



REACTIFS MONOCLONAUX POUR LA DETERMINATION DES GROUPES SANGUINS
MODE D'EMPLOI

Réactif monoclonal Anti-D duoclone : Pour les techniques des tubes, des cartes Bio-Rad ID, des colonnes Ortho BioVue, des lames et des microplaques.

RÉSUMÉ

Le système Rh de groupes sanguins a été découvert en 1940. L'antigène D est l'antigène érythrocytaire non-ABO le plus important sur le plan clinique. Il est impliqué dans les réactions transfusionnelles hémolytiques et la maladie hémolytique du nouveau-né.

| Anti-D | Phénotype | Caucasiens (%) ³ | Afro-américains (%) ³ |
|--------|-----------|-----------------------------|----------------------------------|
| + | Rh D + | 83 | 92 |
| 0 | Rh D - | 17 | 8 |

OBJECTIF

Les réactifs anti-D sont des réactifs de détermination des groupes sanguins qui ont pour objectif de déterminer de manière qualitative la présence ou l'absence d'antigènes Rh D sur les globules rouges de donneurs ou de patients nécessitant une transfusion sanguine lors de tests conformes aux techniques recommandées dans ce mode d'emploi.

PRINCIPE

Les réactifs contiennent des anticorps dirigés contre l'antigène D des globules rouges humains et entraîneront l'agglutination directe (amas) des globules rouges humains porteurs de l'antigène D et l'agglutination indirecte des globules rouges humains de type D^{VI} dans la phase antiglobuline du test. L'absence d'agglutination (pas d'amas) indique généralement l'absence de l'antigène D sur les globules rouges humains (voir **Limites**).

REACTIF

Le réactif monoclonal anti-D duoclone pour la détermination des groupes sanguins de Lorne est un réactif mélangé à faible concentration en protéines contenant une IgM ou une IgG humaine monoclonale anti-D, diluée dans un tampon phosphate contenant du chlorure de sodium (0,9 g%), de l'albumine bovine (2,0 g%) et des potentialisateurs macromoléculaires (1,5 g%). Lors du génotypage des échantillons de patients, ce réactif entraînera l'agglutination directe des cellules Rh D positives, y compris la majorité des variants (sauf D^{VI}) et une grande proportion de phénotypes D faibles (D^o) lorsque les techniques recommandées sont utilisées. Les réactifs ne contiennent pas et ne sont pas composés de substances CMR, de perturbateurs endocriniens ni de substances qui pourraient entraîner une sensibilisation ou une réaction allergique chez l'utilisateur. Le réactif est fourni à une dilution optimale pour une utilisation sur des échantillons de patients avec toutes les techniques recommandées ci-dessus sans nécessiter de dilution ou d'ajout supplémentaire. Pour connaître le numéro de référence du lot et sa date d'expiration, consultez l'étiquette sur le flacon.

| IgM/IgG | Lignée cellulaire/Clone |
|---------|-------------------------|
| IgM | RUM-1 |
| IgG | MS-26 |

EXPRESSION AFFAIBLIE DE L'ANTIGÈNE RhD

Le terme collectif D^o est largement utilisé pour décrire les globules rouges qui ont une expression plus faible de l'antigène D que la normale. L'expression « D faible » indique des individus portant un nombre réduit de sites d'antigène D complets par globule rouge. L'expression « D partiel » indique des individus avec des épitopes de l'antigène D absents. Les globules rouges DVI sont des cellules de type D partiel dans lesquelles la majorité des épitopes de l'antigène D sont manquants. Le réactif duoclone détectera la plupart des exemples de globules rouges de type D partiel ou D faible par agglutination directe, mais ne détectera pas les globules rouges de type DVI. Ce réactif détectera les globules rouges DVI et D partiels dans la phase de TIA.

