



LORNE LABORATORIES LTD.

GREAT BRITAIN

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

Anti-D DuoClone Monoclonal (IgG + IgM) - 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 nas doenças hemolíticas dos recém-nascidos.

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

PRINCÍPIO

O reagente causa a aglutinação direta das hemácias teste que carregam o antígeno D, e a aglutinação indireta das hemácias categorizadas como D^{VI} na fase antiglobulina do teste. A ausência de aglutinação geralmente indica a ausência do antígeno D (ver LIMITAÇÕES).

REAGENTES

O reagente de grupo sanguíneo Anti-D DuoClone Monoclonal Lorne é um reagente de baixa concentração proteica, contendo IgM e IgG anti-D monoclonais diluídos em tampão fosfato, contendo cloreto de sódio 0,9%, albumina bovina 3% e potencializadores macromoleculares. Na tipificação das amostras de pacientes, usando as técnicas recomendadas, este reagente irá aglutinar diretamente células RhD positivas, incluindo a maioria de variantes (exceto D^{VI}) e uma grande proporção de fenótipos fracos D(D^{VI}). 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.

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

EXPRESSÃO ENFRAQUECIDA DO ANTÍGENO RhD

O termo coletivo D^{VI} é largamente usado 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 epítopos de antígenos D nas hemácias. O termo D parcial indica indivíduos com falta de epítopos D. A célula D^{VI} é uma categoria D parcial onde falta a maioria das epítopos D. O Reagente Anti-D DuoClone detectará a maioria das hemácias D fraco e parcial por aglutinação direta, mas não detectará células D^{VI}. Este reagente detectará D^{VI} e células D parcial na fase TAI.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os frascos devem ser armazenados de 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 de 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 a 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 testes 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. A determinação de amostras teste de categoria D^{VI} é feita somente pela Técnica de Antiglobulina Indireta.
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. Nas Técnicas Recomendadas um volume corresponde a aproximadamente 50 µl, quando usado o conta-gotas fornecido com o frasco.
7. 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.
8. 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.
- Controle 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 hemácias a testar a 2-5% em tampão PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
2. Colocar em um tubo teste identificado: 1 volume de Reagente Duoclone Lorne e 1 volume de suspensão de hemácias a testar.
3. Centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
4. Ressuspender suavemente o botão de hemácias e ler a aglutinação macroscopicamente.
5. Qualquer tubo que apresentar um resultado negativo ou duvidoso (que pode ocorrer com amostras D^U ou D fraco), deve ser incubado por 15 minutos a 37° C.
6. Após a incubação, repetir as etapas 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 a testar a 2-5% em tampão PBS ou Solução Fisiológica 0,9%.
2. Colocar na cavidade adequada: 1 volume de Reagente Duoclone Lorne e 1 volume de suspensão de hemácias a testar.
3. Misturar totalmente, preferivelmente com 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 a 35-45% de hemácias a testar 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 a testar.
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.

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

Técnica da Antiglobulina Indireta (TAI)

1. Após a etapa 7 da Técnica em Tubo, lavar as hemácias teste contidas no tubo 3 vezes com PBS ou Solução Fisiológica 0,9%, tomando cuidado para decantar a salina entre as lavagens e ressuspender o botão de hemácias após cada lavagem. Decantar completamente a salina após a última lavagem.
2. Adicionar 2 volumes de anti-globulina humana ou anti-IgG.
3. Misturar e centrifugar todos os tubos por 20 segundos a 1000 rcf ou por tempo e força alternativos adequados.
4. Ressuspender suavemente o botão de hemácias e ler a aglutinação macroscopicamente.

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 hemácias teste.
2. **Negativo:** A ausência de aglutinação das hemácias teste constitui um resultado negativo e, dentro das limitações aceitas do procedimento, indica a ausência do antígeno D nas hemácias teste.
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

- Muito cuidado na interpretação dos resultados dos testes realizados em outras temperaturas que não as recomendadas.
- Ler todos os tubos e microplacas logo após a centrifugação.
- Completar todas as etapas de lavagem sem interrupção, centrifugar e ler imediatamente após a adição de anti-globulina humana. Um atraso pode resultar na dissociação dos complexos antígeno-anticorpo, levando a resultados falso-negativos ou reações fracamente positivas.
- Os testes de 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 Duoclone Lorne não é adequado para o uso com células tratadas com enzimas ou células suspensas em LISS.

2. O sangue armazenado pode fornecer resultados mais fracos que o sangue fresco.
3. Aglutinação falso-positiva pode ser observada quando testada células sensibilizadas por IgG.
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 Duoclone Monoclonal Lorne foi testado pelas **Técnicas Recomendadas** contra um painel de hemácias antígeno positivas, para assegurar a reatividade adequada.
3. A especificidade dos anticorpos monoclonais é demonstrada usando um painel de antígenos de células negativas.
4. A potência dos reagentes foi testada contra os padrões de referência mínimos obtidos do NIBSC. Anti-D referência 99/836.
5. O controle de qualidade deste reagente foi realizado usando células vermelhas lavadas 2 vezes com PBS ou Solução Fisiológica 0,9% antes do uso.
6. Os reagentes estão de acordo com recomendações do último artigo “Guidelines for the UK Blood Transfusion Services”.

GARANTIA

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.

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








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 Duoclone Monoclonal	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

READING

Berks, 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

www.kovalent.com.br

CNPJ: 04.842.199/0001-56

Farm. Resp.: Jorge A. Janoni CRF: 2648-RJ

MS: 80115310119

SAC: sac@kovalent.com.br - (21) 3907-2534