

Qualitative test for determination of the C and/or D and/or E antigen on human red blood cells.

 IVD
 Store 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 reagent is a blood grouping reagent intended to be used to qualitatively determine the presence or absence of the C antigen (RH2) and/or D antigen (RH1) and/or E antigen (RH3) 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 reagent contains antibodies to the C and D and E antigens on human red cells and will cause direct agglutination (clumping) of human red cells that carry the C and/or D and/or E 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+D+E	MS-24 + RUM-1 + MS-258

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 a patient it is important that a reagent negative control is included since the macromolecular potentiators in the reagent may cause false positive reactions with IgG coated cells.
- Weak Rhesus antigens may be poorly detected by the gel card, microtitre plate and slide technique. It is recommended that weak Rhesus antigens are tested using the tube test technique.
- Before use, let the reagent warm up to room temperature. As soon as the reagent has been used, put the reagent back in storage at 2-8 °C.
- In the procedures one volume is approximately 50µL 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 (ideally R1r) and negative(rr) control red cells.

Bio-Rad-ID 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

1. Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS or Isotonic saline.
2. Place in a labelled test tube: 1 volume Spinreact Anti-Rh reagent and 1 volume red cell suspension.
3. Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
4. Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination
5. Any tubes, which show a negative or questionable result, should be incubated for 15 minutes at room temperature.
6. Following incubation, repeat steps 3 and 4.

B. Bio-Rad ID Technique (NaCl, enzyme test and cold agglutinins cards)

1. Prepare a 0.8% suspension of red cells in ID CellStab or ID-Diluent 2.
2. Remove aluminium foil from as many microtubes on a NaCl, Enzyme tests and Cold Agglutinins ID-Card as needed.
3. Place in appropriate microtube: 50µL of red cell suspension and 25µL of Spinreact Anti Rh reagent.
4. Centrifuge the ID-Card(s) in a Bio-Rad ID centrifuge.
5. Read macroscopically for agglutination.

C. Ortho BioVue Technique (Neutral cassettes)

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

D. Microtitre plate Technique, using "U" wells

1. Prepare a 2-3% suspension of red cells in PBS or isotonic saline.
2. Place in the appropriate well: 1 volume Spinreact Anti-Rh reagent and 1 volume red cell suspension.
3. Mix thoroughly, preferably using a microplate shaker, taking care to avoid cross-well contamination.
4. Incubate at room temperature for 15 minutes (time dependant on user).
5. Centrifuge the microplate for 1 minute at 140 rcf or for a suitable alternative time and force.
6. Resuspend the cell buttons using carefully controlled agitation on a microplate shaker
7. Read macroscopically or with a validated automatic reader.
8. Any weak reactions should be repeated by the tube technique.

E. Slide Technique

1. Prepare a 35-45% suspension of red cells in serum, plasma or PBS or Isotonic saline. If this is not possible, whole anti-coagulated blood may also be used as the sample.
2. Place on a labelled glass slide or card tile: 1 volume of Spinreact Anti-Rh reagent and 1 volume of red cell suspension.
3. Using a clean applicator stick, mix reagent and cells over an area of about 20 x 40 mm.
4. Slowly tilt the slide back and forth for 1 minute, maintaining slide at room temperature.
5. Read macroscopically after 1 minute over a diffuse light and do not mistake fibrin strands as agglutination.
6. Any weak reactions should be repeated by the tube technique.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

1. **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.
2. **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.
3. **Control:** 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

1. Read all tube and microplate tests immediately after centrifugation.
2. Slide tests should be interpreted within one minute to ensure specificity and to avoid the possibility a negative result may be incorrectly interpreted as positive due to drying of the reagent.
3. Caution should be exercised in the interpretation of results of tests performed at temperatures other than those recommended.

LIMITATIONS

1. Spinreact Anti-Rh reagents are not suitable for use with enzyme treated cells or for use in indirect antiglobulin techniques.
2. 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.
3. 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.
4. 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
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".
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 and had been washed with PBS or isotonic saline prior to use.



Anti-C+D+E MONOCLONAL

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

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+D+E Monoclonal	Ref.:1700024	10 mL
-----------------------	--------------	-------



Determinación cualitativa del antígeno C y/o D y/o E en hematies humanos.

