

## ANTI-IgG E ANTI-C3d POLISPECIFICI (CONIGLIO) AHG MISCELATI ISTRUZIONI PER L'USO

### AHG Elite (Clear or Green): Per tecniche dell'antiglobulina.

#### RIEPILOGO

Nel 1945, Coombs, Mourant e Race descrissero l'uso del siero AHG per la rilevazione di anticorpi non agglutinanti legati agli eritrociti. Nel 1957, Dacie e altri dimostrarono che gli anticorpi presenti nei sieri antiglobuline erano diretti contro determinati componenti del complemento. I reagenti AHG rilevano molecole di anticorpo non agglutinanti e molecole di complemento attaccate agli eritrociti a seguito di reazioni antigene-anticorpo *in vivo* o *in vitro*.

#### USO PREVISTO

Questi reagenti polispecifici per la determinazione del gruppo sanguigno sono destinati ad essere utilizzati per determinare qualitativamente la presenza o l'assenza di anticorpi IgG sensibilizzanti (tutte e 4 le sottoclassi) e di fattori di complemento C3d e C3b sugli eritrociti umani, se analizzati secondo le tecniche raccomandate indicate nelle presenti istruzioni per l'uso.

#### PRINCIPIO

I reagenti contengono anticorpi contro gli anticorpi IgG umani e i fattori di complemento C3 (C3d e C3b) presenti sugli eritrociti umani e causano l'agglutinazione (formazione di aggregati) diretta degli eritrociti sensibilizzati con anticorpi IgG umani e/o fattori di complemento C3 (C3d e C3b). L'assenza di agglutinazione in genere indica l'assenza di anticorpi IgG umani sensibilizzanti e di fattori di complemento C3 (C3d e C3b) sugli eritrociti umani (vedere **Limitazioni**).

#### REAGENTI

I reagenti Lorne AHG Elite Clear e AHG Elite Green contengono anti-IgG derivate dai conigli con attività non specifica eliminata tramite adsorbimento e anti-C3d IgM monoclonale di topo, Clone BRIC-8. Gli anticorpi sono diluiti in una soluzione tamponata contenente albumina bovina. I reagenti non contengono né comprendono sostanze CMR, o sostanze che alterano il sistema endocrino o che potrebbero provocare una sensibilizzazione o una reazione allergica nell'utilizzatore. Ogni reagente viene fornito alla diluizione ottimale per l'uso con tutte le tecniche raccomandate indicate di seguito senza la necessità di ulteriori diluizioni o aggiunte. Per il numero di riferimento del lotto e la data di scadenza vedere **Etichetta della fiala**.

Reagente	Linea cellulare/Clone	Colore	Colorante utilizzato
AHG Elite Clear	Anti-IgG umane di coniglio BRIC-8 (Anti-C3d)	Incolore	Nessuno
AHG Elite Green	Anti-IgG umane di coniglio BRIC-8 (Anti-C3d)	Verde	Blu patentato e tartrazina

#### CONSERVAZIONE

Conservare le fiale di reagente a 2-8°C dal momento della ricezione. La conservazione prolungata a temperature al di fuori di questo intervallo può provocare una perdita accelerata della reattività del reagente. Questo reagente è stato sottoposto a studi di stabilità al trasporto a 37°C e -25°C come descritto nel documento BS EN ISO 23640:2015.

#### RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni devono essere messi in EDTA con procedure asettiche per impedire il legame del complemento *in vitro*, e analizzati il prima possibile. Se l'EDTA non è disponibile, i campioni messi in ACD, CPD o CPDA-1 sono preferibili a quelli coagulati. Se sono disponibili solo campioni coagulati, non refrigerarli prima dei test.

#### PRECAUZIONI

- I reagenti sono destinati esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*.
- Se una fiala di reagente presenta crepe o perdite, gettare via il contenuto immediatamente.
- Non usare i reagenti dopo la data di scadenza (vedere **Etichetta della fiala**).
- Non usare i reagenti se è presente un precipitato.
- Quando si maneggiano i reagenti, indossare indumenti protettivi quali guanti monouso e un camice da laboratorio.
- I reagenti sono stati filtrati attraverso una capsula da 0,2 µm per ridurre la carica batterica, ma non vengono forniti sterili. Dopo l'apertura di una fiala, il contenuto rimane vitale fino alla data di scadenza, a condizione che non vi sia una torbidità marcata, che può indicare il deterioramento o la contaminazione del reagente.
- I reagenti contengono <0,1% di azoturo di sodio. L'azoturo di sodio può risultare tossico se ingerito e può reagire con le tubature in piombo o rame fino a formare azoturi metallici esplosivi. Per lo smaltimento sciacquare con grandi volumi di acqua.

