

REAGENTE MONOCLONALE PER LA DETERMINAZIONE DEL GRUPPO SANGUIGNO ISTRUZIONI PER L'USO

Anti-C+D+E Monoclonal: Per tecniche in provetta, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, micropiastra e su vetrino.

RIEPILOGO

Levine e Stetson scoprirono il sistema di gruppo sanguigno Rh nel 1940. Oltre a D, gli altri antigeni Rh principali sono C, E, c ed e. L'antigene D è altamente immunogenico; gli antigeni C ed e sono meno immunogenici di E e c. Gli anticorpi corrispondenti sono tutti importanti dal punto di vista clinico, poiché possono causare sia reazioni trasfusionali sia la Malattia emolitica del neonato.

USO PREVISTO

Il reagente per la determinazione del gruppo sanguigno è destinato ad essere utilizzato per determinare qualitativamente la presenza o l'assenza dell'antigene C (RH2) e/o dell'antigene D (RH1) e/o dell'antigene E (RH3) 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

Il reagente contiene anticorpi contro gli antigeni C, D e E presenti sugli eritrociti umani e causa l'agglutinazione (formazione di aggregati) diretta degli eritrociti umani che trasportano l'antigene C e/o D e/o E. L'assenza di agglutinazione (mancata formazione di aggregati) in genere indica l'assenza dell'antigene Rh corrispondente (vedere **Limitazioni**).

REAGENTI

I reagenti Lorne Monoclonal IgM Anti-Rh per la determinazione del gruppo sanguigno sono reagenti a basso contenuto proteico contenenti anticorpi monoclonali umani diluiti con cloruro di sodio, albumina bovina e potenziatori macromolecolari (4,0 g %). 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 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
Anti-C+D+E:	MS-24 + RUM-1 + MS-258

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.
- 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 del reagente 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 (idealmente eterozigote) 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.
- Durante la tipizzazione degli eritrociti di un paziente, è importante che venga incluso un controllo negativo del reagente (Lorne Mono Rh Control, numero catalogo 640010)

poiché i potenziatori macromolecolari nel reagente possono causare reazioni false positive con cellule rivestite da IgG.
- È possibile che gli antigeni Rhesus deboli vengano scarsamente rilevati dalle tecniche con schede gel, piastre per microtitolazione e su vetrino. Si raccomanda di analizzare gli antigeni Rhesus deboli mediante la tecnica di test in provetta.
- 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 MA NON FORNITI

Tecnica in provetta

- Provette in vetro (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Centrifuga con velocità di rotazione di 1000 g per 20 secondi.
- Soluzione di PBS (pH 6.8-7.2) o soluzione salina isotonica (pH 6.5-7.5).
- Eritrociti di controllo positivo (idealmente R_{1r}) e negativo (rr).

Tecnica di microtipizzazione Bio-Rad-ID

- ID-Card Bio-Rad (cloruro di sodio, test enzimatici e agglutinine a freddo).
- ID-Centrifuge Bio-Rad.
- ID-CellStab o ID-Diluent 2 Bio-Rad.

Tecnica di tipizzazione Ortho BioVue

- Cassette Ortho BioVue System (Neutre).
- Centrifuga Ortho BioVue System.
- Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.

Tecnica con piastra per microtitolazione

- Piastre per microtitolazione a pozzetto "a U" omologate.
- Centrifuga per piastre per microtitolazione.
- Agitatore per piastre per microtitolazione.

Tecnica su vetrino

- Vetrini da microscopio in vetro o cartoncini di reazione bianchi.
- Bastoncini applicatori.
- Contaminuti o cronometro

Tutte le tecniche

- Pipette volumetriche.

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-Rh e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Miscelare accuratamente e centrifugare tutte le provette per 20 secondi a 1000 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Rispondere 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 3 e 4.

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

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in ID-CellStab o ID-Diluent 2.

2. Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero necessario di microprovette su una ID-Card con cloruro di sodio, test enzimatico e agglutinine a freddo.
3. Inserire nella microprovetta appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 25µl di reagente Lorne Anti-Rh.
4. Centrifugare la/le ID-Card in una centrifuga Bio-Rad-ID.
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 di alluminio dal numero necessario di camere di reazione su una cassetta neutra.
3. Inserire nella camera di reazione appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 40µl di reagente Lorne Anti-Rh.
4. Centrifugare la/le cassetta/e per 5 minuti in una Centrifuga Ortho BioVue System.
5. Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

D. Tecnica in piastra per microtitolazione, 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-Rh 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 i sedimenti 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, oppure PBS o soluzione salina isotonica. Se non è possibile, può essere utilizzato anche sangue intero anticoagulato come campione
2. Aggiungere su un vetrino o su un cartoncino di reazione etichettato: 1 volume di reagente Lorne Anti-Rh 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 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 Rh 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 Rh appropriato sugli eritrociti.
3. **Controllo:** Sono da escludere i risultati del test delle cellule agglutinate mediante il controllo negativo del reagente, in quanto l'agglutinazione è causata molto probabilmente dall'effetto dei potenziatori macromolecolari nel reagente sulle cellule sensibilizzate.

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 entro 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. I reagenti Lorne Anti-Rh non sono idonei per l'uso con cellule trattate con enzimi o per l'uso in tecniche dell'antiglobulina indiretta.
2. Alcuni eritrociti esprimono antigeni Rh variabili e possono dare reazioni più deboli rispetto a quelle osservate con cellule di controllo positivo selezionate in modo casuale. Anti-C può dare reazioni più deboli con l'antigene C di individui R₂R_Z. Analogamente, Anti-e può dare reazioni leggermente più deboli in assenza dell'antigene C, per esempio R₂r, r'r e rr.
3. Al contrario, l'espressione inibita o ridotta di alcuni antigeni del gruppo sanguigno può dare luogo a reazioni false negative. Per tali ragioni, occorre sempre prestare attenzione quando si assegnano i genotipi in base ai risultati dei test.
4. 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

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI SPECIFICHE

1. Prima del rilascio, ogni lotto di questo reagente è stato testato utilizzando 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" ("Linee guida per i servizi di trasfusione di sangue nel Regno Unito").

2. La specificità degli anticorpi monoclonali di origine è dimostrata utilizzando un pannello di cellule antigene-negative.
3. Il Controllo qualità del reagente 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*.

BIBLIOGRAFIA

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. 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
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
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.

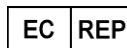
DIMENSIONI DEI REAGENTI DISPONIBILI

	Dimensione fiala	Numero catalogo	Test per fiala
Anti-C+D+E Monoclonal	10 ml	700010	200
	1000 ml	700000*	20.000

*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