

## REAGENTI MONOCLONALI PER LA DETERMINAZIONE DEL GRUPPO SANGUIGNO INDICAZIONI 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 dei gruppi sanguigni Rh nel 1940. Oltre al D, gli altri principali antigeni Rh sono C, E, c ed e. L'antigene D è altamente immunogeno; gli antigeni C ed e sono meno immunogeni rispetto a E e c. Gli anticorpi corrispondenti sono tutti clinicamente rilevanti, poiché possono causare sia reazioni trasfusionali sia malattia emolitica del neonato.

APLOTIPO MODIFICATO DI WIENER	PREVALENZA (%)		
	BIANCHI	NERI	ASIATICI
R <sub>1</sub>	42	17	70
R <sub>2</sub>	14	11	21
R <sub>0</sub>	4	44	3
R <sub>z</sub>	< 0,01	< 0,001	1
r	37	26	3
r'	2	2	2
r''	1	< 0,01	< 0,01
r <sup>y</sup>	< 0,01	< 0,01	< 0,01

### USO PREVISTO

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

Il reagente contiene anticorpi diretti contro gli antigeni C, D ed E sugli eritrociti umani e provoca agglutinazione diretta (formazione di aggregati) degli eritrociti umani che esprimono l'antigene C e/o D e/o E. L'assenza di agglutinazione (assenza di aggregati) indica generalmente l'assenza dell'antigene Rh corrispondente (vedere **Limitazioni**).

### REAGENTI

Il reagente per la determinazione del gruppo sanguigno Anti-C+D+E Monoclonal è un reagente a basso contenuto proteico contenente anticorpi monoclonali umani diretti contro gli antigeni Rhesus C, D ed E. Il reagente non contiene né è composto da sostanze cancerogene, mutagene o reprotossiche (CMR), né da 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**.

Anti-C+D+E Monoclonal	RUM-1	Linea cellulare di ibridoma secernente IgM umane
	MS-24	Linea cellulare di ibridoma secernente IgM umane
	MS-258	Linea cellulare di ibridoma secernente IgM umane

### 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 in uso e durante il trasporto a 37 °C e -25 °C, come descritto nella norma BS EN ISO 23640:2015. Sulla base degli studi di stabilità in uso dei reagenti, 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.

### 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 una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Il sangue raccolto in EDTA o come campione coagulato può essere conservato fino a 1 giorno dopo il prelievo a temperatura ambiente e fino a 21 giorni a temperatura refrigerata (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 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 camice 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 (NaN<sub>3</sub>). 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.
- I materiali utilizzati per la produzione del reagente sono stati testati alla fonte e risultati negativi per anticorpi anti-HIV 1 e 2 e gli anticorpi anti-HCV e 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 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 (idealmente eterozigote) 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.
- Nella tipizzazione di eritrociti provenienti da un paziente, è importante includere un controllo negativo del reagente (Mono Rh Control, numero di catalogo Lorne 640010) poiché i potenziatori macromolecolari presenti nel reagente potrebbero provocare reazioni falsamente positive con le cellule rivestite con IgG.
- Gli antigeni Rhesus deboli possono essere rilevati in modo non ottimale mediante schede gel, piastre per microtitolazione e vetrini. Si raccomanda di testare gli antigeni Rhesus deboli utilizzando la tecnica di analisi in provetta.
- 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 deve valutare l'idoneità dei reagenti per l'impiego 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 in grado di ruotare a 1000 g per 20 secondi.
- Soluzione PBS (pH 6,8-7,2) oppure soluzione salina isotonica (pH 6,5-7,5).
- Eritrociti di controllo positivo (idealmente R<sub>1</sub>r) e negativo (rr).

#### Tecnica di microtipizzazione Bio-Rad-ID

- ID-Card Bio-Rad (NaCl, test enzimatico e agglutinine a freddo).
- Centrifuga 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.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent.

#### Tecnica di microtitolazione su piastra

- Piastre per microtitolazione con pozzetti "a U" validate.
- Centrifuga per microtitolazione su piastra.
- Agitatore per microtitolazione su piastra.

