

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

Store at 2-8°C

SUMMARY

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.

INTENDED PURPOSE

The Rh reagents are blood grouping reagents intended to be used to qualitatively determine the presence or absence of Rh antigens 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 to the appropriate Rhesus antigen on human red cells and will cause direct agglutination (clumping) of red cells that carry the corresponding Rh antigen. No agglutination (no clumping) generally indicates the absence of the corresponding Rh antigen (see **Limitations**).

REAGENTS

Spinreact Monoclonal IgM Anti-Rh blood grouping reagents are low protein reagents containing human monoclonal antibodies diluted with sodium chloride, bovine albumin and macromolecular potentiators (4,0 g%). 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. Each reagent is supplied at optimal dilution for use with all procedures 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

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 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 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 patients known or suspected to have auto-antibodies, protein abnormalities or a positive Direct Antiglobulin Test (DAT), it is important that a reagent negative control is tested in parallel.
- Weak Rh antigens may be poorly detected by the gel card, microtitre plate and slide technique. It is recommended that weak Rh antigens are tested using the tube test technique.
- 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 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
Tube Technique

- Glass test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- Centrifuge capable of spinning at 1000 g for 20 seconds.
- PBS solution (pH 6.8-7.2) or Isotonic saline solution (pH 6.5-7.5).
- Positive and negative control red cells:
 - Monoclonal Anti C: R₁r (positive control) and rr (negative control).
 - Monoclonal Anti-E: R₂r (positive control) and rr (negative control).
 - Monoclonal Anti-c: R₁r (positive control) and R₁R₁ (negative control).
 - Monoclonal Anti-e: R₂r (positive control) and R₂R₂ (negative control).

Bio-Rad-ID Micro Typing Technique

- Bio-Rad ID-Cards (NaCl, Enzyme tests and Cold Agglutinins).
- Bio-Rad ID-Centrifuge.
- Bio-Rad ID-CellStab or ID-Diluent 2.

Ortho BioVue Typing Technique

- Ortho BioVue System Cassettes (Neutral).
- Ortho BioVue System Centrifuge.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent.

Microtitre plate Technique

- Validated "U" well microtitre plates.
- Microtitre plate centrifuge.
- Microtitre plate shaker.

Slide Technique

- Glass microscope slides or white card tiles
- Applicator sticks.
- Timer or stopwatch

All Techniques

- Volumetric pipettes.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Blood samples can be collected into EDTA, citrate, 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
A. Tube Technique

- Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS or Isotonic saline.
- Place in a labelled test tube: 1 volume Spinreact Anti-Rh reagent and 1 volume 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. Bio-Rad ID Technique (NaCl, Enzyme 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 on the NaCl/Enzyme/Cold agglutinins ID-Card as needed.
- Place in appropriate microtube: 50 µL of red cell suspension and 25 µL of Spinreact Anti Rh reagent.
- Centrifuge the ID-Card(s) in a Bio-Rad ID centrifuge.
- Read macroscopically for agglutination.

C. Ortho BioVue Technique (Neutral cassettes)

- Prepare a 0.8% suspension of red cells in 0.8% Ortho Red Cell Diluent.
- Remove aluminium foil from as many reaction chambers on the Neutral cassette as needed.
- Place in appropriate reaction chamber: 50 µL of red cell suspension and 40 µL of Spinreact Anti-Rh 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 washed test red cells in PBS or isotonic saline.
- Place in the appropriate well: 1 volume Spinreact 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.

E. Slide Technique

- Prepare a 35-45% suspension of test red cells in serum, plasma, PBS or Isotonic saline. If this is not possible, whole anti-coagulated blood may also be used as the sample.
- Place on a labelled glass slide or card tile: 1 volume of Spinreact 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 1 minute, 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.

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 appropriate Rh antigen on the 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 appropriate Rh antigen on the 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.
- Many Monoclonal human IgM anti-Rh antibodies have been shown to possess anti-i/I cld agglutinin activity, particularly with cord cells or enzyme treated cells. This may become apparent if tests are incubated below the recommended temperature.
- 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 R₂R₂ individuals. Similarly, Anti-e may give slightly weaker reactions in absence of C antigen, e.g. R₂r, 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 procedures



Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e MONOCLONAL

Tube, Slide, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue and Microplate Tests
Blood Grouping

5. The user is responsible for the performance of the reagents by any method other than those mentioned in the **Procedures**.
6. Any deviations from the recommended **procedures** should be validated prior to use.⁵

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. 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".
2. Specificity of source monoclonal antibodies is demonstrated using a panel of antigen-negative cells.
3. The Quality Control of the reagents was performed using red cells with phenotypes that were verified by a UK blood transfusion centre had been washed twice with PBS or Isotonic saline prior to use.