IVD

Conservar a 2-8 °C.

RESUMEN

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

USO PREVISTO

El reactivo es un reactivo de agrupación sanguínea destinado a ser utilizado para determinar cualitativamente la presencia o ausencia del antígeno C (RH2) y / o antígeno D (RH1) y / o antígeno E (RH3) en los hematies de donantes de sangre o pacientes, que requieran una transfusión de sangre cuando se analicen de acuerdo con los procedimientos, técnicas recomendadas que se indican en estas IDU.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El reactivo contiene anticuerpos contra los antígenos C y D y E en los hematies humanos y provocará la aglutinación directa de los hematies que contengan el antígeno C y/o D y/o E. La ausencia de aglutinación generalmente es indicativa de la inexistencia de los correspondientes antígenos Rh (ver Limitaciones).

REACTIVOS

Los reactivos Spinreact IgM Monoclonales Anti-Rh son reactivos bajos en proteínas que contienen anticuerpos humanos monoclonales diluidos en cloruro sódico, 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 métodos aquí recomendados sin necesidad de diluciones o adiciones suplementarias. Ver el lote y caducidad de cada referencia en la etiqueta del vial.

Reactivo	Línea Celular / Clon
Anti-C+D+E	MS-24 + RUM-1 + MS-258

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 más información sobre la eliminación del producto o descontaminación en caso de derrame, ver las fichas de seguridad.

NOTAS

- Se recomienda la utilización de un control positivo (idealmente un heterocigoto) y un control negativo para testar de forma paralela en cada lote de tests. Los tests deben considerarse inválidos si los controles no muestran los resultados esperados.
- Durante el tipado de hematies de un paciente es importante incluir un control negativo, debido a que los potenciadores macromoleculares del reactivo pueden provocar falsas reacciones positivas con las células recubiertas de IgG.
- Los antígenos Rhesus débiles pueden ser mal detectados a través de placas de gel, placas microtitulo y porta. Por ello, se recomienda utilizar la técnica en tubo.
- 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 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 dónde 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

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).
- Hematies para control positivo (idealmente R1r) y negativo (idealmente rr).

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 hematies 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 hematies 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 hematies.
- 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, 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 hematies 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 hematies 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 (tarjetas neutras)

- Preparar una suspensión de hematies 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 hematies y 40 µL de reactivo Spinreact Anti-Rh.
- Centrifugar los casets 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 hematies en PBS o solución salina isotónica.
- Depositar en el pocillo apropiado: 1 volumen de reactivo Anti-Rh y 1 volumen de suspensión de hematies.
- Mezclar minuciosamente, preferiblemente usando un agitador de microplacas, cuidando de evitar cualquier contaminación cruzada.
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos (tiempo en función del usuario).
- Centrifugar la microplaca durante 1 minuto a 140 rcf o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Resuspender el botón celular mediante una agitación cuidadosamente controlada en un agitador de microplacas.
- Leer macroscópicamente o con un lector automático validado.
- Cualquier reacción débil debe ser repetida a través del método en tubo.

E. Método en Porta

- Preparar una suspensión de hematies al 35-45% en suero, plasma, PBS o solución salina isotónica. Si no es posible, también se puede usar sangre entera con anticoagulante.
- Depositar en un porta o en una tarjeta identificados: 1 volumen del reactivo Anti-Rh y 1 volumen de la suspensión de hematies.
- Utilizando un palillo aplicador limpio, mezclar el reactivo y las células en un área de unos 20 x 40 mm.
- Inclinarse lentamente el portaobjetos hacia adelante y hacia atrás durante 1 minuto, manteniendo el porta a temperatura ambiente.
- Leer macroscópicamente tras 1 minuto sobre una luz difusa y no confundir las fibras de fibrina con aglutinación.
- Cualquier reacción débil debe ser repetida con el método en tubo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo:** La aglutinación de hematies constituye un resultado positivo y, dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la presencia del antígeno Rh correspondiente en los hematies.
- Negativo:** La ausencia de aglutinación de hematies constituye un resultado negativo y, dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del test, indica la ausencia del antígeno Rh correspondiente en los hematies.
- Control:** 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 inmediatamente tras la centrifugación.
- Los tests en porta deben ser interpretados en un 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

