



REAGENTI MONOCLONALI PER LA DETERMINAZIONE DEL GRUPPO SANGUIGNO

ISTRUZIONI PER L'USO

Anti-A, Anti-B e Anti-A,B Monoclonal: Per tecniche in provetta, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, micropiastra e su vetrino.

RIEPILOGO

Nel 1900, Landsteiner scoprì che il siero di alcune persone agglutinava gli eritrociti di altre. Oggi si riconoscono quattro fenotipi comuni: O, A, B e AB. Da allora sono stati identificati dei sottogruppi di A e B.

| Gruppo diretto | | | Gruppo indiretto | | | | ABO Fenotipo | Caucasici % ¹ |
|----------------|---|-----|------------------|----------------|---|---|--------------|--------------------------|
| A | B | A,B | A ₁ | A ₂ | B | O | | |
| + | 0 | + | 0 | 0 | + | 0 | A | 43 |
| 0 | + | + | + | + | 0 | 0 | B | 9 |
| 0 | 0 | 0 | + | + | + | 0 | O | 44 |
| + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | AB | 4 |

USO PREVISTO

I reagenti ABO per la determinazione del gruppo sanguigno sono destinati a essere utilizzati per determinare qualitativamente la presenza o l'assenza degli antigeni A e/o B sugli eritrociti dei donatori di sangue o dei pazienti che necessitano di una trasfusione sanguigna, se analizzati secondo le tecniche raccomandate indicate nelle presenti istruzioni per l'uso.

PRINCIPIO

I reagenti contengono anticorpi contro l'antigene A e/o B appropriato presente sugli eritrociti umani e causano l'agglutinazione diretta (formazione di aggregati) degli eritrociti che trasportano l'antigene ABO corrispondente. La mancata agglutinazione in genere indica l'assenza dell'antigene ABO corrispondente sugli eritrociti umani (vedere **Limitazioni**).

REAGENTI

I reagenti Lorne Monoclonal IgM ABO per la determinazione del gruppo sanguigno ABO contengono anticorpi monoclonali di topo diluiti in un tampone fosfato contenente cloruro di sodio, EDTA e 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**.

| Prodotto | Linea cellulare/Clone | Colore | Colorante utilizzato |
|----------|-------------------------|----------|----------------------|
| Anti-A | 9113D10 | Blu | Blu patentato |
| Anti-B | 9621A8 | Giallo | Tartrazina |
| Anti-A,B | 152D12 + 9113D10 + ES15 | Incolore | Nessuno |

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 di sangue possono essere raccolti in anticoagulanti EDTA, citrato, CPDA o come campione coagulato. Analizzare i campioni il prima possibile dopo aver effettuato la raccolta. In caso di ritardo nei test, conservare i campioni a 2-8°C. I campioni che presentano evidente emolisi o contaminazione microbica non devono essere utilizzati per i test. I campioni di sangue che mostrano segni di lisi possono dare risultati non attendibili. È preferibile (ma non indispensabile) lavare tutti i campioni di sangue con tampone fosfato salino (PBS) o soluzione salina isotonica prima di analizzarli.

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.
- 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 del reagente e sulla decontaminazione di un sito di fuoriuscita, vedere le **Schede di dati di sicurezza dei materiali**, disponibili su richiesta.

1. CONTROLLI E CONSIGLI

- Si raccomanda di analizzare un controllo positivo e un controllo negativo in parallelo con ogni lotto dei test. I test devono essere considerati non validi se i controlli non mostrano i risultati previsti.
- Poiché tali reagenti non contengono potenziatori macromolecolari, è molto improbabile che si verifichino reazioni false positive con cellule rivestite da IgG.
- I campioni di sangue dei sottogruppi A o B deboli (per esempio Ax) possono dare luogo a reazioni false negative o deboli se analizzati con vetrini, piastre per microtitolazione o schede gel. È consigliabile analizzare nuovamente i sottogruppi deboli utilizzando la tecnica in provetta.
- Gli individui di età superiore ai sei mesi devono ricevere conferma dei risultati della determinazione del proprio gruppo sanguigno ABO tramite l'analisi del proprio siero o plasma contro le cellule note del gruppo A₁ e B prima di poter confermare che il proprio gruppo sanguigno sia ABO.
- Prima dell'uso, far riscaldare il reagente fino a temperatura ambiente. Dopo aver utilizzato il reagente, riporlo 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