BIBLIOGRAPHY

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. 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.
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. 6th Edition 2002. The Stationary Office.
5. 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-C Monoclonal	Ref: 1700031	5 ml
Anti-E Monoclonal	Ref: 1700033	5 ml
Anti-c Monoclonal	Ref: 1700035	5 ml
Anti-e Monoclonal	Ref: 1700037	5 ml



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

Conservar a 2-8 °C

RESUMEN

Levine y Stetson descubrieron el sistema de grupos sanguíneos Rh en 1940. Aparte de D, los otros antígenos Rh principales son C, E, cy e. El antígeno D es altamente inmunogénico; los antígenos C y e son menos inmunogénicos que E y c. Los anticuerpos correspondientes son todos clínicamente significativos, ya que pueden causar tanto reacciones transfusionales como enfermedad hemolítica del recién nacido.

USO PREVISTO

Los reactivos Rh son reactivos de agrupación sanguínea destinados a ser utilizados para determinar cualitativamente la presencia o ausencia de antígenos Rh en los glóbulos rojos 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 antígenos Rhesus de hematíes humanos y provocarán 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**).

REACTIVOS

Los reactivos de agrupación sanguínea Spinreact Monoclonal IgM Anti-Rh son reactivos bajos en proteínas que contienen anticuerpos monoclonales humanos diluidos con cloruro de sodio, albúmina bovina y potenciadores macromoleculares (4,0 g%). Los reactivos no contienen ni consisten en sustancias CMR, o sustancias disruptivas endocrinas o que puedan resultar en sensibilización o reacción alérgica por parte del usuario. Cada reactivo es suministrado en la dilución óptima para su utilización en todos los procedimientos aquí indicados sin necesidad de más diluciones o adiciones. 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

PRECAUCIONES

- Los reactivos son sólo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Si el vial del reactivo está roto o tiene una fuga, 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 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.
- Al analizar hematíes de pacientes que se sabe o se sospecha que tienen autoanticuerpos, anomalías proteicas o una prueba de aglutinación directa (DAT) positiva, es importante que se teste un control negativo de reactivo en paralelo.
- Los antígenos Rhesus débiles pueden ser mal detectados mediante los métodos de placas de gel, placas microtitulo y porta. Por ello, se recomienda utilizar el método en tubo.
- 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 los procedimientos aquí recomendados un volumen es aproximadamente 50 µL utilizando el gotero suministrado.
- La utilización de los reactivos y la interpretación de los resultados deben llevarse a cabo por personal cualificado y formado de acuerdo a los requisitos del país donde los reactivos están siendo utilizados. El usuario debe determinar la idoneidad de los reactivos para otras técnicas.

CONSERVACIÓN

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
Método en Tubo

- Tubos de ensayo de vidrio (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Centrífuga capaz de centrifugar a 1000 g durante 20 segundos.
- Solución de PBS (pH 6,8-7,2) o solución salina isotónica (pH 6,5-7,5).
- Hematíes para control positivo y negativo (idealmente rr).
 - Anti C Monoclonal: R:r (control positivo) and r (control negativo).
 - Anti-E Monoclonal: R:r (control positivo) and r (control negativo).
 - Anti-c Monoclonal: R:r (control positivo) and R:r₁ (control negativo).
 - Anti-e Monoclonal: R:r (positive control) and R₂R₂ (control negativo).

Método Bio-Rad ID

- Tarjetas Bio-Rad ID-Card (NaCl, prueba enzimática y crioaglutininas)
- Centrífuga Bio-Rad ID.
- Bio-Rad ID-CellStab o ID-Diluent 2.

Método Ortho BioVue

- Casets de Ortho BioVue System (neutros)
- Centrífuga Ortho BioVue System.
- Diluyente de hematíes Ortho 0.8% Red Cell Diluent.

Método de placa microtituladora

- Placas microtituladora de pocillos en "U" validadas
- Centrífuga de placas microtituladoras
- Agitador de placas microtituladoras

Método en porta

- Portaobjetos de vidrio para microscopio o cartulinas blancas.
- Palillos aplicadores
- Cronómetro

Todos los métodos

- Pipetas volumétricas

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
A. Método en Tubo

- Preparar una suspensión de hematíes al 2-3% en PBS o solución salina isotónica.
- 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 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, 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 hematíes 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 hematíes y 25 µL de reactivo Spinreact Anti-Rh.
- Centrifugar las tarjetas ID-Card en la centrífuga Bio-Rad ID.
- Leer macroscópicamente en busca de aglutinación.