- I materiali utilizzati per la realizzazione dei prodotti sono stati testati dal produttore e sono risultati negativi agli anticorpi HIV 1+2 e HCV e ad HBsAg mediante test microbiologici approvati.
- Nessun test noto può garantire che i prodotti derivati da fonti umane o animali siano privi di agenti infettivi. È necessario prestare attenzione durante l'uso e lo smaltimento di ciascuna fiala e del suo contenuto.

#### SMALTIMENTO DEL REAGENTE E GESTIONE DELLE FUORIUSCITE

Per informazioni sullo smaltimento dei reagenti e sulla decontaminazione di un sito di fuoriuscita, vedere le **Schede di dati di sicurezza dei materiali**, disponibili su richiesta.

#### CONTROLLI E CONSIGLI

- Si raccomanda di analizzare un controllo positivo (Anti-D debole <0,1 IU/ml) e un controllo negativo (un siero inerte) in parallelo con ogni lotto dei test. I test devono essere considerati non validi se i controlli non mostrano i risultati previsti.
- Le tecniche dell'antiglobulina possono essere considerate valide solo se tutti i test negativi reagiscono positivamente con gli eritrociti sensibilizzati con IgG.
- Prima dell'uso, far riscaldare il reagente fino a temperatura ambiente. Dopo aver utilizzato il reagente, riportarlo nel luogo di conservazione a 2-8°C.
- Nelle **Tecniche raccomandate** un volume è di circa 50µl se si usa la fiala contagocce fornita.
- L'uso dei reagenti e l'interpretazione dei risultati devono essere eseguiti da personale adeguatamente formato e qualificato in conformità ai requisiti del paese in cui i reagenti sono in uso.
- L'utilizzatore deve stabilire l'idoneità dei reagenti per l'uso in altre tecniche.

#### REAGENTI E MATERIALI NECESSARI

- Sistema di lavaggio per cellule Coombs.
- Provette in vetro (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Eritrociti sensibilizzati con IgG, per esempio Lorne Coombs Control Cells (Cat # 970010)
- Anticorpo inerte, per esempio Lorne Inert AB Serum (Cat # 110010).
- Soluzione a bassa forza ionica (LISS): Contenente 0,03M NaCl, 0,003M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Tampone NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.7 a 22°C + 1°C e 0,24M di glicina.
- Soluzione di PBS (pH 6.8-7.2) o soluzione salina isotonica (pH 6.5-7.5).
- Pipette volumetriche.
- Bagno d'acqua o incubatore di calore a secco equilibrato a 37°C ± 2°C.
- Anti-D debole, per esempio Lorne Precise Weak Anti-D (Cat # 209005).

#### TECNICHE RACCOMANDATE

##### A. Tecnica dell'antiglobulina diretta (DAT)

- Lavare 1 volume di eritrociti (sospensione al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica) 4 volte con PBS o soluzione salina isotonica, avendo cura di travasare la soluzione salina tra un lavaggio e l'altro e di risospendere ciascun sedimento dopo ogni lavaggio. Travasare completamente la soluzione salina dopo l'ultimo lavaggio.
- Aggiungere 2 volumi di Lorne AHG Elite a ciascun sedimento essiccato.
- Miscelare accuratamente e centrifugare tutte le provette per 20 secondi a 1000 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Risospendere delicatamente il sedimento eritrocitario e procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione

##### B. Tecnica dell'antiglobulina indiretta (NISS IAT)

- Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
- Inserire in una provetta etichettata: 2 volumi di siero per test e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Miscelare accuratamente e incubare a 37°C per 15 minuti.
- Lavare gli eritrociti 4 volte con PBS o soluzione salina isotonica, avendo cura di travasare la soluzione salina tra un lavaggio e l'altro e di risospendere ciascun sedimento dopo ogni lavaggio. Travasare completamente la soluzione salina dopo l'ultimo lavaggio.
- Aggiungere 2 volumi di Lorne AHG Elite a ciascun sedimento essiccato.
- Miscelare accuratamente e centrifugare tutte le provette per 20 secondi a 1000 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Risospendere delicatamente il sedimento eritrocitario e procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione

##### C. Tecnica dell'antiglobulina indiretta in LISS (LISS IAT)

- Preparare una sospensione di eritrociti all'1,5-2% in LISS.
- Inserire in una provetta etichettata: 2 volumi di siero per test e 2 volumi di sospensione di eritrociti.
- Miscelare accuratamente e incubare a 37°C per 15 minuti.

4. Seguire i passaggi dal 4 al 7 della **NISS IAT** di cui sopra.

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST

1. **Positivo:** L'agglutinazione degli eritrociti costituisce un risultato positivo del test e, entro i limiti accettati della procedura di test, indica la presenza di IgG e/o del complemento (C3d/C3b) sugli eritrociti.
2. **Negativo:** L'assenza di agglutinazione degli eritrociti costituisce un risultato negativo e, entro i limiti accettati della procedura di test, indica l'assenza di IgG e/o del complemento (C3d/C3b) sugli eritrociti.

