

CONTINUT

REF 3440010 Anti D 10 ml

Doar pentru diagnosticul profesional *in vitro*.Rh
Anti-D (IgG+IgM)Test calitativ al antigenilor D pe eritrocite umane.
TEST PE PLACI SAU IN TUBURI

PRINCIPIU

Prezenta antigenului D este determinata prin testarea eritrocitelor cu anticorpi cu o specificitate Anti-D cunoscuta. Reactivul provoaca o aglutinare directa a celulelor purtatoare de antigen si o aglutinare indirecta a eritrocitelor din categoria DVI in faza de testare cu antiglobuline (AHG). Aglutinarea eritrocitelor testate indica prezenta antigenului corespunzator. Absenta aglutinarii indica *in general* absenta antigenului D.

| Anti-D | Fenotip | Caucazieni % | Afro-americiani % |
|--------|--------------|--------------|-------------------|
| + | Rh D pozitiv | 85 | 72 |
| 0 | Rh D negativ | 15 | 28 |

Antigenul D are cea mai mare semnificatie clinica dintre antigenii non-ABO si este implicat in producerea Reactiilor Hemolitice Transfuzionale si a Bolii Hemolitice a nou-nascutului.

COMPOZITIA REACTIVULUI

Reactivul Anti-D Monoclonal pentru testarea grupelor de sange produs de Linear Chemicals contine Anti-D de origine umana, anticorpi monoclonali IgM si IgG.

ANTI-D (IgG+IgM) Linia celulara IgG MS-26, IgM RUM-1. Buffer fosfat continand clorura de sodiu 0.9%. Azida de sodiu <0.1%, albumina bovina, potentiatori macromoleculari

Acest reactiv va aglutina direct cu celulele Rh D pozitiv, incluzand majoritatea variantelor (dar NU D_{VI}) si o mare parte a D-urilor slabe (Du).

Precautii: Componentele de origine umana au fost testate si au fost gasite negative pentru prezenta anticorpilor: anti-HIV 1+2, anti-HCV, HBsAg. Se recomanda totusi ca serurile de control trebuie manipulate cu atentie si tratate ca potential infectioase.

Se recomanda purtarea echipamentului de protectie si a manusilor cand se manipuleaza reactivii.

Atentie: Reactivul din acest kit contine azida de sodiu. Nu permiteti contactul cu pielea sau cu mucoasele.

Exprimarea antigenului RhD slabit

Termenul colectiv "Du" este folosit in sens larg pentru descrierea eritrocitelor care au o reactie a antigenului D mai slaba decat normalul.

Termenul "D slab" indica indivizii cu un numar redus de antigeni D completi intr-o eritrocita.

Termenul "D partial" indica indivizii cu epitope D lipsa.

D_{VI} este o categorie D partiala, in care cei mai multi epitopi D lipsesc.

Reactivul va determina cele mai multe exemple de eritrocite D partiale si slabe prin aglutinare directa, dar nu va detecta eritrocitele D_{VI}. Acest reactiv va determina eritrocitele D_{VI} si pe cele partial D in etapa cu AHG.

PREPARAREA REACTIVILOR

Reactivii sunt gata preparati, pentru folosirea imediata.

CONSERVARE SI STABILITATE

1. Reactivii raman stabili pana la data de expirare imprimata pe flacon, daca sunt stocati la frigider (2-8°C) cu capacul bine strans. Evitati contaminarea reactivilor in timpul folosirii. Nu folositi reactivii dupa data expirarii.
2. Nu inghetati si nu expuneti la temperaturi ridicate. Stocarea indelungata a reactivilor la temperaturi mai mari decat domeniul indicat poate duce la pierderea accentuata a reactivitatii acestora.
3. Solutiile trebuie sa fie clare, limpezi. Turbiditatea poate indica o contaminare microbiana. Nu folositi reactivii daca observati precipitati in solutie.
4. Daca o sticluta este crapata sau curge aruncati continutul imediat. Respectati normele de transport si depozitare a deseurilor biologice.

PROBELE

Probele de sange pot fi recoltate cu sau fara anticoagulant. Ar trebui testate cat mai repede cu putinta.

Probele recoltate pe EDTA sau heparina pot fi testate in 48 de ore de la recoltare.

Sangele recoltat in ACD, CPD, CPDA-1 poate fi folosit in maxim 35 zile de la data recoltarii.

Pastrati probele la frigider, 2°-8°C.

MATERIALE NECESARE

- Eprubete (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- Pipete Pasteur.
- Centrifuga Sero-fuge sau similara.
- Lame sticla.
- Aplicatoare de unica folosinta.

MATERIALE SUPLIMENTARE

- Phosphate Buffered Saline (PBS): 8.5 - 9.0 g/L NaCl (0.145-0.154 mol/L) pH 7.0±0.2 la 22 ±1°C.
- Eritrocite de testare. Pozitive (ideal grupul R1r) si negative (grup rr).



PROCEDURA**I Testarea pe lamela**

1. Puneti pe lamela o picatura (approx. 40 uL) de sange integral resuspendat (concentratia celulelor 35-40%).
2. Adaugati o picatura (approx. 40 uL) de reactiv langa picatura de sange.
3. Amestecati reactivul cu sangele cu ajutorul unui aplicator, pe o suprafata de aprox. 2 cm diametru.
4. Rotiti usor lamela continuu timp de 2 minute.

Citirea

Observati aglutinarea macroscopic.

Reactie negativa:

Nu apare aglutinarea dupa cele 2 minute.

Reactie pozitiva:

Apare reactie de aglutinare a celulelor rosii in cateva secunde. NU confundati firele de fibrina cu aglutinarea). Orice reactie salba trebuie reconfirmata prin metoda in tub.