C. Método Ortho BioVue (cassettes neutros)

- Preparar una suspensión de hematíes al 0,8% en Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- Retirar el papel de aluminio de tantas cámaras de reacción de los cassettes neutros como sea necesario.
- Colocar en la cámara de reacción adecuada: 50 µL de suspensión de hematíes y 40 µL de reactivo Spinreact Anti-Rh.
- Centrifugar los cassettes durante 5 minutos en una centrífuga Ortho BioVue System.
- Leer macroscópicamente en busca de aglutinación.

D. Método de placa microtituladora, usando pocillos "U"

- Preparar una suspensión al 2-3% de hematíes en PBS o solución salina isotónica.
- 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 los botones celulares 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 del método en tubo.

E. Método en Porta

- Preparar una suspensión de hematíes al 35-45% en suero, plasma, PBS o solución salina isotónica.
- Depositar en un porta o cartulina identificados: 1 volumen del reactivo Anti-Rh y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
- Utilizando un pabillo aplicador limpio, mezclar el reactivo y las células en un área de unos 20 x 40 mm.
- Lentamente inclinar el porta hacia adelante y hacia atrás 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.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo:** La aglutinación de los hematíes constituye un resultado positivo y, dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la presencia del antígeno Rh correspondiente en los hematíes.
- Negativo:** La ausencia de aglutinación de los hematíes constituye un resultado negativo y dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, 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 temperaturas diferentes 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 métodos de aglutinación indirectos.
- 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 R₂R₂. De forma parecida, Anti-e puede provocar reacciones sensiblemente más débiles en ausencia de antígeno C, ej. R₂r, r₁r y rr.



Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e MONOCLONAL

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

3. La supresión o disminución de la expresión de ciertos antígenos de grupos sanguíneos puede 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.

4. La ocurrencia de falsos positivos o falsos negativos también puede deberse a:

- Contaminación de los materiales del test
- Conservación, concentración celular, tiempo o temperatura de incubación inadecuados
- Centrifugación inapropiada o excesiva

• Desviación de los procedimientos recomendados

5. El usuario es responsable del funcionamiento de los reactivos en cualquier otro método distinto de los mencionados en los procedimientos.

6. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados debería ser validada antes de su utilización.⁵

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

1. Previamente a su liberación, cada lote de este reactivo es testado usando los métodos recomendados 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".

2. La especificidad en origen de los anticuerpos monoclonales está demostrada frente a un panel de hematíes antígeno-negativos.

3. El Control de Calidad de los reactivos se realizó utilizando hematíes 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

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.

2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.

3. 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.

4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. 6th Edition 2002. The Stationary Office.

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



Détermination qualitative des antigènes C, c, E, e dans les hématies humaines IVD

A conserver à 2-8°C.

SOMMAIRE

Levine et Stetson ont découvert le système de groupes sanguins Rh en 1940. Hormis D les autres principaux antigènes Rh sont C, E, c et e. L'antigène D est fortement immunogène; les antigènes C et e sont moins immunogènes que le E et le c. Les anticorps correspondants sont tous cliniquement significatifs car ils peuvent provoquer à la fois des réactions aux transfusions et la maladie hémolytique du nouveau-né.

OBJECTIF VISÉ

Les réactifs Rh sont des réactifs de groupes sanguins destinés à être utilisés pour déterminer qualitativement la présence ou l'absence d'antigènes Rh sur les globules rouges des donneurs de sang ou les patients qui ont besoin d'une transfusion sanguine lorsqu'ils sont testés selon les procédures stipulées dans ces instructions d'utilisation.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les réactifs contiennent des anticorps à l'antigène rhésus approprié dans les globules rouges et entraîneront une agglutination directe (agrégation) des globules rouges qui portent l'antigène Rh correspondant. Pas d'agglutination (pas d'agrégation) indique généralement l'absence de l'antigène Rh correspondant (voir Limitations).

RÉACTIFS

Les réactifs de groupes sanguins Spinreact Monoclona IgM anti Rh sont des réactifs hypoprotéiniques contenant des anticorps humains monoclonaux dilués dans du chlorure de sodium, de l'albumine bovine et des améliorateurs macromoléculaires (4,0 g%). Les réactifs ne contiennent pas ou ne sont pas constitués de substances CMR, ou des perturbateurs endocriniens ou qui pourraient entraîner une sensibilisation ou une réaction allergique de l'utilisateur. Chaque réactif est fourni à une dilution optimale pour être utilisé avec toutes les procédures stipulées ci-dessous sans nécessiter de dilution ou d'ajout supplémentaires. Pour le numéro de référence du lot et la date d'échéance, voir l'étiquette du flacon.

Réactif	Clone / Ligne cellulaire
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

PRÉCAUTIONS

- Les réactifs sont uniquement destinés à un usage diagnostic *in vitro*.
- Si un flacon de réactif est fissuré ou fuit, jetez immédiatement les contenus.
- N'utilisez pas les réactifs après la date d'expiration. (voir l'étiquette du flacon).
- N'utilisez pas les réactifs si un précipité est présent.
- Portez des vêtements de protection lors de la manipulation des réactifs, tels que gants jetables et blouse de laboratoire.
- Les réactifs ont été filtrés à travers des capsules de 0,2 µm pour réduire leur charge biologique, mais elle n'est pas fournie stérile. Lorsqu'un flacon a été ouvert les contenus doivent rester viables jusqu'à la date d'expiration tant qu'il n'y a pas de turbidité notable, qui peut indiquer une détérioration ou contamination du réactif.
- Les réactifs contiennent de l'azote de sodium < 0.1%. L'azote de sodium peut être toxique si elle est ingérée et elle peut réagir avec le plomb et le cuivre pour former des azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination rincez avec de grandes quantités d'eau.
- Les matériaux utilisés pour produire les produits ont été testés à la source et se sont avérés négatifs pour les anticorps VIH 1+2 et VHC et AgHbs en utilisant des tests microbiologiques agréés.
- Aucun test connu ne peut garantir que les produits issus de sources humaines ou animales sont exempts d'agents infectieux. Il faut prendre des précautions lors de l'utilisation et de l'élimination de chaque flacon et de ses contenus.
- Pour des informations sur l'élimination des réactifs et la décontamination d'un site de déversement voir les **Fiches de données de sécurité des matériaux**, disponibles sur demande.

NOTES

- Il est recommandé d'utiliser un contrôle positif (idéalement un hétérozygote) et un contrôle négatif pour tester parallèlement chaque série d'essais. Les essais doivent être considérés comme non valables si les contrôles ne présentent pas les résultats attendus.
- Lors du typage des globules rouges de patients connus ou suspectés d'avoir des auto-anticorps, des anomalies protéiques ou un test direct à l'antiglobuline (TDA) positif, il est important de tester en parallèle un contrôle négatif de réactif.
- De faibles antigènes Rh peuvent être faiblement détectés par la carte Gel, la plaque microtitre et la technique de lamelle. Il est recommandé de tester les antigènes Rh faibles à l'aide de la technique du tube à essai.
- Avant utilisation, laissez le réactif se réchauffer à température ambiante. Dès que le réactif a été utilisé, remettez-le dans un lieu de conservation à 2-8 °C.
- Dans les procédures un volume fait environ 50 µL lorsque l'on utilise le flacon compte-gouttes fourni.
- L'utilisation de réactifs et l'interprétation des résultats peut être effectuée par un personnel correctement formé et qualifié selon les exigences du pays où les réactifs sont utilisés. L'utilisateur doit vérifier l'adéquation déterminée des réactifs pour une utilisation dans d'autres techniques.

CONSERVATION

Les flacons de réactifs doivent être conservés à 2-8 °C à réception. Une conservation prolongée 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 de transport à 37 °C et -25 °C tel que cela est décrit dans le document BS EN ISO 23640:2015

REACTIFS ET MATERIAUX REQUIS MAIS NON FOURNIS

Technique du tube

- Tubes à essai en verre (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Centrifugeuse capable de tourner à 1000 g pendant 20 secondes.
- Solution PBS (pH 6,8-7,2) ou solution saline isotonique (pH 6,5-7,5).
- Contrôle positif et négatif des globules rouges:
 - Anti C monoclonaux : R1r (contrôle positif) et rr (contrôle négatif).
 - Anti-E monoclonaux : R2r (contrôle positif) et rr (contrôle négatif).
 - Anti-c monoclonaux : R1r (contrôle positif) et R1R1 (contrôle négatif).
 - Anti-e monoclonaux : R2r (contrôle positif) et R2R2 (contrôle négatif).