#### STABILITÀ DELLE REAZIONI

1. Le fasi di lavaggio devono essere completate senza interruzioni e i test devono essere centrifugati e letti immediatamente dopo l'aggiunta del reagente. Eventuali ritardi possono dare origine alla dissociazione dei complessi antigene-anticorpo con conseguenti risultati falsi negativi o deboli positivi.
2. Occorre prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati dei test effettuati a temperature diverse da quelle **raccomandate**.

#### LIMITAZIONI

1. Gli eritrociti con DAT positivo dovuto a un rivestimento di IgG non possono essere tipizzati mediante le **Tecniche dell'antiglobulina indiretta**.
2. Un DAT positivo dovuto alla sensibilizzazione del complemento può non rispecchiare la fissazione del complemento *in vivo* se le cellule per test provengono da un campione coagulato refrigerato.
3. Il lavaggio inadeguato degli eritrociti nelle tecniche dell'antiglobulina indiretta può neutralizzare il reagente AHG.
4. Al termine della fase di lavaggio, la soluzione salina residua in eccesso può diluire l'AHG Elite, riducendone la potenza.
5. Un test dell'antiglobulina diretta negativo non preclude necessariamente la diagnosi clinica di Malattia emolitica del neonato o di anemia emolitica autoimmune ABO. Inoltre, non esclude necessariamente la HDN, soprattutto se si sospetta un'incompatibilità con ABO.
6. I risultati falsi positivi o falsi negativi possono verificarsi anche a causa di:
  - Contaminazione dei materiali dei test
  - Errata conservazione, concentrazione cellulare, tempo o temperatura di incubazione
  - Errata o eccessiva centrifugazione

#### CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI SPECIFICHE

1. Prima del rilascio, ogni lotto di questi reagenti è stato testato utilizzando i metodi di analisi raccomandati elencati nelle presenti istruzioni per l'uso contro gli eritrociti rivestiti da Anti-D, Anti-K e Anti-Fy<sup>a</sup> per verificarne l'adeguata reattività. I test sono risultati conformi ai requisiti di analisi indicati nella versione/edizione attuale delle "Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom" ("Linee guida per i servizi di trasfusione di sangue nel Regno Unito").
2. Le potenze di anti-IgG e anti-C3d sono state analizzate in base ai seguenti standard di riferimento di potenza minima ottenuti dal National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC, Istituto nazionale degli standard e dei controlli biologici):
  - Standard di riferimento 96/666 Anti-AHG
3. La potenza di anti-C3d è dimostrata in test che utilizzano cellule rivestite con C3d e C3b.
4. La presenza di agglutinine eterospecifiche contaminanti o di anticorpi anti C4d è stata esclusa in test che utilizzano eritrociti di tutti i gruppi ABO e cellule rivestite con C4d.
5. La reattività di qualsiasi componente della catena Anti-IgM, Anti-IgA o Anti-IgG che potrebbe essere presente non è stata stabilita.
6. Il Controllo qualità dei reagenti è stato effettuato utilizzando eritrociti con fenotipi verificati da un centro trasfusionale britannico e lavati con PBS o soluzione salina isotonica prima dell'uso.

#### DICHIARAZIONE DI NON RESPONSABILITÀ

1. L'utilizzatore è responsabile delle prestazioni dei reagenti con qualsiasi metodo diverso da quelli indicati nelle **Tecniche raccomandate**.
2. Qualsiasi scostamento dalle **Tecniche raccomandate** deve essere approvato prima dell'uso<sup>6</sup>.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Voak D, Downie DM, Moore BPL, and Engelfreit CP. Anti-Human Globulin reagent specification. The European and ISBT/ICSH View. Biotest Bulletin 1: 7-22 (1986).
2. The Department of Health and Social Security. Health Services Management Antiglobulin Test. False negative results, HN (Hazard) (83) 625 Nov 1983.
3. Bruce M, Watt AH, Hare W, Blue A, Mitchell R. A serious source of error in antiglobulin testing. Transfusion 1986; 26: 177-181.
4. Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in AHG (AHG) tests: optimum conditions and quality control. Haematologia 1988; 21(1): 3-16.
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6<sup>th</sup> 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.

#### DIMENSIONI DEI REAGENTI DISPONIBILI

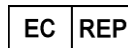
Dimensione fiala	Numero catalogo	Test per fiala
------------------	-----------------	----------------

Lorne AHG Elite (Clear)	10 ml	415010	100
	1000 ml	415000*	10.000
Lorne AHG Elite (Green)	10 ml	435010	100
	1000 ml	435000*	10.000

\*Questa dimensione è esclusivamente per uso successivo (FFMU), e pertanto non è dotata di marchio CE.



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



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2<sup>nd</sup> Flr.,  
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta