

REAGENTI MONOCLONALI PER LA DETERMINAZIONE DEL GRUPPO SANGUIGNO
INDICAZIONI PER L'USO

Anti-D Duoclone Monoclonal: per tecniche in provetta, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, micropiastra e su vetrino.

RIEPILOGO

Il sistema dei gruppi sanguigni Rh fu scoperto nel 1940. L'antigene D è l'antigene eritrocitario non-ABO clinicamente più rilevante ed è stato associato a reazioni trasfusionali emolitiche e alla malattia emolitica del neonato.

Anti-D	Fenotipo	% di caucasici ³	% di afroamericani ³
+	Rh D +ve	83	92
0	Rh D -ve	17	8

USO PREVISTO

I reagenti Anti-D per la determinazione del gruppo sanguigno sono destinati all'uso per stabilire qualitativamente la presenza o l'assenza dell'antigene Rh D 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 l'antigene D presente sugli eritrociti umani e provoca agglutinazione diretta (formazione di aggregati) degli eritrociti umani che esprimono l'antigene D specifico e agglutinazione indiretta degli eritrociti umani di categoria D^{VI} nella fase antiglobulinica del test. L'assenza di agglutinazione (assenza di aggregati) indica generalmente l'assenza del corrispondente antigene D sugli eritrociti umani (vedere **Limitazioni**).

REAGENTE

Il reagente per la determinazione del gruppo sanguigno Lorne Monoclonal Anti-D Duoclone è un reagente a basso contenuto proteico, combinato, contenente anticorpi monoclonali umani anti-D di classe IgM e IgG, diluiti in un tampone fosfato contenente cloruro di sodio (0,9 g%), albumina bovina (2,0 g%) e potenziatori macromolecolari (1,5 g%). Nella tipizzazione di campioni di pazienti, questo reagente provoca agglutinazione diretta delle cellule Rh D positive, inclusi i fenotipi D^{VI} e un'elevata percentuale di fenotipi D deboli (D^U), quando utilizzato secondo le tecniche raccomandate. 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. Il reagente è fornito a una diluizione ottimale per l'uso sui campioni di pazienti con tutte le tecniche raccomandate elencate nelle istruzioni per l'uso del reagente, senza necessità di ulteriori diluizioni o aggiunte. Per il numero di riferimento del lotto e la data di scadenza vedere l'**etichetta del flaconcino**.

IgM/IgG	Linea cellulare/Clone
IgM	RUM-1
IgG	MS-26

ESPRESSIONE RIDOTTA DELL'ANTIGENE RhD

Il termine collettivo D^U è ampiamente utilizzato per descrivere gli eritrociti che presentano un'espressione dell'antigene D più debole rispetto alla norma. Il termine "D debole" indica individui con un numero ridotto di siti antigenici D completi per eritrocita. Il termine "D parziale" indica individui con epitopi dell'antigene D mancanti. DVI è una categoria di D parziale caratterizzata dall'assenza della maggior parte degli epitopi D. Il reagente Duoclone rileva la maggior parte degli eritrociti con D parziale e D debole mediante agglutinazione diretta, ma non rileva le cellule DVI. Questo reagente rileva le cellule DVI e D parziale nella fase antiglobulinica indiretta (IAT).

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

- Il reagente è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*.
- Se un flaconcino di reagente mostra crepe o perdite, gettare immediatamente il contenuto.

- Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza (vedere l'**etichetta del flaconcino**).
- Non utilizzare il reagente in presenza di precipitato.
- Durante la manipolazione dei reagenti devono essere indossati indumenti protettivi, quali guanti monouso e camice da laboratorio.
- Il reagente è stato filtrato attraverso una capsula da 0,2 µm per ridurre la carica biologica, ma non è fornito sterile. 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.
- Il reagente contiene < 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.
- 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 cellule R₁r) e un controllo negativo (idealmente cellule rr) devono essere analizzati in parallelo con ciascun lotto di test. I test devono essere considerati non validi se i controlli non mostrano i risultati attesi.
- Nella tipizzazione di eritrociti di un paziente che presenta una patologia che determina il rivestimento degli eritrociti con anticorpi o altre proteine (ad es. HDN e AIHA), è importante analizzare gli eritrociti del paziente utilizzando il controllo negativo del reagente Lorne (Monoclonal D Negative Control, numero di catalogo 650010). Se gli eritrociti mostrano agglutinazione con il controllo negativo Lorne Monoclonal D (numero di catalogo n. 650010) i test devono essere considerati non validi.
- I campioni devono essere analizzati per la determinazione della categoria D^{VI} esclusivamente mediante **test dell'antiglobulina indiretto, tecniche Coombs Bio-Rad-ID e Coombs Ortho BioVue**.
- Gli antigeni D deboli e varianti sono rilevati in modo non ottimale mediante schede gel, piastre per microtitolazione e vetrini. Si raccomanda di testare le varianti deboli e parziali utilizzando la tecnica di analisi in provetta.
- La tecnica antiglobulinica in provetta può essere considerata valida solo se tutti i test negativi reagiscono positivamente con gli eritrociti sensibilizzati con IgG.
- 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 del reagente 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