Technique de micro typage Bio-Rad-ID

- Cartes d'identification Bio-Rad (NaCl, tests enzymatiques et agglutinines froides).
- Centrifugeuse Bio-Rad ID.
- Bio-Rad ID-CellStab ou ID-Diluent 2.

Technique de typage Ortho BioVue

- Système de cassettes Ortho BioVue (neutre).
- Système de centrifugeuse Ortho BioVue.
- Diluant globules rouges 0,8% Ortho.

Technique de plaque microtitre

- Plaques microtitre validées puits en « U ».
- Centrifugeuse à plaques de microtitre.
- Agitateur de plaques de microtitre.

Technique de lamelle

- Lamelles en verre pour microscope ou tuiles blanches en carton
- Bâtonnets applicateurs.
- Minuteur ou chronomètre

Toutes les techniques

- Pipettes volumétriques.

COLLECTE ET PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS

Les échantillons de sang peuvent être collectés en EDTA, citrate et anticoagulants CPDA ou comme échantillon coagulé. Les échantillons doivent être testés dès que possible après la récupération. Si un retard devait se produire dans le test, conserver les échantillons à 2-8 °C. Les échantillons présentant une hémolyse brute ou une contamination microbienne ne doivent pas être utilisés pour les tests. Des échantillons de sang montrant une évidence de lyse peuvent donner des résultats non fiables. Il est préférable (mais pas indispensable) de laver tous les échantillons sanguins avec un tampon phosphate salin ou une solution saline isotonique avant de faire le test.

PROCÉDURE

A. Technique du Tube

- Préparer une suspension de 2-3% de globules rouges de test lavés dans un tampon phosphate salin ou une solution saline isotonique.
- Mettre dans un tube identifié : 1 volume de réactif Anti-Rh et 1 volume de la suspension globules rouges.
- Mélanger soigneusement et centrifuger tous les tubes pendant 20 secondes à 1000 rcf (force centrifuge relative) ou pendant à une durée et une force alternatives appropriées.
- Suspendre à nouveau délicatement en suspension le bouton des globules rouges et lire macroscopiquement pour l'agglutination
- Tout tube, montrant un résultat négatif ou discutable doit être incubé pendant 15 minutes à température ambiante.
- Après l'incubation, renouveler les étapes 3 et 4.

B. Technique Bio-Rad Id (cartes NaCl, Enzyme et agglutinines froides)

- Préparer une suspension de 0,8% de globules rouges dans de l'ID CellStab ou ID-Diluant 2.
- Retirer le film aluminium sur tous les microtubes nécessaires sur les cartes NaCl/Enzyme/agglutinines froides
- Mettre dans le microtube approprié : 50 µL de suspension de globules rouges et 25 µL de réactif Spinreact Anti Rh.
- Centrifuger les cartes ID dans une centrifugeuse Bio-Rad ID.
- Lire macroscopiquement l'agglutination.

C. Technique Ortho BioVue (cassettes neutres)

- Préparer une suspension de 0,8% de globules rouges dans 0,8% de diluant globules rouges neutre.
- Retirer le film aluminium d'autant de chambres de réaction que nécessaires sur la cassette neutre.
- Mettre dans la chambre de réaction appropriée : 50 µL de suspension de globules rouges et 40 µL de réactif Spinreact Anti - Rh.
- Centrifuger la (les) cassette(s) pendant 5 minutes dans un système de centrifugeuse ortho BioVue.
- Lire macroscopiquement l'agglutination.

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

- Préparer une suspension de 2-3% de globules rouges de test lavés dans un tampon phosphate salin ou une solution saline isotonique.
- Mettre dans un puits approprié : 1 volume de réactif Anti-Rh et 1 volume de la suspension de globules rouges testés.
- Mélanger soigneusement, à l'aide d'un agitateur de microplaque, en veillant à éviter la contamination de puits à puits.
- Incuber à température ambiante pendant 15 minutes (temps dépendant de l'utilisateur).
- Centrifuger la microplaque pendant 1 minute à 140 rcf (force centrifuge relative) ou pendant une durée et une force alternatives appropriées.
- Remettre en suspension les boutons de globules à l'aide d'une agitation soigneusement contrôlée sur un agitateur microplaque
- Lire macroscopiquement ou avec un lecteur automatique homologué.
- Toutes les réactions faibles doivent être répétées avec per la technique du tube à essai.

