LIMITAÇÕES

- O reagente Spinreact Anti-D não é adequado para utilização com células tratadas com enzimas ou células suspensas em solução salina de baixa força iónica (LISS, Low Ionic Strength Saline).
- A utilização de outras soluções que não as descritas na secção "Técnicas recomendadas" deste documento para criar suspensões de hemácias tem de ser validada antes da utilização. Algumas soluções podem dar origem a reações positivas falsas ou negativas falsas.
- O sangue armazenado pode dar origem a reações mais fracas do que o sangue fresco.
- Existe a possibilidade de se observar aglutinação positiva falsa ao testar células sensibilizadas com IgG.
- Também podem ocorrer resultados positivos falsos ou negativos falsos devido a:
 - Contaminação dos materiais de teste.
 - Inadequação da conservação, concentração de células, tempo de incubação ou temperatura.
 - Centrifugação inadequada ou excessiva.
 - Desvio das técnicas recomendadas.
- O utilizador é responsável pelo desempenho dos reagentes quando utilizados em qualquer outro método que não os mencionados em técnicas recomendadas.
- Eventuais desvios relativamente às técnicas recomendadas devem ser validados antes da utilização⁶.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

- Antes da libertação, cada lote de reagente Spinreact Anti-D foi testado utilizando os métodos de teste recomendados indicados nestas instruções de utilização. Os testes cumpriram os requisitos de teste indicados na versão/edição atual das "Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom" (Linhas de Orientação para os Serviços de Transfusão de Sangue no Reino Unido) e das "Common Technical Specifications" (Especificações Técnicas Comuns).
- A especificidade dos anticorpos monoclonais originais é demonstrada utilizando um painel de células negativas para antígeno.
- A potência dos reagentes foi testada comparativamente com o seguinte padrão de referência de potência mínima do Instituto Nacional de Padrões e Controlos Biológicos (NIBSC, National Institute of Biological Standards and Controls): Padrão de referência Anti-D 99/836.
- O controlo de qualidade dos reagentes foi realizado utilizando hemácias com fenótipos que foram verificadas por um centro de transfusões de sangue no Reino Unido e tinham sido lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução salina isotónica antes da utilização.

BIBLIOGRAFIA

- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- AABB Technical Manual, 16th Edition, AABB 2008.
- Marion E. Reid and Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens and Antibodies, SBB Books, New York 2007, Page 192.
- 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, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
- 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
------------------	--------------	-------