II Testarea in tub (Nerecomandata pentru DVI)

1. Preparati o suspensie 2-3% de eritrocite spalate (de doua ori cu PBS) in PBS.
2. Adaugati o picatura (approx. 40 uL) de reactiv in eprubeta.
3. Adaugati o picatura (approx. 40 uL) de eritrocite spalate.
4. Amestecati si centrifugati pentru 20 de secunde cu o forta de 1000 r.c.f. sau pentru o forta si un timp echivalente.
5. **Citirea**

Resuspendati usor fiecare solutie si observati aglutinarea macroscopic.

Reactie negativa:

O suspensie omogena indica o reactie negativa.

Reactie pozitiva:

Aglutinarea celulelor rosii indica o reactie pozitiva.

Orice tub care prezinta o reactie negativa sau in dubiu trebuie incubat pentru 15 minute la 18-25°C. Dupa incubare repetati pasii 4 si 5.

III Testarea in tub (Recomandata pentru DVI) Antihuman Globulin (Du Test)

1. Urmati pasii 1, 2, 3 de la testul in tub anterior.
2. Amestecati bine si incubati la 37°C pentru 15 minute.
3. Spalati eritrocitele de test de 4 ori cu PBS, avand grija sa decantati solutia salina intre spalari si sa resuspendati toate celulele dupa fiecare spalare. Dupa ultima spalare scurgeti complet solutia salina.
4. Adaugati o picatura de anti-human globulin pe fiecare grup de eritrocite uscate.
5. Amestecati bine si centrifugati toate tuburile pentru 20 de secunde cu o forta de 1000 r.c.f. sau pentru o forta si un timp echivalente.

Citirea

Ca la testul in tub II.

Tehnica cu antiglobulina poate fi considerata valida daca toate testele negative reactioneaza pozitiv cu eritrocite sensibilizate cu IgG.

INTERPRETAREA

1. *Reactie pozitiva:* Aglutinarea eritrocitelor testate inseamna un rezultat pozitiv si in limita procedurii de testare, indica prezenta antigenilor D in eritrocitele testate.
2. *Reactie negativa:* Neaglutinarea eritrocitelor testate constituie un rezultat negativ si in limita procedurii de testare indica absenta antigenilor D in eritrocitele testate.
3. Rezultatele testarilor celulelor care au aglutinat folosind control negativ trebuie excluse, deoarece aglutinarea lor s-a produs cel mai probabil datorita din cauza efectului potentiatorilor macromoleculari din reactivi pe celulele sensibilizate.

CONTROL DE CALITATE SI SFATURI

- Este recomandabil sa lucrati un control pozitiv (ideal grupul R1r) si un control negativ (ideal group rr) in paralel cu fiecare lot de pacienti. Testele trebuie considerate necorespunzatoare daca rezultatele controalelor nu sunt cele asteptate.

- Este recomandabil sa lucrati si un control negativ deoarece este posibil ca din cauza potentiatorilor macromoleculari din reactivi sa avem o reactie fals pozitiva din cauza celulelor cu IgG .

- Cititi toate tuburile imediat dupa centrifugare.

- Reactii fals negative sau slab pozitive pot aparea si din cauza: spalarii complete fara intrerupere si centrifugare, si citirea imediat dupa adaugarea anti-human globulinei deoarece pot aparea intarzieri in disocierea complexelor anticorp-antigen.

- Lamele trebuie interpretate in decurs de 2 minute pentru a asigura specificitatea si a elimina posibilitatea unui rezultat negativ incorect interpretat ca pozitiv din cauza uscarii reactivilor.

- Trebuie acordata o atentie deosebita interpretarii rezultatelor testelor desfasurate la alta temperatura decat cea precizata pentru interpretarea rezultatelor.

- Folosirea reactivilor si interpretarea rezultatelor trebuie facuta numai de personal calificat, in conformitate cu normele legale in vigoare in tara in care se utilizeaza reactivii.

-Utilizatorul trebuie sa aprecieze daca reactivii sunt portiviti pentru folosirea cu alte tehnici.

PERFORMANTA ANALITICA

- Reactivul este caracteristic procedurii descrise in capitolul PROCEDURA.

- Inainte de a fi lansat , fiecare lot de Anti-D Monoclonal este testat cu eritrocite cu antigen pozitiv conform PROCEDURII pentru a verifica reactivitatea.

- Puterea reactivului este testata conform standardelor NIBSC (National Institute of Biological Standards and Controls):

- Standard de referinta Anti-D 91/592

LIMITARILE PROCEDURII

- Serul Anti-D nu este potrivit pentru folosirea cu celule tratate enzimatic sau celule suspendate in LISS

- Sangele conservat poate da reactii mai slabe decat sangele proaspat

-Rezultate fals pozitive sau fals pozitive pot aparea si din cauza:

- contaminarii materialelor folosite in testare

- nerespectarii timpului de incubatie sau a temperaturii

- centrifugare necorespunzatoare

- stocare necorespunzatoare a reactivilor sau omiterea unui reactiv.



REFERINTE

1. Kholer, G. and Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256 : 495-497 (1975).
2. Race RR, Sanger R. *Blood Groups in Man* 6th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers Chapter 2 (1975).
3. Issitt PD. *Applied Blood Group Serology*, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, Chapter 10 (1985).
4. Mollison PL. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 8th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, Chapter 7 (1987).
5. Tippett P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. *Medical Laboratory Science*; 45: 88-93 (1988).
6. Thompson KM, Hughes-Jones NC. Production and characteristics of monoclonal anti-Rh. *Bailliere's Clinical Haematology*; (1990).
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* 5: 171-184 (1995).
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*, 5: 145-150 (1995).