#### Tecnica su vetrino

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

#### Tutte le tecniche

- Pipette volumetriche.

## TECNICHE RACCOMANDATE

### A. Tecnica in provetta

1. Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
2. In una provetta etichettata, introdurre: 1 volume di reagente Lorne anti-Rh e 1 volume di sospensione di eritrociti.
3. Mescolare accuratamente e centrifugare tutte le provette per 20 secondi a 1000 RCF o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
4. Risospendere delicatamente il sedimento eritrocitario e procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.
5. Le provette che fanno rilevare un risultato negativo o dubbio devono essere incubate per 15 minuti a temperatura ambiente.
6. Dopo l'incubazione, ripetere i passaggi 3 e 4.

### B. Tecnica Bio-Rad-ID (NaCl, 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 pellicola in alluminio dal numero di microprovette necessario sulle ID-Card NaCl/test enzimatico/agglutinine a freddo.
3. Introdurre nella microprovetta appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 25 µl di reagente Lorne anti-Rh.
4. Centrifugare le ID-card in una centrifuga ID-Centrifuge Bio-Rad.
5. Procedere alla lettura macroscopica per evidenziare l'eventuale agglutinazione.

### C. Tecnica Ortho BioVue (cassette neutre)

1. Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
2. Rimuovere la pellicola in alluminio dal numero di camere di reazione necessario su una cassetta neutra.
3. Inserire nella camera di reazione appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 40 µl di reagente Lorne anti-Rh.
4. Centrifugare la/cassette/e per 5 minuti in una centrifuga Ortho BioVue System.
5. Procedere alla lettura macroscopica per evidenziare l'eventuale agglutinazione.

### D. Tecnica con microtitolazione su piastra con pozzetti "a U"

0. Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
1. Introdurre nel pozzetto pertinente: 1 volume di reagente Lorne anti-Rh e 1 volume di sospensione di eritrociti.
2. Miscelare accuratamente, preferibilmente utilizzando un agitatore per micropiastre, avendo cura di evitare contaminazioni tra i pozzetti.
3. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti (il tempo può variare in base all'utilizzatore).
4. Centrifugare la micropiastra per 1 minuto a 140 RCF o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
5. Risospendere i sedimenti mediante agitazione controllata su un agitatore per micropiastre.
6. Procedere alla lettura macroscopica oppure mediante un lettore automatico validato.
7. In caso di reazioni deboli, il test deve essere ripetuto adottando 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. Se ciò non è possibile, può essere utilizzato come campione anche sangue intero anticoagulato.
2. Depositare su un vetrino etichettato o su un cartoncino di reazione: 1 volume di reagente Lorne anti-Rh 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.
4. Inclinare lentamente il vetrino avanti e indietro per 1 minuto, mantenendolo a temperatura ambiente.
5. Effettuare una lettura macroscopica dopo 1 minuto alla luce diffusa e non scambiare i filamenti di fibrina per agglutinazione.
6. In caso di reazioni deboli, il test deve essere ripetuto adottando la tecnica in provetta.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST

1. **Positivo:** l'agglutinazione degli eritrociti costituisce un risultato positivo e, entro i limiti accettati della procedura di test, indica la presenza dell'antigene Rh specifico 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 specifico sugli eritrociti.
3. **Controllo:** la reazione può essere interpretata se i risultati ottenuti con i campioni di controllo sono validi. I risultati dei test condotti su cellule che mostrano agglutinazione con l'utilizzo del controllo Monoclonal Rh Control (rif. 640010) devono essere esclusi, poiché l'agglutinazione è con ogni probabilità causata dall'effetto dei potenziatori macromolecolari presenti nel reagente sulle cellule sensibilizzate.

## STABILITÀ DELLE REAZIONI

1. Leggere tutti i test in provetta e micropiastra immediatamente dopo la centrifugazione.

2. I test su vetrino devono essere interpretati entro un minuto, per garantire la specificità ed evitare che un risultato negativo venga erroneamente interpretato come positivo a causa dell'essiccazione del reagente.
3. È necessario prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati di test eseguiti a temperature diverse da quelle raccomandate.