CONSERVATION

Les flacons de réactifs doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C dès leur réception. Une conservation prolongée à des températures en dehors de cette plage peut accélérer la perte d'efficacité du réactif. Ce réactif a fait l'objet d'études sur la stabilité dans les transports à 37 °C et -25 °C comme décrit dans le document BS EN ISO 23640:2015.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de sang peuvent être prélevés et placés dans de l'EDTA, du citrate, des anticoagulants CPDA, ou utilisés sous la forme d'échantillons coagulés. Les échantillons doivent être testés dès que possible après le prélèvement. En cas de retard du test, conservez les échantillons à une température comprise entre 2 et 8 °C. Les échantillons présentant une hémolyse ou une contamination microbienne flagrante ne doivent pas être testés. Les échantillons de sang présentant des signes clairs de lyse peuvent produire des résultats incertains. Il est préférable (mais pas indispensable) de laver tous les

échantillons de sang avec un tampon phosphate salin (PBS) ou une solution saline isotonique avant le test.

PRÉCAUTIONS

1. Le réactif est conçu pour le diagnostic *in vitro* uniquement.
2. Si un flacon de réactif est fendu ou s'il fuit, jetez son contenu immédiatement.
3. N'utilisez pas le réactif après sa date d'expiration (voir l'étiquette sur le flacon).
4. N'utilisez pas le réactif en présence d'un précipité.
5. Portez des vêtements de protection lors de la manipulation des réactifs, tels que des gants jetables et une blouse de laboratoire.
6. Le réactif a été filtré dans une capsule de 0,2 µm afin de réduire leur charge biologique, mais il n'est pas fourni stérile. Dès qu'un flacon est ouvert, son contenu reste viable jusqu'à la date d'expiration tant qu'il n'y a pas de traces de turbidité, pouvant indiquer une détérioration ou une contamination du réactif.
7. Le réactif contient < 0,1 % d'azote de sodium. L'azote de sodium peut être toxique s'il est ingéré et peut réagir avec les canalisations en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques explosifs. Éliminez-le dans de grandes quantités d'eau.
8. Les matériaux utilisés pour fabriquer le réactif ont été testés à la source à l'aide de tests microbiologiques approuvés et considérés comme négatifs aux anticorps contre le VIH 1+2 et le VHC et à l'HBsAg.
9. Aucun test ne peut garantir que les produits dérivés de sources humaines ou animales ne comportent pas d'agents infectieux. Faites très attention lors de l'utilisation et de l'élimination de chaque flacon et de son contenu.

ÉLIMINATION DU RÉACTIF ET GESTION DES DÉVERSEMENTS

Pour plus d'informations sur l'élimination du réactif et sur la procédure de décontamination en cas de déversement, consultez la **Fiche de données de sécurité**, disponible sur demande.

CONTRÔLES ET CONSEILS

1. Il est recommandé de tester un contrôle positif (idéalement des cellules R₁r) et un contrôle négatif (idéalement des cellules rr) avec chaque série de tests. Les tests doivent être considérés comme non valides si les contrôles ne présentent pas les résultats attendus.
2. Lors du génotypage des globules rouges d'un patient ayant reçu le diagnostic d'une maladie dans laquelle les globules rouges sont recouverts d'anticorps ou d'autres protéines (telle que la maladie hémolytique du nouveau-né ou l'AHAI), il est important de tester les globules rouges du patient à l'aide du contrôle négatif monoclonal D de Lorne (référence : 650010). Les tests doivent être considérés comme non valides si les globules rouges sont agglutinés à l'aide du contrôle négatif monoclonal D (référence 650010).
3. Testez les échantillons pour déterminer le type D^{VI} uniquement à l'aide du **test indirect à l'antiglobuline, des techniques de Coombs de Bio-Rad, ou des cartes Bio-Rad ID et des techniques de Coombs d'Ortho BioVue**.
4. Les antigènes D faibles et variants sont faiblement détectés par les techniques des cartes de gel, des microplaques et des lames. Il est recommandé de tester les variants de l'antigène faibles et partiels à l'aide de la technique des tubes.
5. La technique des tubes à l'antiglobuline ne peut être considérée comme valide que si tous les tests négatifs réagissent positivement aux globules rouges sensibilisés à l'IgG.
6. Avant son utilisation, laissez le réactif se réchauffer à température ambiante. Dès que le réactif a été utilisé, remettez-le directement dans son emplacement de conservation à une température comprise entre 2 et 8 °C.
7. Dans **Techniques recommandées**, un volume représente approximativement 50 µl lorsque le flacon compte-gouttes fourni est utilisé.
8. L'utilisation du réactif et l'interprétation des résultats doivent être assurées par du personnel formé et qualifié conformément aux exigences du pays où les réactifs sont utilisés.
9. L'utilisateur doit déterminer si les réactifs peuvent être utilisés avec d'autres techniques.