E. Technique sur lame

- Préparer une suspension de 35-45% de globules rouges de test dans un dans du sérum, plasma, tampon phosphate salin ou une solution saline isotonique. En cas d'impossibilité, tout le sang anticoagulé peut également être utilisé comme échantillon.
- Déposer sur une lame en verre étiquetée ou sur une tuile en carton : 1 volume de réactif Spinreact anti-Rh et 1 volume de suspension de globules rouges testés.
- À l'aide d'un bâtonnet applicateur propre, mélanger le réactif et les globules sur une zone d'environ 20 x 40 mm.
- Incliner doucement la lame d'avant en arrière pendant 1 minute, en la maintenant à température ambiante.
- Lire macroscopiquement après 1 minute à travers une lumière diffuse et ne pas prendre les filaments de fibrine pour de l'agglutination.
- Toutes les réactions faibles doivent être répétées para la technique du tube à essai.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Positif** : L'agglutination des globules rouges constitue un résultat de test positif et dans des limites acceptables de procédure de test, elle indique la présence de l'antigène Rh approprié sur les globules rouges.
- Négatif** : La non-agglutination des globules rouges constitue un résultat négatif et dans les limites acceptables de procédure de test, elle indique l'absence de l'antigène Rh approprié sur les globules rouges.
- Les résultats de test des globules qui sont agglutinés à l'aide du contrôle de réactif négatif doivent être exclus, car l'agglutination est certainement causée par l'effet des potentiels macromoléculaires dans le réactif des globules sensibilisés.

STABILITE DES REACTIONS

1. Lire tous les tests de tubes et de microplaques tout de suite après la centrifugation.
2. Les tests de lamelles doivent être interprétés dans les deux minutes qui suivent pour garantir la spécificité et éviter la possibilité qu'un résultat négatif puisse être mal interprété comme étant positif en raison du séchage du réactif.
3. Il faut faire attention à l'interprétation des résultats des tests effectués à des températures autres que celles recommandées.

LIMITATIONS

1. Les réactifs Spinreact anti-Rh ne sont pas appropriés pour être utilisés avec des cellules traitées par enzymes ou pour être utilisés dans des techniques indirectes d'antiglobuline.
2. Il a été démontré que de nombreux anticorps monoclonaux humains Igm anti-Rh possèdent une activité d'agglutinine froide anti-i/I, en particulier avec des cellules de moelle ou des cellules traitées par enzymes. Ceci peut apparaître si les tests sont incubés en dessous de la température recommandée.
3. Certaines globules rouges expriment des variantes de l'antigène Rh, et peuvent donner lieu à des réactions plus faibles que celles observées dans des cellules au contrôle positif sélectionnées de manière aléatoire. L'Anti-C peut générer des réactions plus faibles avec l'antigène C d'individus R₂Rz. De manière similaire, l'Anti-e peut provoquer des réactions sensiblement plus faibles en l'absence d'antigène C, ex. R₂r, r'r et rr.
4. La suppression ou diminution de l'expression de certains antigènes de groupes sanguins peut à l'inverse donner lieu à de fausses réactions négatives. Pour ces motifs, l'assignation de génotypes sur la base des résultats de l'essai doit toujours être réalisée avec précaution.
5. De faux résultats positifs ou négatifs peuvent également se produire en raison de:
 - La contamination des matériaux de test.
 - Une mauvaise conservation, une concentration de cellule, temps d'incubation ou température.
 - La centrifugation inappropriée ou excessive
 - Un écart par rapport aux procédures recommandées.
6. L'utilisateur est responsable de l'utilisation les réactifs par n'importe quelle autre méthode que celles mentionnées dans les **Procédures**.
7. Tout déviation des **procédures** recommandées doit être validée avant utilisation⁵.

CARACTÉRISTIQUES DE LA METHODE

1. Avant d'être publié, chaque lot de ce réactif a été testé au moyen des méthodes de test recommandées, énumérées dans ces instructions d'utilisations. Les tests étaient conformes aux exigences de test stipulées dans la version/publication actuelle des « Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom » (Lignes directrices pour les services de transfusion sanguine au Royaume-Uni) et les « Common Technical Specifications » (Spécifications techniques communes).
2. La spécificité des anticorps monoclonaux sources est démontrée à l'aide d'un panel cellules antigène négatives.
3. Le contrôle de qualité des réactifs a été effectué à l'aide de globules rouges avec des phénotypes qui ont été vérifiés par un centre de transfusion sanguine du RU et qui avaient été lavés deux fois avec un tampon phosphate salin ou une solution saline isotonique avant usage.