- Los reactivos Spinreact Anti-Rh no son adecuados para su utilización con células tratadas enzimáticamente o para el uso en técnicas indirectas antiglobulina.
- Algunos hematies 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 R₁R₂. De forma parecida, Anti-e puede provocar reacciones algo más débiles en ausencia de antígeno C, ej. R₁r, r'r y rr.
- La supresión o disminución de la expresión de ciertos antígenos de grupos sanguíneos puede, por el contrario, 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.
- Los falsos resultados negativos también pueden deberse a:
 - Contaminación de los materiales del test
 - Conservación, concentración celular, tiempo o temperatura de incubación inadecuadas
 - 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 mencionados en los procedimientos.
- Cualquier desviación de los procedimientos aquí recomendados debería ser validada antes de su utilización.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Previamente a su liberación, cada lote de este reactivo 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 hematies antígenos-negativo.
- El Control de Calidad de los reactivos se realizó utilizando hematies 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.





Anti-C+D+E MONOCLONAL

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

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.

PRESENTACION

Anti-C+D+E Monoclonal	Ref.:1700024	10 mL
-----------------------	--------------	-------



Détermination qualitative de l'antigène C et/ou D et/ou E dans les hématies humaines

IVD
A conserver à 2-8°C.

SOMMAIRE

En 1940, Levine et Stetson ont découvert le système Rh du groupe sanguin. Les principaux antigènes Rh sont, hormis D, les C, E, c et e. L'antigène D est fortement immunogène. Les antigènes C et e sont moins immunogènes que les E et c. Les anticorps correspondants sont cliniquement significatifs vu qu'ils peuvent provoquer des réactions transfusionnelles, ainsi que la maladie hémolytique du nouveau-né.

BUT PRÉVU

Le réactif est un réactif de groupage sanguin destiné à être utilisé pour déterminer qualitativement la présence ou l'absence de l'antigène C (RH2) et/ou D (RH1) et/ou E (RH3) sur les globules rouges des donneurs de sang ou des patients nécessitant une transfusion sanguine lorsqu'il est testé conformément aux procédures énoncées dans la présente notice d'utilisation.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le réactif contient des anticorps contre les antigènes C et D et E sur les globules rouges humains et provoque l'agglutination directe des hématies qui contiennent l'antigène C et/ou D et/ou E. L'absence d'agglutination est en général le signe de l'inexistence des antigènes Rh correspondants (voir **Limitations**).

RÉACTIFS

Les réactifs de groupage sanguin Spinreact Monoclonal IgM Anti-Rh sont des réactifs à faible teneur en protéines contenant des anticorps monoclonaux humains dilués avec du chlorure de sodium, de l'albumine bovine et des potentialisateurs macromoléculaires (4,0 g %). Les réactifs ne contiennent ni ne sont constitués de substances CMR, ou de substances perturbatrices du système endocrinien ou pouvant entraîner une sensibilisation ou une réaction allergique de l'utilisateur. Chaque 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.

Réactif	Ligne Cellulaire / Clone
Anti-C+D+E	MS-24+ RUM-1 + MS-258

Tableau 2 : Lignes cellulaires humaines IgM / Clones utilisés.

PRÉCAUTIONS

- Les réactifs sont uniquement destinés à un usage diagnostic *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 avec des essais microbiologiques approuvés et se sont avérés négatifs pour l'antigène HBs, HCV et pour l'anti-HIV (1/2).
- 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 de tester un contrôle positif (idéalement hétérozygote) et un contrôle négatif en parallèle de chaque lot de tests. Les tests doivent être considérés comme invalides si les contrôles ne montrent pas les résultats attendus.
- Pendant le typage des hématies d'un patient, il est important d'inclure un contrôle négatif vu que les améliorateurs macromoléculaires du réactif peuvent provoquer de fausses réactions positives avec les cellules recouvertes d'IgG.
 - Les antigènes Rhésus faibles peuvent être mal détectés à travers les plaques de gel, plaques microtitre et lame. C'est pourquoi il est recommandé d'utiliser la technique du tube.
 - Dans les techniques que nous recommandons, un volume équivaut environ à 50 µL quand on utilise le compte-gouttes fourni.
 - Avant utilisation, laissez le réactif se réchauffer à température ambiante. Dès que le réactif a été utilisé, met le réactif de nouveau en stockage à 2-8 °C.
 - 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..

