

REAGENTI MONOCLONALI PER LA DETERMINAZIONE DEL GRUPPO SANGUIGNO

INDICAZIONI D'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 era in grado di agglutinare gli eritrociti di altre. Oggi sono riconosciuti quattro fenotipi comuni: O, A, B e AB. Successivamente sono stati identificati sottogruppi dei gruppi A e B.

Gruppo diretto			Gruppo indiretto				Fenotipo ABO	% di 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 all'uso per stabilire qualitativamente la presenza o l'assenza degli antigeni A e/o B sugli eritrociti di donatori di sangue o di pazienti che necessitano di una trasfusione, se analizzati secondo le tecniche raccomandate indicate nelle presenti istruzioni per l'uso.

PRINCIPIO

I reagenti contengono anticorpi diretti contro lo specifico antigene A e/o B sugli eritrociti umani e provocano agglutinazione diretta (formazione di aggregati) degli eritrociti che esprimono il corrispondente antigene ABO. L'assenza di agglutinazione indica generalmente l'assenza del corrispondente antigene ABO sugli eritrociti umani (vedere **Limitazioni**).

REAGENTI

I reagenti monoclonali Lorne IgM ABO per la determinazione del gruppo sanguigno contengono anticorpi monoclonali umani diluiti in un tampone fosfato contenente cloruro di sodio, EDTA e albumina bovina. I reagenti non contengono né comprendono sostanze cancerogene, mutagene o reprotossiche (CMR), né sostanze che alterano il sistema endocrino o che potrebbero provocare una sensibilizzazione o una reazione allergica nell'utilizzatore. Ciascun reagente è fornito a una diluizione ottimale per l'uso con tutte le tecniche raccomandate elencate di seguito, senza necessità di ulteriori diluizioni o aggiunte. Per il numero di riferimento del lotto e la data di scadenza vedere l'**etichetta del flaconcino**.

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

CONSERVAZIONE

Conservare i flaconcini di reagente a una temperatura di 2-8 °C dal momento della ricezione. La conservazione prolungata a temperature al di fuori di questo intervallo può comportare una perdita accelerata della reattività del reagente. Questo reagente è stato sottoposto a studi di stabilità durante il trasporto a 37 °C e -25 °C, come descritto nella norma BS EN ISO 23640:2015.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni di sangue possono essere raccolti in provette con anticoagulante EDTA oppure come campioni coagulati. I campioni devono essere analizzati il prima possibile dopo la raccolta. In caso di ritardo nell'analisi, conservare i campioni a 2-8 °C. I campioni che presentano emolisi evidente o contaminazione microbica non devono essere utilizzati per il test. I campioni di sangue che mostrano segni di lisi possono fornire risultati non affidabili. 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 un flaconcino di reagente mostra crepe o perdite, gettare immediatamente il contenuto.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza (vedere l'**etichetta del flaconcino**).
- Non utilizzare i reagenti in presenza di precipitato.
- Durante la manipolazione dei reagenti devono essere indossati indumenti protettivi, quali guanti monouso e camicia da laboratorio.
- I reagenti sono stati filtrati attraverso una capsula da 0,2 µm per ridurre la carica biologica, ma non sono forniti sterili. Una volta aperto il flaconcino, il

contenuto rimane utilizzabile fino alla data di scadenza, purché non si osservi 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 essere tossico se ingerito e può reagire con tubazioni in piombo e rame formando azoturi metallici esplosivi. Al momento dello smaltimento, far defluire con abbondanti quantità d'acqua.
- Nessun test noto può garantire che i prodotti derivati da fonti umane o animali siano privi di agenti infettivi. È necessario prestare attenzione nell'uso e nello smaltimento di ciascun flaconcino e del suo contenuto.

SMALTIMENTO DEL REAGENTE E GESTIONE DELLE FUORIUSCITE

Per informazioni sullo smaltimento del reagente e sulla decontaminazione in caso di fuoriuscite, consultare le **Schede di dati di sicurezza**, disponibili su richiesta.