BIBLIOGRAPHIE

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. 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.
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. 6th Edition 2002. The Stationary Office.
5. 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-C Monoclonal	Réf. : 1700031	5 mL
Anti-E Monoclonal	Réf. : 1700033	5 mL
Anti-c Monoclonal	Réf. : 1700035	5 mL
Anti-e Monoclonal	Réf. : 1700037	5 mL

**Determinação qualitativa de antígeno C, c, E, e em células vermelhas
IVD**

Conservar a 2-8°C

RESUMO

Levine e Stetson descobriram o sistema de grupos sanguíneos Rh em 1940. Para além do D, os outros principais antígenos Rh são o C, E, c e e. O antígeno D é altamente imunogénico; os antígenos C e e são menos imunogénicos do que o E e o c. Os anticorpos correspondentes são todos clinicamente significativos, pois poderão causar reações transfusionais e doença hemolítica do recém-nascido.

FINALIDADE PREVISTA

Os reagentes Rh são reagentes de determinação do grupo sanguíneo destinados a serem utilizados para determinar qualitativamente a presença ou ausência de antígenos Rh 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 Rhesus apropriado em hemácias humanas e provocam a aglutinação (agregação) direta de hemácias portadoras do antígeno Rh correspondente. A não ocorrência de aglutinação (ausência de agregação) indica, geralmente, a ausência do antígeno Rh correspondente (consulte **Limitações**).

REAGENTES

Os reagentes monoclonais de determinação do grupo sanguíneo Spinreact Monoclonal IgM Anti-Rh são reagentes de baixo teor proteico, contendo anticorpos monoclonais humanos diluídos com cloreto de sódio, albumina bovina e potenciadores macromoleculares (4,0 g%). 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. Cada reagente é fornecido na diluição ideal para utilização 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**.

Reagente	Linha Celular /Clone
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

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 cápsula 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 heterozigótico) e um controlo negativo em paralelo com cada lote de testes. Os testes devem ser considerados inválidos se os controlos não apresentarem os resultados esperados.
- Ao classificar o tipo de hemácias de doentes com suspeita ou confirmação de serem portadores de anticorpos, alterações proteicas ou um teste de aglutinação direta (TAD) positivo, é importante testar em paralelo um controlo negativo do reagente.
- Antígenos Rh fracos poderão ser mal detetados pelas técnicas em cartão de gel, placa de microtitulação e lâmina. Recomenda-se que os antígenos Rh fracos sejam testados utilizando a técnica de teste em tubo.
- Antes da utilização, deixe o reagente aquecer até à temperatura ambiente. Assim que o reagente tiver sido utilizado, volte a conservá-lo entre 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 profissionais qualificados e com a devida formação, de acordo com os requisitos em vigor no país onde o reagente é utilizado. 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 Técnica de tubo
Técnica de Bio-Rad-ID

- Bio-Rad ID Cards (NaCl, Enzyme tests and Cold Agglutinins).
- Centrífuga Bio-Rad ID.
- Bio-Rad ID CellStab ou ID-Diluent 2.

Técnica de digitação Ortho BioVue

- Cassetes Ortho BioVue System (Neutro).
- Centrífuga Ortho BioVue System.
- Diluyente de glóbulos vermelhos Ortho 0,8%.

Técnica da placa de microtitulação

- Placas de microtitulação com cavidades em "U" validadas.

- Centrífuga de placas de microtitulação.
- Agitador da placa de microtitulação.

Técnica de Slide

- Lâminas de vidro para microscópio ou ladrilhos de cartão branco
- Bastões aplicadores.
- Cronómetro ou cronómetro

Todas as Técnicas

- Pipetas volumétricas.

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
A. Técnica em Tubo

- Preparar uma suspensão das células vermelhas à 2-3 em PBS ou solução salina isotónica.
- Colocar em um tubo etiquetado: 1 volume de Reagente anti-Rh Spinreact e 1 volume da suspensão de células vermelhas a testar.
- Misturar totalmente e centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
- Ressuspender a base de células vermelhas suavemente e ler a aglutinação macroscopicamente
- Qualquer tubo apresentando um resultado negativo ou questionável, deve ser incubado por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Após a incubação repetir os passos 3 e 4.

B. Técnica de Bio-Rad-ID (cartões de NaCl, enzima e 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 no cartão de identificação NaCl/ enzima / aglutininas frias forem necessários.
- Coloque no microtubo apropriado: 50 µL de suspensão de hemácias e 25 µL de reagente spinreact anti rh.
- Centrifugue o (s) cartão (ões) de identificação em uma centrífuga Bio-Rad ID.
- Leia macroscopicamente para aglutinação.