REACTIFS ET MATERIAUX REQUIS MAIS NON FOURNIS

Technique des tubes

- Tubes à essai en verre (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Centrifugeuse capable d'essorer à 1000 g pendant 20 secondes.
- Solution PBS (pH 6,8-7,2) ou solution saline isotonique (pH 6,5-7,5).
- Globules rouges de contrôle positifs (idéalement R1r) et négatifs (rr).

Technique 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

- Cassettes du système Ortho BioVue (neutre).
- Centrifugeuse Ortho BioVue System.
- Ortho 0,8% Diluant pour les globules rouges.

Plaque de microtitration Technique

- Plaques de microtitration à puits "U" validées.
- Centrifugeuse à plaques de microtitration.
- Agitateur de plaques de microtitration.

Technique de diapositive

- Lames de microscope en verre ou carreaux de carton blanc
- Bâtons applicateurs.
- Minuterie ou chronomètre

Toutes les techniques

- Pipettes volumétriques.

ÉCHANTILLONS COLLECTE ET PRÉPARATION

Les échantillons de sang peuvent être prélevés dans des anticoagulants EDTA, citrate, 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 d'être testés.

PROCÉDURES

A. Technique du Tube

- Préparer une suspension d'hématies lavées à 2-3 % dans du PBS ou solution saline isotonique.
- Mettre dans un tube identifié : 1 volume de réactif Anti-Rh 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 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-Rh.
- Centrifuger la ou les cartes d'identité dans une centrifugeuse pour carte gel Bio-Rad.
- Lire macroscopiquement pour l'agglutination.

C. Technique Ortho BioVue (cassettes neutres)

- Préparer une suspension à 0,8% de globules rouges dans 0,8% de diluant Ortho Red Cell.
- Supprimer aluminium feuille d'autant de chambres de réaction comme requis.
- Placer dans une chambre de réaction appropriée : 50 µL de suspension de globules rouges et 40 µL de Spinreact Anti-Rh réactif.
- Centrifuger cassette(s) 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 lavées à 2-3 % dans du PBS, pour l'essai.
- Déposer dans le puits approprié : 1 volume de réactif Anti-Rh 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 dûment 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 d'hématies à 35-45 % dans du sérum, plasma ou PBS ou Solution saline isotonique ou utiliser du sang total anticoagulé (en ceson propre plasma).
- Déposer sur une lame identifiée : 1 volume de réactif Anti-Rh et 1 volume de la suspension d'hématies.
- En utilisant un *stick* 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 minutes supplémentaires, en maintenant la lame à température ambiante.
- Lire de manière macroscopique 1 minutes 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.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Positif** : L'agglutination d'hématies constitue un résultat positif ; dans les limites acceptées pour la mise en œuvre de la technique, elle signale la présence appropriée d'antigène Rh 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 Rh dans les hématies.
- Contrôle** : les résultats des tests de cellules agglutinées à l'aide du contrôle négatif du réactif doivent être exclus, car l'agglutination est très probablement causée par l'effet des potentialisateurs macromoléculaires du réactif sur les cellules sensibilisées.

STABILITE DES REACTIONS

- Lire les essais réalisés sur microplaques et tubes immédiatement après la centrifugation.
- 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

1. L'utilisation des réactifs Spinreact Anti-Rh n'est pas adaptée aux cellules traitées de manière enzymatique ou à une utilisation avec des techniques indirectes antiglobuline.
2. Certaines hématies 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 R₂R₂. 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.
3. 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.
4. 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
5. L'utilisateur est responsable du fonctionnement des réactifs s'il recourt à toute autre méthode distincte de celles susmentionnées.
6. Tout écart par rapport aux techniques ici recommandées doit être validé avant utilisation⁵.