- Pipette volumetriche.
- ID-Card Bio-Rad (cloruro di sodio, test enzimatico e agglutinine a freddo).
- ID-Centrifuge Bio-Rad.
- ID-CellStab o ID-Diluent 2 Bio-Rad.
- Cassette Ortho BioVue System (Neutre).
- Centrifuga Ortho BioVue System.
- Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.
- Vetrini da microscopio in vetro o cartoncini di reazione bianchi.
- Bastoncini applicatori.
- Provette in vetro (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Centrifuga per provette.
- Micropiastre a pozzetto "a U" omologate.
- Centrifuga per micropiastre.
- Agitatore per piastre.
- Soluzione di PBS (pH 6.8-7.2) o soluzione salina isotonica (pH 6.5-7.5).
- Eritrociti di controllo positivo e negativo:
Anti-A: gruppo A (controllo positivo) e gruppo O (controllo negativo).
Anti-B: gruppo B (controllo positivo) e gruppo O (controllo negativo).
Anti-A,B: gruppo A e gruppo B (controlli positivi) e gruppo O (controllo negativo).

TECNICHE RACCOMANDATE

A. Tecnica in provetta

- Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
- Inserire in una provetta etichettata: 1 volume di reagente Lorne Anti-ABO e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Miscelare accuratamente e incubare a temperatura ambiente per 1 minuto.
- Centrifugare tutte le provette per 10 secondi a 1000 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Risospesare delicatamente il sedimento eritrocitario e procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.
- Le provette che mostrano un risultato negativo o discutibile devono essere incubate per 15 minuti a temperatura ambiente.
- Dopo l'incubazione, ripetere i passaggi 4 e 5.

B. Tecnica Bio-Rad-ID (cloruro di sodio, test enzimatico e schede con agglutinine a freddo)

1. Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in ID-CellStab o ID-Diluent 2.
2. Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero di microprovette necessario.
3. Inserire nella microprovetta appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 25µl di reagente Lorne Anti-ABO.
4. Centrifugare la/le ID-Card nella centrifuga per scheda gel Bio-Rad.
5. Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

C. Tecnica Ortho BioVue (cassette neutre)

1. Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.
2. Rimuovere la linguetta in alluminio dal numero di camere di reazione necessario.
3. Inserire nella camera di reazione appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 40µl di reagente Lorne Anti-ABO.
4. Centrifugare la/le cassetta/e in una centrifuga Ortho BioVue System.
5. Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

D. Tecnica in micropiastra, con pozzetti "a U"

1. Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
2. Inserire nel pozzetto appropriato: 1 volume di reagente Lorne Anti-ABO e 1 volume di sospensione di eritrociti.
3. Miscelare accuratamente, preferibilmente utilizzando un agitatore per micropiastre, avendo cura di evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti.
4. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti (il tempo dipende dall'utilizzatore).
5. Centrifugare la micropiastra per 1 minuto a 140 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
6. Risospendere il sedimento utilizzando l'agitazione accuratamente controllata su un agitatore per micropiastre.
7. Procedere alla lettura macroscopica o tramite un lettore automatico omologato.
8. Eventuali reazioni deboli devono essere ripetute con la tecnica in provetta.