RÉACTIFS ET MATÉRIELS REQUIS

- Globuline anti-humaine, par exemple AHG Elite de Lorne (référence 435010) ou IgG anti-humaine, par exemple IgG anti-humaine de Lorne (référence 402010).
- Pipettes volumétriques.
- Lames de microscope en verre ou cartons blancs
- Bâtonnets applicateurs.
- Tubes en verre (10 x 75 mm ou 12 x 75 mm).
- Bain-marie ou incubateur à chaleur sèche équilibré à 37 °C ± 2 °C.
- Centrifugeuse pour tubes.
- Laveuse de cellules de Coombs.

- Microplaques à puits en U validées.
- Centrifugeuse pour microplaques.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de plaque automatique.
- Cartes Bio-Rad ID à faible concentration ionique/Coombs) et (NaCl, test enzymatique et agglutinines froides).
- Centrifugeuse Bio-Rad ID.
- Solution Bio-Rad ID-CellStab ou ID-Diluent 2.
- Incubateur Bio-Rad ID équilibré à 37 °C ± 2 °C.
- Cassettes Ortho BioVue (globulines anti-humaines/Coombs) et (neutres).
- Centrifugeuse Ortho BioVue.
- Bloc chauffant Ortho BioVue équilibré à 37 °C ± 2 °C.
- Diluant de globules rouges Ortho à 0,8 %.
- Globules rouges sensibilisés à l'IgG, par exemple cellules de contrôle pour test de Coombs de Lorne (référence 970010).
- 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).

TECHNIQUES RECOMMANDÉES (SAUF TYPE D^{VI})

A. Technique des tubes

1. Préparez une suspension à 2-3 % de globules rouges dans une solution PBS ou saline isotonique.
2. Placez dans un tube étiqueté : 1 volume du réactif duoclone de Lorne et 1 volume de la suspension de globules rouges.
3. Mélangez complètement et centrifugez tous les tubes 20 secondes à 1 000 rcf ou selon une période et une force alternatives appropriées.
4. Attendez la resuspension du culot de globules rouges, puis lisez l'agglutination au niveau macroscopique.
5. Tous les tubes qui présentent un résultat négatif ou douteux (comme cela peut survenir avec les échantillons D^b ou D faibles) doivent être incubés pendant 15 minutes à température ambiante.
6. Après l'incubation, répétez les étapes 3 et 4.

B. Technique Bio-Rad ID (NaCl, cartes de test enzymatique et d'agglutinines froides)

1. Préparez une suspension à 0,8 % de globules rouges dans une solution ID-CellStab or ID-Diluent 2.
2. Retirez le film en aluminium du nombre de microtubes requis.
3. Placez dans le microtube approprié : 50 µl de suspension de globules rouges à tester et 25 µl de réactif duoclone de Lorne.
4. Centrifugez la ou les cartes ID dans la centrifugeuse de cartes de gel.
5. Lisez l'agglutination au niveau macroscopique.

C. Technique Ortho BioVue (cartes neutres)

1. Préparez une suspension à 0,8 % de globules rouges dans une solution à 0,8 % de diluant de globules rouges Ortho.
2. Retirez le film en aluminium du nombre de chambres de réaction requis.
3. Placer dans une chambre de réaction appropriée : 50 µl de suspension de globules rouges à tester et 40 µl de réactif duoclone de Lorne.
4. Centrifugez la ou les cassettes dans la centrifugeuse Ortho BioVue.
5. Lisez l'agglutination au niveau macroscopique.