CONTROLLI E RACCOMANDAZIONI

- Un controllo positivo e un controllo negativo devono essere analizzati in parallelo con ogni serie di test. I test devono essere considerati non validi se i controlli non mostrano i risultati attesi.
- Poiché questi reagenti non contengono potenziatori macromolecolari, è molto improbabile che si verifichino reazioni falsamente positive con cellule rivestite con IgG.
- Campioni di sangue appartenenti a sottogruppi deboli A o B (ad es. Ax) possono dare luogo a risultati falsamente negativi o deboli se analizzati con vetrini, piastre per microtitolazione o schede gel. Si raccomanda di riesaminare i sottogruppi deboli mediante la tecnica in provetta.
- Nei soggetti di età superiore a sei mesi, i risultati della determinazione del gruppo sanguigno ABO devono essere confermati testando il siero o il plasma con cellule di gruppo A₁ e B note, prima di poter confermare il gruppo sanguigno ABO.
- Prima dell'uso, lasciare che il reagente raggiunga la temperatura ambiente. Subito dopo aver utilizzato il reagente, stoccarlo nuovamente a una temperatura di 2-8 °C.
- Nelle **Tecniche raccomandate** un volume corrisponde approssimativamente a 50 µl quando si utilizza il contagocce fornito con il flaconcino.
- L'uso dei reagenti e l'interpretazione dei risultati devono essere effettuati da personale adeguatamente formato e qualificato, in conformità ai requisiti del Paese in cui i reagenti vengono utilizzati.
- L'utilizzatore finale deve valutare l'idoneità dei reagenti per l'impiego in altre tecniche.

REAGENTI E MATERIALI NECESSARI

- Pipette volumetriche.
- ID-Card Bio-Rad (NaCl, test enzimatico e agglutinine a freddo).
- Centrifuga ID-Centrifuge Bio-Rad.
- ID-CellStab o ID-Diluent 2 Bio-Rad.
- Cassette Ortho BioVue System (neutre).
- Centrifuga Ortho BioVue System.
- Ortho 0,8% Red Cell Diluent.
- 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 con pozzetti a "U" validate.
- Centrifuga per micropiastre.
- Agitatore per piastre.
- Soluzione PBS (pH 6,8-7,2) oppure 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.
- In una provetta etichettata, introdurre: 1 volume di reagente Lorne Anti-ABO e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Mescolare 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.

- Risospendere delicatamente il sedimento eritrocitario e procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.
- Le provette che fanno rilevare un risultato negativo o dubbio devono essere incubate per 15 minuti a temperatura ambiente.
- Dopo l'incubazione, ripetere i passaggi 4 e 5.

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

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Rimuovere la pellicola in alluminio dal numero di microprovette necessario.
- Introdurre nella microprovetta appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 25 µl di reagente Lorne Anti-ABO.
- Centrifugare le ID-Card nella centrifuga per schede gel Bio-Rad.
- Procedere alla lettura macroscopica per evidenziare l'eventuale agglutinazione.

C. Tecnica Ortho BioVue (cassette neutre)

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- Rimuovere la pellicola in alluminio dal numero di camere di reazione necessario.
- Inserire nella camera di reazione appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 40 µl di reagente Lorne Anti-ABO.
- Centrifugare la/e cassetta/e in una centrifuga Ortho BioVue System.
- Procedere alla lettura macroscopica per evidenziare l'eventuale agglutinazione.

D. Tecnica in micropiastre con pozzetti "a U"

- Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
- Introdurre nel pozzetto pertinente: 1 volume di reagente Lorne Anti-ABO e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Miscelare accuratamente, preferibilmente utilizzando un agitatore per micropiastre, avendo cura di evitare contaminazioni tra i pozzetti.
- Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti (il tempo può variare in base all'utilizzatore).
- Centrifugare la micropiastre per 1 minuto a 140 RCF o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Risospendere i sedimenti mediante agitazione controllata su un agitatore per micropiastre.
- Procedere alla lettura macroscopica oppure mediante un lettore automatico validato.
- In caso di reazioni deboli, il test deve essere ripetuto adottando la tecnica in provetta.

E. Tecnica su vetrino

- Preparare una sospensione di eritrociti al 35-45% in siero, plasma, PBS o soluzione salina isotonica, oppure utilizzare sangue intero anticoagulato (nel proprio plasma).
- Depositare su un vetrino etichettato o su un cartoncino di reazione: 1 volume di reagente Lorne Anti-ABO e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Utilizzando un bastoncino applicatore pulito, mescolare reagente e cellule su un'area di circa 20 x 40 mm.
- Inclinare lentamente il vetrino avanti e indietro per 30 secondi, effettuando ulteriori mescolamenti occasionali per 1 minuto, mantenendo il vetrino a temperatura ambiente.
- Effettuare una lettura macroscopica dopo 1 minuto alla luce diffusa e non scambiare i filamenti di fibrina per agglutinazione.
- In caso di reazioni deboli, il test deve essere ripetuto adottando la tecnica in provetta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST

- Positivo:** l'agglutinazione degli eritrociti costituisce un risultato positivo e, entro i limiti accettati della procedura di test, indica la presenza dell'antigene ABO specifico sugli eritrociti.
- 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 specifico sugli eritrociti.
- Discrepanze:** se i risultati ottenuti sul gruppo indiretto non sono coerenti con quelli del gruppo diretto, è necessario effettuare ulteriori indagini.

STABILITÀ DELLE REAZIONI

- Leggere tutti i test in provetta e micropiastre immediatamente dopo la centrifugazione.
- I test su vetrino devono essere interpretati entro un massimo di un minuto, per garantire la specificità ed evitare che un risultato negativo venga erroneamente interpretato come positivo a causa dell'essiccazione del reagente.
- È necessario prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati di test eseguiti a temperature diverse da quelle raccomandate.

LIMITAZIONI

- Gli antigeni ABO non sono totalmente sviluppati alla nascita; pertanto, è possibile osservare reazioni più deboli con campioni di sangue cordonale o neonatale.
- Quando si utilizza Monoclonal Anti-A,B, campioni di sangue appartenenti a sottogruppi deboli A o B (ad es. Ax) possono dare luogo a risultati falsamente negativi o deboli se analizzati con vetrini, piastre per

microtitolazione o schede gel. Si raccomanda di riesaminare i sottogruppi deboli mediante la tecnica in provetta.

- I reagenti Lorne monoclonal Anti-A e monoclonal Anti-B non sono validati per rilevare, rispettivamente, gli antigeni Ax e A3 o Bx e B3, e pertanto non si rivendica la reattività dei reagenti monoclonal Anti-A o Anti-B nei confronti di questi sottogruppi A e B deboli.
- Il sangue conservato può dare reazioni più deboli rispetto al sangue fresco.
- Risultati falsamente positivi o falsamente negativi possono inoltre verificarsi a causa di:
 - Contaminazione dei materiali di analisi
 - Conservazione non corretta, concentrazione cellulare, tempo o temperatura di incubazione inadeguati
 - Centrifugazione impropria o eccessiva
 - Scostamento dalle tecniche raccomandate
 - Campioni cordionali contaminati con gelatina di Wharton

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE SPECIFICHE

- Prima del rilascio, ogni lotto di reagente Lorne monoclonale 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 stabiliti nell'edizione/nella versione corrente 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).
- La specificità degli anticorpi monoclonali di origine è dimostrata mediante l'utilizzo di un pannello di cellule negative per l'antigene.
- 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):
 - Standard di riferimento 03/188 anti-A e/o
 - Standard di riferimento 03/164 anti-B
- Lorne Anti-B non reagisce con eritrociti "B acquisiti".
- I reagenti Lorne Monoclonal ABO non rilevano gli antigeni criptici quali T, Tn o Cad.
- Il controllo di qualità dei reagenti è stato eseguito utilizzando eritrociti con fenotipi verificati da un centro trasfusionale del Regno Unito e lavati con PBS o soluzione salina isotonica prima dell'uso.

CLAUSOLA DI ESCLUSIONE DI RESPONSABILITÀ

- L'utilizzatore finale è responsabile delle prestazioni dei reagenti quando vengono impiegati con metodi diversi da quelli indicati nelle **Tecniche raccomandate**.
- Qualsiasi scostamento dalle **Tecniche raccomandate** deve essere approvato prima dell'uso⁵.

BIBLIOGRAFIA

- Marion E. Reid e Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 181.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
- AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
- 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.

FORMATI DISPONIBILI DEL REAGENTE

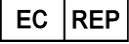
	Formato del flaconcino	Numero di catalogo	Test per flaconcino
Anti-A Monoclonal	10 ml	600010	200
Anti-B Monoclonal	10 ml	610010	200
Anti-A,B Monoclonal	10 ml	620010	200

TABELLA DEI SIMBOLI

Simbolo	Definizione	Simbolo	Definizione
	Fabbricante		Numero di catalogo
	Limiti di temperatura		Utilizzare entro AAAA-MM-GG
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>		Consultare le istruzioni per l'uso.
	Rappresentante autorizzato		Numero di lotto
	Simbolo CE con verifica da parte di un Organismo notificato		



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