- Antiglobulina umana, ad es. Lorne AHG Elite (N. cat. 435010) oppure anti-IgG umana, ad es. Lorne Anti-Human IgG (N. cat. 402010).
- Pipette volumetriche.
- Vetrini da microscopio in vetro o cartoncini di reazione bianchi.
- Bastoncini applicatori.
- Provette in vetro (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Bagno termostatico ad acqua o incubatore a secco regolato a 37 °C ± 2 °C.
- Centrifuga per provette.
- Lavacellule per il test di Coombs.
- Micropiastre con pozzetti a "U" validate.
- Centrifuga per micropiastre.
- Agitatore per piastre.
- Lettore automatico per piastre.
- ID-Card Bio-Rad (LISS/Coombs e NaCl, test enzimatico e agglutinine a freddo).
- Centrifuga ID-Centrifuge Bio-Rad.
- ID-CellStab o ID-Diluent 2 Bio-Rad.
- Incubatore ID-Incubator di Bio-Rad equilibrato a 37 °C ± 2 °C.
- Cassette Ortho BioVue System (AHG/Coombs e neutre).
- Centrifuga Ortho BioVue System.

- Blocco riscaldante Ortho BioVue System equilibrato a 37 °C ± 2 °C.
- Ortho 0.8% Red Cell Diluent.
- Eritrociti sensibilizzati con IgG, ad es. Lorne Coombs Control Cells (N. cat. 970010).
- Soluzione PBS (pH 6,8-7,2) oppure soluzione salina isotonica (pH 6,5-7,5).
- Eritrociti di controllo positivo (idealmente R_r) e negativo (rr).

TECNICHE RACCOMANDATE (NON PER LA CATEGORIA D^V)

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 Duoclone 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 (come può verificarsi con campioni D^u o D debole) 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.
3. Introdurre nella microprovetta appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 25 µl di reagente Lorne Duoclone.
4. Centrifugare le ID-Card in una centrifuga per schede gel.
5. Procedere alla lettura macroscopica per evidenziare l'eventuale agglutinazione.

C. Tecnica Ortho BioVue (schede 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.
3. Inserire nella camera di reazione appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 40 µl di reagente Lorne Duoclone.
4. Centrifugare la/le cassetta/e in una centrifuga Ortho BioVue System.
5. Procedere alla lettura macroscopica per evidenziare l'eventuale 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. Introdurre nel pozzetto pertinente: 1 volume di reagente Lorne Duoclone e 1 volume di sospensione di eritrociti.
3. Miscelare accuratamente, preferibilmente utilizzando un agitatore per micropiastre, avendo cura di evitare contaminazioni tra i pozzetti.
4. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti (il tempo può variare in base all'utilizzatore).
5. Centrifugare la micropiastra per 1 minuto a 140 RCF o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
6. Risospendere i sedimenti mediante agitazione controllata su un agitatore per micropiastre.
7. Procedere alla lettura macroscopica oppure mediante un lettore automatico validato.
8. 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, oppure utilizzare sangue intero anticoagulato (nel proprio plasma).
2. Depositare su un vetrino etichettato o su un cartoncino di reazione: 1 volume di reagente Lorne Duoclone e 1 volume di sospensione di eritrociti per l'analisi.
3. 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 30 secondi, effettuando ulteriori mescolamenti occasionali per 1 minuto, mantenendo il vetrino 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.