D. Technique sur microplaque avec puits en U

1. Préparez une suspension à 2-3 % de globules rouges dans une solution PBS ou saline isotonique.
2. Placez dans le puits approprié 1 volume du réactif duoclone de Lorne et 1 volume de la suspension de globules rouges.
3. Mélangez complètement, de préférence à l'aide d'un agitateur de microplaques, en prenant soin d'éviter la contamination entre les puits.
4. Laissez incubé à température ambiante pendant 15 minutes (le temps dépend de l'utilisateur).
5. Centrifugez la microplaque 1 minute à 140 rcf ou selon une période et une force alternatives appropriées.
6. Attendez la resuspension du culot de globules rouges en utilisant une technique d'agitation soigneusement contrôlée sur l'agitateur de microplaques.
7. Lisez au niveau macroscopique ou à l'aide d'un lecteur automatique validé.
8. Toute réaction faible doit être retestée par la technique des tubes.

E. Technique des lames

1. Préparez une suspension à 35-45 % de globules rouges dans du sérum, du plasma, ou une solution PBS ou saline isotonique ou utilisez du sang total anticoagulé (dans son propre plasma).
2. Placez sur une lame en verre ou un carton blanc étiqueté(e) : 1 volume du réactif duoclone de Lorne et 1 volume de la suspension de globules rouges à tester.
3. À l'aide d'un bâtonnet applicateur propre, mélangez le réactif et les cellules sur une surface d'environ 20 x 40 mm.
4. Toujours à température ambiante, inclinez lentement la lame d'avant en arrière pendant 30 secondes et procédez à de nouveaux mélanges occasionnels pendant 1 minute.
5. Lisez au niveau macroscopique après 1 minute sur une lumière diffuse sans prendre les filaments de fibrines pour de l'agglutination.
6. Toute réaction faible doit être retestée par la technique des tubes.

TECHNIQUES RECOMMANDÉES (POUR DÉTECTER LE TYPE D^{VI})

A. Test indirect à l'antiglobuline (TIA)

1. Préparez une suspension à 2-3 % de globules rouges dans une solution PBS ou saline isotonique.
2. Placez dans un tube étiqueté : 1 volume du réactif duoclone de Lorne et 1 volume de la suspension de globules rouges à tester.

3. Mélangez complètement et laissez incubé à 37 °C pendant 15 minutes.
4. Lavez les globules rouges au moins une fois à l'aide d'une solution PBS ou saline isotonique, en prenant soin de laisser la solution saline décanter entre les lavages et d'attendre la resuspension du culot de globules rouges après chaque lavage. Après le dernier lavage, laisser complètement décanter la solution saline.
5. Ajoutez 2 gouttes d'AHG ou d'anti-IgG à chaque culot de cellules sèches.
6. Mélangez complètement et centrifugez tous les tubes 20 secondes à 1 000 rcf ou selon une période et une force alternatives appropriées.
7. Attendez la resuspension du culot, puis lisez au niveau macroscopique.
8. Confirmez la validité de toutes les réactions négatives à l'aide des globules rouges sensibilisés à l'IgG.

B. Technique Bio-Rad ID (solution à faible concentration ionique/cartes de Coombs)

1. Préparez une suspension à 0,8 % de globules rouges dans une solution ID-CellStab or ID-Diluent 2.
2. Retirez le film en aluminium du nombre de microtubes requis.
3. Placez dans le microtube approprié : 50 µl de suspension de globules rouges et 25 µl de réactif duoclone de Lorne.
4. Laissez incubé la ou les cartes ID pendant 15 minutes à 37 °C.
5. Centrifugez la ou les cartes ID dans la centrifugeuse de cartes de gel.
6. Lisez l'agglutination au niveau macroscopique.

C. Technique Ortho BioVue (AHG/cartes de Coombs)

1. Préparez une suspension à 0,8 % de globules rouges dans une solution à 0,8 % de diluant de globules rouges Ortho.
2. Retirez le film en aluminium du nombre de chambres de réaction requis.
3. Placer dans une chambre de réaction appropriée : 50 µl de suspension de globules rouges à tester et 40 µl de réactif duoclone de Lorne.
4. Laissez incubé la ou les cassettes pendant 15 minutes à 37 °C.
5. Centrifugez la ou les cassettes dans la centrifugeuse Ortho BioVue.
6. Lisez l'agglutination au niveau macroscopique.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU TEST

1. **Positif** : l'agglutination des globules rouges indique un résultat positif et, dans les limites acceptées de la procédure de test, la présence d'un antigène D sur les globules rouges.
2. **Négatif** : l'absence d'agglutination des globules rouges indique un résultat négatif et, dans les limites acceptées de la procédure de test, l'absence d'un antigène D sur les globules rouges.
3. Les résultats de test présentant des cellules qui sont agglutinées à l'aide du contrôle négatif doivent être exclus, car l'agglutination est probablement due à l'effet des potentialisateurs macromoléculaires sur les cellules sensibilisées.