## LIMITAZIONI

1. I reagenti Lorne anti-Rh non sono idonei all'uso con cellule trattate con enzimi né per l'impiego in tecniche antiglobuliniche indirette.
2. Alcuni eritrociti esprimono antigeni Rh varianti e possono dare reazioni più deboli rispetto a quelle osservate con cellule di controllo positive selezionate casualmente. L'Anti-C può dare reazioni più deboli con l'antigene C negli individui  $r_{2R}$ . Analogamente, l'Anti-e può dare reazioni leggermente più deboli in assenza dell'antigene C, ad esempio nei fenotipi  $r_{2r}$ ,  $r'r$  e  $rr$ .
3. Un'espressione soppressa o ridotta di alcuni antigeni dei gruppi sanguigni può, al contrario, dare origine a risultati falsamente negativi. Per questi motivi, è sempre necessario prestare cautela nell'assegnazione dei genotipi sulla base dei risultati del test.
4. Anti-C+D+E Monoclonal (REF:700010) non è validato per rilevare antigeni Rhesus diversi dagli antigeni eritrocitari umani D (RH1), C (RH2) ed E (RH3). Inoltre, il reagente Anti-C+D+E Monoclonal non è validato per i fenotipi D deboli e DVI, poiché la combinazione di D debole e/o DVI con antigeni C ed E negativi contemporaneamente è estremamente rara. Per rilevare D deboli e/o DVI, devono essere utilizzati gli appropriati reagenti Lorne Anti-D Monoclonal, in conformità alle istruzioni per l'uso del fabbricante.
5. Anti-C+D+E Monoclonal (rif. 700010) non è validato per il rilevamento della variante Rhmod.
6. È stato dimostrato che molti anticorpi monoclonali umani IgM anti-Rh presentano attività di agglutinine fredde anti-i/I, in particolare con cellule del sangue cordonale o cellule trattate con enzimi. Ciò può diventare evidente se i test sono incubati a temperature inferiori a quelle raccomandate.
7. 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

## CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE SPECIFICHE

1. Prima del rilascio, ciascun lotto di questo reagente è stato testato utilizzando i metodi raccomandati indicati nelle presenti istruzioni per l'uso. I test sono risultati conformi ai requisiti di analisi stabiliti nell'edizione/versione corrente 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 mediante l'utilizzo di un pannello di cellule negative per l'antigene.
3. Il controllo di qualità del reagente 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.
4. Le prestazioni dei reagenti sono state confermate mediante comparazione con reagenti IVD di confronto ben consolidati e marcati CE, in uno studio comparativo in cui i reagenti sono stati testati in parallelo utilizzando tutti i metodi raccomandati. Di seguito sono riportati i risultati complessivi delle analisi statistiche dello studio:

	Metodo	N	Sensibilità	Specificità	PPV	NPV
Anti-C+D+E	Provetta del test	1047	99,9%	98,5%	99,6%	99,5%
	Ortho	1251	99,9%	99,6%	99,9%	99,6%
	Bio-Rad	1047	99,8%	99,5%	99,9%	99,0%
	Micropiastra	1047	99,6%	99,0%	99,8%	98,5%
	Vetrino	1027	99,6%	100,0%	100,0%	98,5%

## CLAUSOLA DI ESCLUSIONE DI RESPONSABILITÀ

1. L'utilizzatore finale è responsabile delle prestazioni dei reagenti quando vengono impiegati con metodi diversi da quelli indicati nelle **Tecniche raccomandate**.
2. Qualsiasi scostamento dalle **Tecniche raccomandate** deve essere approvato prima dell'uso<sup>5</sup>.










## BIBLIOGRAFIA

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16<sup>th</sup> 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, 6<sup>th</sup> 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.

## FORMATI DISPONIBILI DEL REAGENTE


	Formato del flaconcino	Numero di catalogo	Test per flaconcino
Anti-C+D+E Monoclonal	10 ml	700010	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		



**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