CARACTÉRISTIQUES DE LA METHODE

2. Avant la libération, 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 » La spécificité à l'origine des anticorps monoclonaux est prouvée par rapport à un panel d'hématies antigènes-négatif.
3. 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

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+D+E Monoclonal	Réf. :1700024	10 mL
-----------------------	---------------	-------

Determinação qualitativa do antígeno C e/ou D e/ou E em hemácias humanas.

IVD

Conservar a 2-8 °C.

RESUMO

Levine e Stetson, descobriram o sistema Rh do grupo sanguíneo em 1940. Os principais antígenos Rh são, além do D, os C, c, E y e. O antígeno D é altamente imunogénico. Os antígenos C e e são menos imunogénicos que os E e c. Os anticorpos correspondentes são clinicamente significativos uma vez que podem provocar Reações transfusionais, assim como a Síndrome hemolítica do Recém-Nascido.

FINALIDADE PREVISTA

O reagente é um reagente de grupo sanguíneo destinado a ser usado para determinar qualitativamente a presença ou ausência do antígeno C (RH2) e / ou antígeno D (RH1) e / ou antígeno E (RH3) nas hemácias de doadores de sangue ou pacientes requerendo uma transfusão de sangue quando testado de acordo com os procedimentos indicados nestas instruções de uso.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O reagente contém anticorpos para os antígenos C e provoca a aglutinação direta das hemácias que contenham o antígeno C e/ou D e/ou E. A ausência de aglutinação é geralmente indicativa da inexistência dos antígenos Rh correspondentes (consulte **Limitações**).

REAGENTES

Os reagentes IgM Monoclonais Anti-Rh da Spinreact contêm anticorpos humanos monoclonais diluídos em cloreto de sódio, albumina bovina e potenciadores macromoleculares (4,0%). Os reagentes não contêm ou consistem em substâncias CMR, ou desreguladores endócrinos ou que possam resultar em sensibilização ou reação alérgica por parte do usuário. Cada reagente é fornecido na diluição ótima para a sua utilização em todas as técnicas aqui recomendadas sem necessidade de diluições ou adições suplementares. Consulte o lote e prazo de validade de cada referência no rótulo do frasco.

Reagente	Linha Celular / Clone
Anti-C+D+E	MS-24 + RUM-1 + MS-258

PRECAUÇÕES

- Os reagentes destinam-se apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Caso o frasco do reagente esteja partido ou apresente rachas, elimine imediatamente o seu conteúdo.
- Não utilizar reagentes caducados. (consulte o rótulo do frasco).
- Não utilizar reagentes que apresentem precipitados.
- A manipulação do reagente deve ser efetuada com o vestuário de proteção adequado, tal como luvas descartáveis e bata de laboratório.
- Os reagentes foram filtrados através de cápsulas de 0,2 µm para reduzir a carga biológica, mas não são fornecidos estéreis. Uma vez aberto o frasco, o conteúdo deve permanecer viável até à data de validade, desde que não exista uma acentuada turbidez, a qual poderia ser indicativa de deterioração ou contaminação do reagente.
- Os reagentes contêm < 0,1% de azida sódica. A azida sódica pode ser tóxica, caso seja ingerida e pode reagir com canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas explosivas. No caso de eliminação do produto, faça-o utilizando água abundante da torneira.
- Os materiais utilizados na produção dos produtos foram analisados na origem através de testes microbiológicos aprovados e que foram negativos para o antígeno HBS, VHC e para o anti-VIH (1/2). No entanto, devem manipular-se com precaução como sendo potencialmente infecciosos.
- Nenhum método pode garantir que os produtos de origem humana ou animal estão livres de doenças infecciosas. Manipular e eliminar os frascos e o seu conteúdo com cuidado.
- Para mais informações sobre a eliminação do produto ou descontaminação em caso de derrame, consulte as fichas de segurança.