STABILITÉ DES RÉACTIONS

1. Lisez tous les tubes et microplaques immédiatement après la centrifugation.
2. Effectuez les étapes de lavage sans interruption, puis centrifugez et lisez les résultats immédiatement après l'ajout de la globuline anti-humaine, car tout retard peut entraîner une dissociation des complexes antigène-anticorps, responsables de faux négatifs ou de faibles positifs.
3. Les tests sur lames doivent être interprétés après un maximum d'une minute afin de garantir la spécificité et d'éviter la possibilité d'interpréter un résultat négatif comme positif à cause du séchage du réactif.
4. Il convient de faire preuve de prudence lors de l'interprétation des résultats des tests à des températures autres que celles recommandées.

LIMITES

1. Le réactif anti-D de Lorne ne convient pas à un usage avec des cellules ayant subi un traitement enzymatique ou suspendues dans une solution à faible concentration ionique.
2. Pour la réalisation des suspensions de globules rouges, le recours à d'autres solutions que celles décrites dans la section « Techniques recommandées » du document doit être validé avant utilisation. Certaines solutions pourraient donner lieu à des résultats faux positifs ou faux négatifs.
3. Le sang conservé pourrait donner des résultats plus faibles que le sang frais.
4. Une agglutination faussement positive pourrait être observée lorsque des cellules sensibilisées à l'IgG sont testées.
5. Des résultats faux positifs ou faux négatifs pourraient également survenir à cause de :
 - La contamination des matériaux de test
 - Un stockage, une concentration cellulaire, un temps d'incubation ou une température incorrect(e)
 - Une centrifugation excessive ou incorrecte
 - Le non-respect des techniques recommandées

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE SPÉCIFIQUES

1. Avant sa commercialisation, chaque lot de réactif monoclonal anti-D duoclone de Lorne a été testé à l'aide des méthodes de test recommandées énumérées dans le mode d'emploi. Les tests étaient conformes aux exigences de test publiées dans la version actuelle du document « Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom » (Lignes directrices pour les services de transfusion de sang au Royaume-Uni) et dans les spécifications techniques communes.
2. La spécificité des anticorps monoclonaux sources est démontrée à l'aide d'un panel de cellules négatives à l'antigène.
3. La puissance du réactif a été testée à l'aide de l'étalon de référence d'une puissance minimale obtenu auprès du NIBSC (National Institute of

Biological Standards and Controls, Institut national des étalons et contrôles biologiques) suivant :

- Étalon de référence anti-D 99/836.

4. Le contrôle qualité des réactifs a été réalisé à l'aide de globules rouges dont les phénotypes ont été vérifiés par un centre de transfusion sanguine du Royaume-Uni et lavés à l'aide d'une solution PBS ou saline isotonique avant utilisation.

AVIS DE NON-RESPONSABILITÉ

1. L'utilisateur est responsable des performances du réactif s'il utilise une méthode non mentionnée dans la section **Techniques recommandées**.
2. Le non-respect des **techniques recommandées** doit être validé avant utilisation⁶.

RÉFÉRENCES

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 & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & 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.

RÉACTIFS DISPONIBLES

| Taille de flacon | Numéro de référence | Tests par flacon |
|------------------|---------------------|------------------|
| 10 ml | 740010 | 200 |
| 1 000 ml | 740000* | 20 000 |
| 5 000 ml | 740000x5* | 100 000 |

*Cette taille est destinée à un usage pour fabrication ultérieure et n'est donc pas accompagnée du marquage CE.



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Royaume-Uni
Tél : +44 (0) 118 921 2264
Fax : +44 (0) 118 986 4518
E-mail : info@lornelabs.com

| | | |
|-----------|------------|---|
| EC | REP | Advena Ltd. Tower Business Centre, 2 nd Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta |
|-----------|------------|---|