



LORNE LABORATORIES LTD.

GREAT BRITAIN

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

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



ANTES DE UTILIZAR O PRODUTO, VERIFIQUE O NÚMERO DA INSTRUÇÃO DE USO E A VERSÃO CORRESPONDENTE NA EMBALAGEM DO MESMO.

PARA OBTER AS INSTRUÇÕES DE USO EM FORMATO IMPRESSO, SEM CUSTO ADICIONAL, CONTATAR O SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR: SAC (21) 3907-2534 / sac@kovalent.com.br

SUMÁRIO

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

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

PRINCÍPIO

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

REAGENTES

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

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

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

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

EXPRESSÃO ENFRAQUECIDA DO ANTÍGENO RhD

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

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

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

COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue colhidas com ou sem anticoagulante podem ser usadas para tipagem antigênica. Se ocorrer algum atraso no teste, armazenar as amostras a 2-8°C. Amostras colhidas em EDTA ou citrato devem ser analisadas assim que possível. Amostras colhidas em ACD, CPD ou CPDA-1 podem ser testadas até 35 dias após coleta. Amostras com evidência de hemólise podem fornecer resultados não confiáveis.

PRECAUÇÕES

1. O reagente é somente para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Se o frasco estiver rachado ou vazando, descartar o conteúdo imediatamente.
3. Não utilizar reagentes fora da data de validade (ver rótulos).
4. Não utilizar reagentes se houver presença de precipitados.

5. Durante a manipulação dos reagentes, deve-se utilizar equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas descartáveis e aventais de proteção (jalecos).
6. O reagente foi esterilizado por filtração através de um filtro de 0,2 µm para reduzir a contaminação. Uma vez que o frasco for aberto, o conteúdo permanece viável até a data de vencimento, desde que não haja nenhuma turbidez que indique contaminação ou deterioração.
7. Este reagente possui <0,1% de azida sódica que pode ser tóxica se ingerida e pode reagir com encanamentos de cobre e chumbo formando azidas explosivas. Ao descartar, fluir em grandes volumes de água.
8. Os materiais usados foram testados como negativos para HBsAg e anticorpos anti HIV1+2 e HCV com técnicas microbiológicas aprovadas.
9. Nenhum teste pode garantir que produtos derivados de fontes animais ou humanas estejam livres de agentes infecciosos, portanto, todo o cuidado deve ser tomado no manuseio e descarte de cada frasco e seu conteúdo.

DESCARTE DO FRASCO DE REAGENTE E CONTEÚDO

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

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

CONTROLES E AVISOS

1. Recomenda-se que sejam testados um Controle Positivo (ideal células R_{1r}), um Controle Negativo (ideal células rr) em paralelo a cada bateria de testes; e um Controle Negativo (Controle Anti-D Monoclonal Lorne) em paralelo a cada teste realizado. O teste deve ser considerado inválido se os controles não demonstrarem os resultados esperados.
2. Quando tipificar hemácias de um paciente é importante o uso de um controle negativo, pois os potencializadores macromoleculares podem causar reações falso positivas com células revestidas com IgG, exemplo: no caso de AHAI ou DHPN. Recomenda-se a utilização do Controle Negativo (Controle Anti-D Monoclonal Lorne) em paralelo a cada teste realizado.
3. As variantes do antígeno D parcial e fraco são fracamente detectadas pela técnica de cartões de gel, placa e lâmina. Recomenda-se o uso da técnica em tubos.
4. Nas Técnicas Recomendadas um volume corresponde a aproximadamente 50 µl, quando usado o conta-gotas fornecido com o frasco.
5. O uso dos reagentes e a interpretação dos resultados devem ser realizados por pessoal treinado e qualificado, de acordo com os requerimentos do país onde o reagente está sendo usado.
6. O usuário deve determinar a adequação do reagente para o uso em outras técnicas.

MATERIAL NECESSÁRIO

- Bastões aplicadores
- Leitor de placas automático
- Lâminas de vidro para microscopia
- Tubos-teste de vidro (10 x 75mm ou 12 x 75mm)
- Centrífuga de microplaca
- Agitador de placa
- Tampão Salina Fosfato (PBS) - pH 6.8-7.2 ou Solução Fisiológica 0,9% - pH 6.5-7.5.
- Controles de hemácias positivo (ideal R_{1r}) e negativo (rr)
- Centrífuga de tubos teste
- Microplacas "U" validadas.
- Pipetas volumétricas

TÉCNICAS RECOMENDADAS

Técnica em Tubo

1. Preparar uma suspensão de células vermelhas a testar a 2-3% em PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
2. Colocar em um tubo teste etiquetado: 1 volume de Reagente Anti-D Lorne e 1 volume de suspensão de células vermelhas a testar.
3. Misturar totalmente e centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
4. Ressuspender suavemente a base de células vermelhas e ler a aglutinação macroscopicamente.