E. Tecnica su vetrino

1. Preparare una sospensione di eritrociti al 35-45% in siero, plasma, PBS o soluzione salina isotonica o utilizzare sangue intero anticoagulato (nel proprio plasma).
2. Aggiungere su un vetrino o su un cartoncino di reazione etichettato: 1 volume di reagente Lorne Anti-ABO e 1 volume di sospensione di eritrociti.
3. Utilizzando un bastoncino applicatore pulito, miscelare il reagente e le cellule su un'area di circa 20 x 40 mm.
4. Far oscillare lentamente il vetrino avanti e indietro per 30 secondi, mescolando ulteriormente di tanto in tanto nel periodo di 1 minuto, mantenendo il vetrino a temperatura ambiente.
5. Procedere alla lettura macroscopica dopo 1 minuto su una luce diffusa e non confondere i fili di fibrina con l'agglutinazione.
6. Eventuali reazioni deboli devono essere ripetute con la tecnica in provetta.

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 dell'antigene ABO appropriato 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 dell'antigene ABO appropriato sugli eritrociti.
3. **Discrepanze:** Se i risultati ottenuti con il gruppo indiretto non sono correlati con il gruppo diretto, sono necessarie ulteriori ricerche.

STABILITÀ DELLE REAZIONI

1. Leggere tutti i test in provetta e in micropiastra immediatamente dopo la centrifugazione.
2. I test su vetrino devono essere interpretati dopo un massimo di un minuto per garantire la specificità ed evitare la possibilità che un risultato negativo possa essere erroneamente interpretato come positivo a causa dell'essiccamento del reagente.
3. Occorre prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati dei test effettuati a temperature diverse da quelle raccomandate.

LIMITAZIONI

1. Gli antigeni ABO non sono completamente sviluppati alla nascita, pertanto possono verificarsi reazioni più deboli con campioni cordionali o neonatali.
2. Se si utilizzano Anti-A,B monoclonali, i campioni di sangue dei sottogruppi A o B deboli (per esempio Ax) possono dare luogo a reazioni false negative o deboli se analizzati con vetrini, piastre per microtitolazione o schede gel. È consigliabile analizzare nuovamente i sottogruppi deboli utilizzando la tecnica in provetta.
3. Lorne monoclonal Anti-A e monoclonal Anti-B non sono omologati per rilevare gli antigeni Ax e A3 o Bx e B3 rispettivamente, pertanto non rivendichiamo la reattività del reagente Anti-A o Anti-B monoclonale contro tali sottogruppi A e B deboli.
4. Il sangue conservato può dare reazioni più deboli rispetto al sangue fresco.
5. 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
- Scostamento dalle tecniche raccomandate
- Campioni cordionali contaminati con gelatina di Wharton

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI SPECIFICHE

1. Prima del rilascio, ogni lotto di reagente monoclonale Lorne ABO è stato testato con i metodi di analisi raccomandati elencati nelle presenti istruzioni per l'uso. 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"³ ("Linee guida per i servizi di trasfusione di sangue nel Regno Unito") e nelle "Common Technical Specifications" ("Specifiche tecniche comuni").
2. La specificità degli anticorpi monoclonali di origine è dimostrata utilizzando un pannello di cellule antigene-negative.
3. La potenza dei reagenti è stata analizzata 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 03/188 Anti-A e/o
 - Standard di riferimento 03/164 Anti-B
4. Anti-B Lorne non reagisce con eritrociti "B acquisiti".
5. I reagenti Lorne Monoclonal ABO non rilevano gli antigeni criptici quali T, Tn o Cad.
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'uso⁵.

BIBLIOGRAFIA

1. Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & 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.

DIMENSIONI DEI REAGENTI DISPONIBILI

| | Dimensione fiala | Numero catalogo | Test per fiala |
|----------------------------|------------------|-----------------|----------------|
| Anti-A Monoclonal | 10 ml | 600010 | 200 |
| | 1000 ml | 600000* | 20.000 |
| | 5000 ml | 600000X5* | 100.000 |
| Anti-B Monoclonal | 10 ml | 610010 | 200 |
| | 1000 ml | 610000* | 20.000 |
| | 5000 ml | 610000X5* | 100.000 |
| Anti-A,B Monoclonal | 10 ml | 620010 | 200 |
| | 1000 ml | 620000* | 20.000 |
| | 5000 ml | 620000X5* | 100.000 |

*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, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta