

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

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

**RIEPILOGO**

L'antigene K fu descritto nel 1946. Questo antigene risulta pienamente sviluppato alla nascita e può essere fortemente immunogeno. L'anti-K è stato associato a reazioni trasfusionali emolitiche e alla malattia emolitica del neonato.

Anti-K	Anti-k	Fenotipo	Caucasici <sup>1</sup>	Afroamericani <sup>1</sup>
+	0	<b>K+k-</b>	0,2%	Raro
+	+	<b>K+k+</b>	8,8%	2%
0	+	<b>K-k+</b>	91%	98%
0	0	<b>K<sub>o</sub></b>	Molto raro	

**USO PREVISTO**

Il reagente per la determinazione del gruppo sanguigno è destinato all'uso per determinare qualitativamente la presenza o l'assenza dell'antigene Kell (KEL1) 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 K sugli eritrociti umani e provoca agglutinazione diretta (formazione di aggregati) degli eritrociti che esprimono l'antigene Kell. L'assenza di agglutinazione (assenza di aggregati) indica generalmente l'assenza dell'antigene Kell (vedere **Limitazioni**).

**REAGENTE**

Il reagente per la determinazione del gruppo sanguigno Lorne Monoclonal Anti-K è un reagente a basso contenuto proteico, contenente l'anticorpo monoclonale IgM, clone MS-56, diluito in un tampone fosfato contenente cloruro di sodio, albumina bovina e potenziatori macromolecolari (4,0 g%). 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. Il 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**.

**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 le analisi. 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 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 K deboli possono essere rilevati in modo non ottimale mediante schede gel, piastre per microtitolazione e vetrini. Si raccomanda di testare gli antigeni K 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 del reagente 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 Kk) e negativo (kk).

**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**

- Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
- In una provetta etichettata, introdurre: 1 volume di reagente Lorne e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Mescolare accuratamente e centrifugare tutte le provette per 20 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 3 e 4.

**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.

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.
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 o più cassette neutre.
3. Inserire nella camera di reazione appropriata: 50 µl di sospensione di eritrociti e 40 µl di reagente Lorne.
4. Centrifugare la/casse cassette/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 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. 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 e 1 volume di sospensione di eritrociti.
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 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 K 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 K 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 subito 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. Il sangue conservato può dare reazioni più deboli rispetto al sangue fresco.
2. 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/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. 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.

### 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'uso<sup>6</sup>.







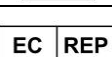


### BIBLIOGRAFIA

1. Marion E. Reid e Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 186.
2. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 12.
3. AABB Technical Manual, 16<sup>th</sup> edition, AABB 2008.
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

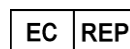
Formato del flaconcino	Numero di catalogo	Test per flaconcino
10 ml	760010	200

### 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