NOTAS

- Recomenda-se a utilização de um controlo positivo (idealmente um heterozigoto) e um controlo negativo para testar paralelamente em cada lote de testes. Os testes devem ser considerados inválidos caso os controlos não apresentem os resultados esperados.
- Durante a tipagem de hemácias de um doente, é importante incluir um controlo negativo, uma vez que os potenciadores macromoleculares do reagente podem provocar reações positivas falsas com as células revestidas de IgG.
- Os antígenos Rhesus fracos podem ser mal detetados através de placas de gel, placas microtitulo e lâminas. Como tal, recomenda-se utilizar a técnica em tubo.
- Antes de usar, deixe o reagente aquecer até a temperatura ambiente. Assim que o reagente for usado, coloque-o de volta no armazenamento a 2-8 °C.
- Nas técnicas aqui recomendadas, um volume é aproximadamente 50 µL utilizando o gotejador fornecido.
- A utilização dos reagentes e a interpretação dos resultados devem ser efetuadas por pessoal qualificado e formado de acordo com os requisitos do país onde os reagentes estejam a ser utilizados. o utilizador deve determinar a idoneidade dos reagentes para outras técnicas.

CONSERVAÇÃO

Os frascos de reagente devem ser armazenados entre 2-8 °C no recebimento. O armazenamento prolongado em temperaturas fora dessa faixa pode resultar na perda acelerada da reatividade do reagente. Este reagente foi submetido a estudos de estabilidade no 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

- Tubos de ensaio de vidro (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Centrífuga capaz de girar a 1000 g por 20 segundos.
- Solução de PBS (pH 6,8-7,2) ou solução salina isotônica (pH 6,5-7,5).
- Globúlos vermelhos de controle positivo (idealmente R1r) e negativo (rr).

Técnica 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 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 lâmina

- Lâminas de vidro para microscópio ou ladrilhos de cartão branco
- Varas aplicadoras.
- Cronómetro ou cronómetro

Todas as Técnicas

- Pipetas volumétricas.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras de sangue podem ser coletadas em EDTA, amostras de citrato, anticoagulantes CPDA ou como uma amostra coagulada. As amostras devem ser testadas o mais rápido possível após a coleta. Se ocorrer um atraso no teste, armazene as amostras entre 2-8 °C. Amostras com hemólise grosseira ou contaminação microbiana não devem ser usadas para o 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 salina isotônica antes de serem testadas

PROCEDIMENTOS

A. Método em Tubo

- Preparar uma suspensão de 2-3% de hemácias a testar lavadas, em PBS ou solução salina isotônica.
- Adicionar num tubo identificado: 1 volume de reagente Anti-Rh e um volume da suspensão de hemácias.
- Misturar minuciosamente e centrifugar os tubos durante 20 segundos a 1000 rcf (g) ou a uma força e tempo alternativos adequados.
- Ressuspender cuidadosamente o agregado celular e ler macroscopicamente por aglutinação.
- Qualquer tubo que apresente um resultado negativo ou questionável deve ser incubado durante 15 minutos à temperatura ambiente.
- Após a incubação, repetir os passos 3 e 4.

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

- Prepare uma suspensão de glóbulos vermelhos a 0,8% em ID CellStab ou ID-Diluent 2.
- Remova a folha de alumínio de quantos microtubos em um NaCl, Enzyme tests e Cold Agglutinins ID-Card conforme necessário.
- 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)

- Prepare 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 em um cassete 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) cassete (s) por 5 minutos em uma centrífuga Ortho BioVue System.
- Leia macroscopicamente para aglutinação.

D. Técnica de Microplaca, utilizando poços em "U"

- Preparar uma suspensão de 2-3% das hemácias a testar, em PBS ou solução salina isotônica.
- Depositar no poço apropriado: 1 volume de reagente Anti-Rh e 1 volume da suspensão de hemácias.
- Misturar minuciosamente, utilizando preferencialmente um agitador de microplacas, tendo cuidado para evitar qualquer contaminação cruzada.
- Incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos (tempo em função do utilizador).
- Centrifugar a microplaca durante 1 minuto a 140 rcf ou a uma força e tempo alternativos adequados.
- Ressuspender o agregado celular através de uma agitação cuidadosamente controlada num agitador de microplacas.
- Ler macroscopicamente ou com um leitor automático validado.
- Qualquer reação fraca deve ser repetida através da técnica em tubo.

E. Método em Lâmina

- Preparar uma suspensão de 35-45% de em soro, plasma ou PBS ou solução salina isotônica ou use sangue total anticoagulado (em seu próprio plasma)
- Depositar numa lâmina identificada: 1 volume do reagente Anti-Rh e 1 volume da suspensão de hemácias.
- Utilizando um stik aplicador limpo, misturar o reagente e as células numa área de aproximadamente 20 x 40 mm.
- Inclinar lentamente a lâmina de trás para a frente durante 1 minuto.
- Ler macroscopicamente após 1 minuto sobre uma luz difusa e não confundir as fibras de fibrina com a aglutinação.
- Qualquer reação fraca deve ser repetida com a técnica em tubo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Positivo:** A aglutinação das células vermelhas constitui um resultado positivo e dentro das limitações aceites para o procedimento do teste, indica a presença do antígeno Rh apropriado nas hemácias.
- Negativo:** A ausência de aglutinação de hemácias constitui um resultado negativo e dentro das limitações aceites para o procedimento da técnica, indica a ausência do antígeno Rh apropriado nas hemácias.
- Controle:** os resultados dos testes de células que são aglutinadas usando o controle negativo do reagente devem ser excluídos, pois a aglutinação é provavelmente causada pelo efeito dos potenciadores macromoleculares do reagente sobre as células sensibilizadas.

ESTABILIDADE DAS REAÇÕES

- Ler os testes realizados em microplacas e tubos imediatamente após a centrifugação.
- Os testes em lâmina devem ser interpretados em 1 minuto de modo a garantir a especificidade e evitar a possibilidade de que um resultado negativo seja interpretado incorretamente como positivo devido à secagem do reagente.
- Os resultados, de testes realizados a temperaturas diferentes das aqui recomendadas, devem ser interpretados com cautela.

LIMITAÇÕES

- Os reagentes Anti-Rh da Spinreact não são adequados para utilização com células tratadas enzimaticamente ou para utilização em técnicas indiretas antiglobulina.
- Algumas hemácias expressam variantes do antígeno Rh, podendo causar reações mais fracas do que as observadas em células controle positivas selecionadas aleatoriamente. Anti-C pode causar reações mais fracas com o antígeno C de indivíduos R₂R₂. De forma semelhante, Anti-e pode causar reações sensivelmente mais fracas ma ausência do antígeno C, por ex.: R₂r, r'r e rr.

3. A supressão ou diminuição da expressão de determinados antigénio de grupos sanguíneos, pode inversamente dar origem a reações negativas falsas. Por estes motivos, a atribuição de genótipos, com base nos resultados do teste, deve ser sempre realizada com cautela.

4. Podem também ocorrer resultados falsos positivos ou negativos devido a:

- Contaminação dos materiais do teste
- Conservação inadequada, concentração celular, tempo ou temperatura de incubação
- Centrifugação inapropriada ou excessiva
- Desvio em relação às técnicas recomendadas

5. O utilizador é responsável pelo funcionamento dos reagentes em qualquer outro método diferente dos mencionados como **técnicas aqui detalhadas**.

6. Qualquer desvio em relação às **técnicas aqui recomendadas** deverá ser validado antes da sua utilização.⁵

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

1. Antes da liberação, cada lote deste reagente foi testado usando os métodos de teste recomendados listados nestas instruções de uso. Os testes cumpriram os requisitos de teste indicados na versão / edição atual das "Diretrizes para os Serviços de Transfusão de Sangue no Reino Unido" e nas "Especificações Técnicas Comuns".

2. A especificidade da origem dos anticorpos monoclonais está demonstrada comparativamente a um painel de hemácias antigénios-negativo.

3. O Controle de Qualidade dos reagentes foi realizado usando glóbulos vermelhos com fenótipos que foram verificados por um centro de transfusão de sangue do Reino Unido e foram lavados com PBS ou solução salina isotónica antes do uso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marion E. Reid and Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens and Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 181.
2. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6
3. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. 6th Edition 2002. The Stationary Office.
4. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
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+D+E Monoclonal	Ref.:1700024	10 mL
-----------------------	--------------	-------