TECNICHE RACCOMANDATE (PER RILEVARE LA CATEGORIA D^V)

A. Tecnica antiglobulinica indiretta (IAT)

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 Duoclone e 1 volume di sospensione di eritrociti per l'analisi.
3. Mescolare accuratamente e incubare a 37 °C per 15 minuti.
4. Lavare gli eritrociti almeno una volta con PBS o soluzione salina isotonica, avendo cura di eliminare il surnatante tra un lavaggio e l'altro e di risospendere ogni sedimento dopo ciascun lavaggio. Eliminare completamente il surnatante dopo l'ultimo lavaggio.
5. Aggiungere 2 gocce di AHG o anti-IgG a ciascun sedimento essiccato.

6. Mescolare accuratamente e centrifugare tutte le provette per 20 secondi a 1000 RCF o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
7. Risospendere ciascun sedimento e procedere alla lettura macroscopica.
8. Confermare la validità di tutte le reazioni negative con eritrociti sensibilizzati con IgG.

B. Tecnica Bio-Rad-ID (schede LISS/Coombs)

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.
3. Introdurre nella microprovetta appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 25 µl di reagente Lorne Duoclone.
4. Incubare le ID-Card per 15 minuti a 37 °C.
5. Centrifugare le ID-Card in una centrifuga per schede gel.
6. Procedere alla lettura macroscopica per evidenziare l'eventuale agglutinazione.

C. Tecnica Ortho BioVue (schede AHG/Coombs)

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.
3. Inserire nella camera di reazione appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 40 µl di reagente Lorne Duoclone.
4. Incubare la/le cassetta/e per 15 minuti a 37 °C.
5. Centrifugare la/le cassetta/e in una centrifuga Ortho BioVue System.
6. Procedere alla lettura macroscopica per evidenziare l'eventuale agglutinazione.

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 D 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 D sugli eritrociti.
3. I risultati dei test condotti su cellule che mostrano agglutinazione con l'utilizzo del controllo negativo del reagente 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. Eseguire le fasi di lavaggio senza interruzioni e centrifugare e leggere i test immediatamente dopo l'aggiunta dell'antiglobulina umana, poiché eventuali ritardi possono determinare la dissociazione dei complessi antigene-anticorpo, con conseguenti risultati falsamente negativi o debolmente positivi.
3. I test su vetrino devono essere interpretati entro un massimo di 1 minuto, per garantire la specificità ed evitare che un risultato negativo venga erroneamente interpretato come positivo a causa dell'essiccazione del reagente.
4. È necessario prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati di test eseguiti a temperature diverse da quelle raccomandate.

LIMITAZIONI

1. I reagenti Lorne anti-D non sono idonei all'uso con cellule trattate con enzimi né per cellule sospese in LISS.
2. L'uso di soluzioni per la preparazione delle sospensioni di eritrociti diverse da quelle descritte nella sezione "Tecniche raccomandate" del presente documento deve essere validato prima dell'uso. Alcune soluzioni possono dare luogo a risultati falsamente positivi o falsamente negativi.
3. Il sangue conservato può dare reazioni più deboli rispetto al sangue fresco.
4. Si possono osservare agglutinazioni falsamente positive quando si testano cellule sensibilizzate con IgG.
5. 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, ogni lotto di reagente monoclonale Lorne Anti-D Duoclone 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" (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 mediante l'utilizzo di un pannello di cellule negative per l'antigene.
3. La potenza del reagente è stata analizzata in base al seguente standard di riferimento di potenza minima ottenuto dal National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC): Standard di riferimento 99/836 anti-D.
4. 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

1. L'utilizzatore finale è responsabile delle prestazioni del reagente quando viene impiegato con metodi diversi da quelli indicati nelle **Tecniche raccomandate**.
2. Qualsiasi scostamento dalle **Tecniche raccomandate** deve essere approvato prima dell'uso⁶.






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. Marion E. Reid e Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 192.
4. 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
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th 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.

FORMATI DISPONIBILI DEL REAGENTE

	Formato del flaconcino	Numero di catalogo	Test per flaconcino
Anti-D Duoclone Monoclonal	10 ml	740010	200

TABELLA DEI SIMBOLI

Simbolo	Definizione	Simbolo	Definizione
	Fabbricante	REF	Numero di catalogo
	Limiti di temperatura		Utilizzare entro AAAA-MM-GG
IVD	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>		Consultare le istruzioni per l'uso.
EC REP	Rappresentante autorizzato	LOT	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