Favor ver itens 3 e 4 em " CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS " (ver adiante) para qualquer resultado negativo ou duvidoso.

Técnica em Microplaca Usando Cavidades em "U"

1. Preparar uma suspensão de hemácias teste a 2-3% em PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
2. Colocar na cavidade adequada: 1 volume de Reagente Anti-D Lorne e 1 volume de suspensão de hemácias teste.
3. Misturar totalmente, preferivelmente utilizando um agitador de microplacas, tomando cuidado para evitar a contaminação cruzada entre as cavidades.
4. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
5. Centrifugar a microplaca por 1 minuto a 140 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
6. Ressuspender suavemente o botão de hemácias usando agitação controlada em um agitador de microplacas.
7. Ler a aglutinação macroscopicamente ou com um leitor validado.
8. Qualquer reação fraca deve ser repetida pela técnica em tubo.

Técnica em Lâmina

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

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

ESTABILIDADE DAS REAÇÕES

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

LIMITAÇÕES

1. Anti-D Clone 1 e Clone 2 Lorne não são adequados para o uso com células tratadas com enzimas, células suspensas em LISS ou para o uso em técnicas de antiglobulina indireta.
2. O sangue armazenado pode fornecer resultados mais fracos que o sangue fresco.
3. Aglutinação falso-positiva pode ser observada devido a presença dos potencializadores macromoleculares do reagente, quando testado em células sensibilizadas por IgG, exemplo: AIHA, HDN
4. Resultados falso-positivos ou falso-negativos podem ocorrer devido a:
 - Contaminação do material teste.
 - Concentração celular inadequada.
 - Tempo de incubação ou temperatura inadequada
 - Centrifugação inadequada ou excessiva.
 - Armazenamento inadequado dos materiais do teste.
 - Desvio das técnicas recomendadas.
5. Em caso de resultados duvidosos, lavar a amostra no mínimo duas vezes com tampão PBS ou Solução Fisiológica 0,9% e repetir o teste.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

1. O reagente foi caracterizado pelos procedimentos mencionados nas **Técnicas Recomendadas**.
2. Antes de ser liberado, cada lote de Anti-D Clone 1 e Clone 2 foi testado pelas **Técnicas Recomendadas** contra um painel de hemácias antígeno positivas para assegurar a reatividade adequada.
3. Estes reagentes Anti-D não devem reagir com as células D^{VI} usando as **TÉCNICAS RECOMENDADAS** para uso. Não é recomendado o prosseguimento de testes de resultados negativos usando procedimentos com antiglobulinas. Este reagente não deve ser utilizado para tipagem de antígeno D em rotinas de doadores. Resultados fracos ou duvidosos devem ser investigados de acordo com as Normas aplicáveis onde os reagentes são utilizados. Alguns antígenos D fracos não são sempre detectáveis através de reação imediata pela Técnica em Tubo. Hemácias D^{VI} somente

poderão ser detectadas usando Anti-D Duoclone LORNE Monoclonal (ou reagente similar), na fase antiglobulina do teste.

4. A especificidade dos anticorpos monoclonais é demonstrada usando um painel de células antígeno negativas.
5. A potência dos reagentes foi testada contra os padrões de referência mínimos obtidos do NIBSC (National Institute of Biological Standards and Controls).
 - Anti-D referência 99/836.
6. O controle de qualidade deste reagente foi realizado usando células vermelhas lavadas 2 vezes com tampão PBS ou Solução Fisiológica 0,9% antes do uso.
7. Os reagentes estão de acordo com recomendações do último artigo "Guidelines for the UK Blood Transfusion Services".

GARANTIA

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

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

BIBLIOGRAFIA

1. Kholer G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975, **256**, 495-497.
2. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man 6th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
3. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
4. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987, Chapter 7.
5. Tippett P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. Medical. Laboratory Science 1988; **45**, 88-93
6. Thompson KM, Hughes-Jones NC. Production and characteristics of monoclonal anti-Rh. Bailliere's Clinical Haematology 1990; April
7. 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
8. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
9. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 1995, **5**, 145-150.

APRESENTAÇÕES

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

QUADRO DE SÍMBOLOS

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

INFORMAÇÕES AO CONSUMIDOR

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

Importado e Distribuído por:
Koalent do Brasil Ltda.
Rua Cristóvão Sardinha, 110 – Jd. Bom Retiro
São Gonçalo – RJ – CEP 24722-350
www.koalent.com.br
CNPJ: 04.842.199/0001-56
Farm. Resp.: Jorge A. Janoni CRF: 2648-RJ
MS: 80115310119
SAC: sac@koalent.com.br - (21) 3907-2534