C. Técnica Ortho BioVue (cassetes neutras)

- Preparar uma suspensão de glóbulos vermelhos a 0,8% em 0,8% Ortho Red Cell Diluent.
- Remova a folha de alumínio de quantas câmaras de reação no cassette neutro forem necessárias.
- Coloque na câmara de reação apropriada: 50 µL de suspensão de hemácias e 40 µL de reagente Spinreact anti-Rh.
- Centrifugue o (s) cassette (s) por 5 minutos em uma centrífuga Ortho BioVue system.
- Leia macroscopicamente para aglutinação.

D. Técnica em Microplaca Usando Cavidades em "U"

- Preparar uma suspensão de células vermelhas a 2-3% em PBS ou solução salina isotónica.
- Colocar na cavidade adequada: 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar e 1 volume de Reagente Anti-Rh Spinreact
- Misturar totalmente, preferivelmente com um agitador de microplacas, tomando cuidado para evitar a contaminação cruzada de cavidades.
- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Centrifugar a microplaca por 1 minuto a 140rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
- Ressuspender suavemente a base de células vermelhas usando agitação controlada em um agitador de microplacas.
- Ler a aglutinação macroscopicamente ou com um leitor validado.
- Qualquer reação fraca deve ser repetida pela técnica do tubo.

E. Técnica em lâmina

- Preparar uma suspensão de 35-45% de hemácias de teste em soro, plasma, PBS ou solução salina isotónica. Se isso não for possível, sangue anticoagulado total também pode ser usado como amostra.
- Colocar em uma lâmina de vidro marcada: 1 volume de suspensão de células vermelhas e 1 volume de Reagente Anti-Rh Spinreact
- Usando um bastão aplicador limpo, misturar os reagentes em uma área de cerca de 20x40 mm.
- Inclinar vagarosamente a lâmina por 1 minuto mantendo a temperatura ambiente.
- Ler macroscopicamente após 1 minuto em uma luz difusa e não confundir a presença de fibrina com aglutinação.
- Qualquer reação fraca deve ser repetida pela técnica do tubo.

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 Rh apropriado 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 Rh apropriado 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.
- Os testes em lâmina deverão ser interpretados ao fim de um minuto, de modo a garantir a especificidade e evitar a possibilidade de um resultado negativo 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

- Os reagentes Lorne Anti-Rh não são adequados para utilização com células tratadas com enzimas ou para utilização em técnicas de antiglobulina indiretas.
- Muitos anticorpos IgM monoclonais humanos anti-Rh demonstraram possuir atividade para aglutininas frias anti-i/i, em particular com células do cordão umbilical ou células tratadas com enzimas. Isto pode ser observado se os testes forem incubados a uma temperatura inferior à recomendada.



3. Algumas hemácias expressam antígenos Rh variantes e poderão causar reações mais fracas do que as observadas com células de controlo positivo selecionadas aleatoriamente. O reagente Anti-C pode dar origem a reações mais fracas com o antígeno C de indivíduos R2RZ. Da mesma forma, o reagente Anti-e pode dar origem a reações ligeiramente mais fracas na ausência do antígeno C, p. ex., R2r, r⁺r e rr.
4. Em contrapartida, a supressão ou a reduzida expressão de determinados antígenos de grupos sanguíneos pode dar origem a reações negativas falsas. Por estes motivos, deverá ter-se sempre precaução ao atribuir genótipos com base nos resultados dos testes.
5. Resultados falso-positivos ou falso-negativos podem ocorrer 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
6. O utilizador é responsável pelo desempenho dos reagentes quando utilizados em qualquer outro método que não os mencionados em Técnicas recomendadas.
7. Eventuais desvios relativamente às Técnicas recomendadas devem ser validados antes da utilização⁵.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

1. Antes da libertação, cada lote de reagente Rh 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).
2. A especificidade dos anticorpos monoclonais originais é demonstrada utilizando um painel de células negativas para antígeno.
3. O controlo de qualidade dos reagentes foi realizado utilizando hemácias com fenótipos que foram verificados 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

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. 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.
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. 6th Edition 2002. The Stationary Office.
5. 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-C Monoclonal	Ref: 1700031	5 ml
Anti-E Monoclonal	Ref: 1700033	5 ml
Anti-c Monoclonal	Ref: 1700035	5 ml
Anti-e Monoclonal	Ref: 1700037	5 ml