



LORNE LABORATORIES LTD.

GREAT BRITAIN

REAGENTE DE GRUPO SANGUÍNEO MONOCLONAL

Somente para uso diagnóstico *in vitro* – Pronto para uso

Anti-D DuoClone monoclonal - 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 / 0800 015 1414 - 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 % (3)	Afro-Americanos % (3)
+	Rh D +ve	83	92
0	Rh D -ve	17	8

FINALIDADE DE USO

Os reagentes Anti-D são reagentes de tipagem sanguínea destinados a serem usados para determinar qualitativamente a presença ou ausência do antígeno Rh D nas hemácias de doadores de sangue ou pacientes que necessitam de transfusão de sangue quando testados de acordo com as técnicas recomendadas nesta Instrução de Uso.

PRINCÍPIO

Os reagentes contêm anticorpos anti o antígeno D presente nas hemácias humanas que causam aglutinação direta das hemácias teste que carregam o antígeno D e aglutinação indireta de hemácias humanas que são Categoria D^{VI} na fase de teste de antiglobulina (TAI). A ausência de aglutinação geralmente indica a ausência do antígeno D (ver LIMITAÇÕES)

REAGENTES

O reagente monoclonal Anti-D Duoclone Lorne é um reagente de baixa concentração proteica contendo IgM monoclonal humano e IgG anti-D, diluído em tampão fosfato contendo cloreto de sódio, albumina bovina e potencializadores macromoleculares. Durante a tipificação de amostras de pacientes, usando-se as técnicas recomendadas, o 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). Os reagentes não contêm ou consistem em substâncias CMR, ou substâncias desreguladoras endócrinas ou que possam resultar em sensibilização ou reação alérgica por parte do usuário. O 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.

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

EXPRESSIONE 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. O reagente Anti-D Duoclone detecta a maioria das hemácias D fraco e parcial por aglutinação, mas não detecta células D^{VI}. Este reagente detecta D^{VI} e células D parcial na fase TAI.

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

Amostras de sangue colhidas sem ou com anticoagulantes (EDTA, citrato, CPDA) podem ser usadas para tipagem antigênica. As amostras devem ser testadas o mais rápido possível após a coleta. Se ocorrer algum atraso no teste, armazenar as amostras a 2-8°C. Amostras que apresentem hemólise grosseira ou contaminação microbiana não devem ser usadas para teste. Amostras de sangue que mostram evidências de lise podem fornecer resultados não confiáveis. É preferível (mas não essencial) lavar todas as amostras de sangue com PBS ou solução fisiológica antes de serem testadas.

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. Os reagentes foram filtrados através de um filtro de 0,2 µm para reduzir a carga biológica, mas não são fornecidos estéreis. Uma vez que o frasco for aberto, o conteúdo permanece viável até a data de validade, desde que não haja turbidez acentuada, que pode indicar deterioração ou contaminação do reagente.
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 a Ficha de Segurança (MSDS - Material Safety Data Sheets) disponibilizado em nosso site (www.grupokovalent.com.br).

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; em paralelo a cada teste realizado. O teste deve ser considerado inválido se os controles não demonstrarem os resultados esperados.
2. Ao fazer a tipagem de glóbulos vermelhos de um paciente diagnosticado com uma doença que faz com que os glóbulos vermelhos fiquem revestidos com anticorpos ou outras proteínas (como HDN, AIHA), é importante testar os glóbulos vermelhos do paciente usando um Controle Negativo. Os testes devem ser considerados inválidos se os glóbulos vermelhos forem aglutinados usando o Controle Negativo.
3. A determinação de amostras para determinação de categoria D^{VI} é feita apenas pelas técnicas de antiglobulina indireta (TAI).
4. 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.
5. A técnica em tubo de antiglobulina somente pode ser considerada válida se todos os testes negativos reagirem positivamente com células vermelhas sensibilizadas por IgG.
6. Antes de usar, deixe o reagente atingir a temperatura ambiente. Assim que o reagente tiver sido utilizado, coloque o reagente de volta no armazenamento a 2-8°C.
7. Nas Técnicas Recomendadas um volume corresponde a aproximadamente 50 µl, quando usado o conta-gotas fornecido com o frasco.
8. 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.
9. 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
- Banho maria ou incubadora equilibrada a 37°C ±2°C.
- Globulina anti-humana Polyspecific AHG Lorne ou Anti-IgG Monospecific Lorne.
- Hemácias sensibilizadas por IgG.

TÉCNICAS RECOMENDADAS (NÃO PARA CATEGORIA D^{VI})

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 Duoclone 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. Resuspender suavemente a base de células vermelhas e ler a aglutinação macroscopicamente.
5. Quaisquer tubos que apresentem resultado negativo ou questionável (como pode acontecer com amostras D^{VI} e D fracas), devem ser incubados por 15 minutos em temperatura ambiente.
6. Após a incubação, repita os passos 3 e 4.
7. Caso o resultado permaneça negativo ou duvidoso prosseguir com as TÉCNICAS RECOMENDADAS PARA DETECÇÃO DE CATEGORIA D^{VI} (ver adiante).

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 Duoclone 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. Resuspender 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 Duoclone 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. Inclinando lentamente a lâmina por 30 segundos, com agitações posteriores ocasionais durante um período de 2 minutos mantendo a lâmina à 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.

TÉCNICAS RECOMENDADAS (PARA DETECÇÃO DE CATEGORIA D^{VI})

Técnica da Antiglobulina Indireta (TAI)

1. Preparar uma suspensão de glóbulos vermelhos a 2-3% em PBS ou solução salina isotônica.
2. Colocar em um tubo de ensaio rotulado: 1 volume de Lorne Duoclone e 1 volume de suspensão de células vermelhas.
3. Misturar bem e incubar a 37°C por 15 minutos.
4. Lavar os glóbulos vermelhos pelo menos uma vez com PBS ou solução fisiológica, tomando cuidado para decantar solução salina entre as lavagens e resuspender cada botão de célula após cada lavagem. Decantar completamente a solução salina após a última lavagem.
5. Adicionar 2 volumes de anti-globulina humana ou anti-IgG.
6. Misturar e centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
7. Resuspender suavemente o botão de hemácias e ler a aglutinação macroscopicamente.
8. Confirmar a validade de todas as reações negativas com hemácias sensibilizadas com IgG.

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. Ler todos os tubos e microplacas logo após a centrifugação.
2. Completar as etapas de lavagem sem interrupção e centrifugar e ler os testes imediatamente após a adição de globulina anti-humana, pois atrasos podem resultar na dissociação dos complexos antígeno-anticorpo, levando a reações falso-negativas ou positivas fracas
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.
4. Muito cuidado na interpretação dos resultados dos testes realizados em outras temperaturas que não as recomendadas.

LIMITAÇÕES

1. Anti-D Lorne não é adequado para o uso com células tratadas com enzimas, células suspensas em LISS.
2. O uso de soluções para fazer suspensões de glóbulos vermelhos diferentes das descritas nas seções "Técnicas Recomendadas" devem ser validadas antes do uso. Algumas soluções podem dar origem a reações falsas positivas ou falsas negativas.
3. O sangue armazenado pode fornecer resultados mais fracos que o sangue fresco.
4. Aglutinação falso-positiva pode ser observada quando testada células sensibilizadas por IgG.
5. 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.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

1. O reagente foi caracterizado pelos procedimentos mencionados nas Técnicas Recomendadas.
2. Antes da liberação, cada lote de reagente monoclonal Lorne Anti-D Duoclone foi testado usando os métodos de teste recomendados listados nesta Instrução de Uso. Os testes cumpriram os requisitos de teste conforme declarado na versão/edição atual do "Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom" e "Common Technical Specifications".
3. A especificidade dos anticorpos monoclonais é demonstrada usando um painel de células antigênicas negativas.
4. A potência dos reagentes foi testada contra o seguinte padrão de referência de potência mínima obtido do Instituto Nacional de Padrões e Controles Biológicos (NIBSC): Referência Anti-D 99/836.
5. O controle de qualidade dos reagentes foi realizado usando hemácias com fenótipos verificados por um centro de transfusão de sangue do Reino Unido e lavados com PBS ou solução fisiológica antes do uso.

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. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB - Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. Marion E. Reid and Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens and Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 192.
4. 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
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. 6th Edition 2002. The Stationary Office.
6. 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 Duoclone	10 ml
	10 X 10 ml

QUADRO DE SÍMBOLOS

REF	Numero do catálogo		Prazo de validade
IVD	Para diagnóstico in vitro	LOT	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

Berkshire, RG6 4UT

United Kingdom

Importado e Distribuído por:

Kovalent do Brasil Ltda.

Rua Cristóvão Sardinha, 110 – Jd. Bom Retiro

São Gonçalo – RJ – CEP 24722-350

CNPJ: 04.842.199/0001-56

MS: 80115310119

SAC: (21) 3907-2534 / 0800 015 1414

sac@kovalent.com.br

www.grupokovalent.com.br