



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

Anti-D Clone 1 e Clone 2 Monoclonal: Per tecniche in provetta, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, micropiastra e su vetrino.

RIEPILOGO

Il sistema di gruppo sanguigno Rh è stato scoperto nel 1940. L'antigene D è l'antigene degli eritrociti non ABO più importante dal punto di vista clinico ed è stato considerato responsabile delle reazioni trasfusionali emolitiche e della Malattia emolitica del neonato.

Anti-D	Fenotipo	Caucasici % ³	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 a essere utilizzati per determinare qualitativamente la presenza o l'assenza dell'antigene Rh D 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

I reagenti contengono anticorpi contro l'antigene D presente sugli eritrociti umani e causano l'agglutinazione diretta (formazione di aggregati) degli eritrociti umani che trasportano l'antigene D. L'assenza di agglutinazione (mancata formazione di aggregati) in genere indica l'assenza dell'antigene D sugli eritrociti umani (vedere **Limitazioni**).

REAGENTI

I reagenti Lorne Monoclonal IgM Anti-D Clone 1 e Clone 2 per la determinazione del gruppo sanguigno sono reagenti a basso contenuto proteico contenenti un anticorpo monoclonale IgM umano diluito con cloruro di sodio (0,9 g %), albumina bovina (2,0 g %) e potenziatori macromolecolari (1,5 g %). Durante la tipizzazione dei campioni dei pazienti, utilizzando le tecniche raccomandate, ogni reagente agglutinerà direttamente le cellule Rh D positive, compresa la maggior parte delle varianti (ma non D^{VI}) e un'elevata percentuale di fenotipi D (D^{VI}) deboli. 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 sui campioni dei pazienti con tutte le tecniche raccomandate indicate di seguito senza la necessità di ulteriori diluizioni o aggiunte. Per il numero di riferimento del lotto e la data di scadenza vedere **Etichetta della fiala**.

Prodotto	Linea cellulare/Clone
Anti-D Clone 1	RUM-1
Anti-D Clone 2	MS-201

ESPRESSIONE INDEBOLITA DELL'ANTIGENE RhD

Il termine collettivo D^{VI} è ampiamente utilizzato per descrivere gli eritrociti che hanno un'espressione dell'antigene D più debole del normale. Il termine D debole denota individui con un numero ridotto di siti con antigene D completo per eritrocita. Il termine D parziale denota individui con epitopi dell'antigene D mancanti. Le cellule D^{VI} sono una categoria D parziale in cui manca la maggior parte degli epitopi D. Sia il reagente Clone 1 sia il reagente Clone 2 rileveranno la maggior parte degli esemplari di eritrociti D debole e D parziale tramite agglutinazione diretta, ma non rileveranno le cellule D^{VI}.

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 evidenti 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

1. I reagenti sono destinati esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*.
2. Se una fiala di reagente presenta crepe o perdite, gettare via il contenuto immediatamente.
3. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza (vedere **Etichetta della fiala**).
4. Non usare i reagenti se è presente un precipitato.
5. Quando si maneggiano i reagenti, indossare indumenti protettivi quali guanti monouso e un camice da laboratorio.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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

1. Si raccomanda di analizzare un controllo positivo (idealmente cellule R1r) e un controllo negativo (idealmente cellule rr) in parallelo con ogni lotto di test. I test devono essere considerati non validi se i controlli non mostrano i risultati previsti.
2. Durante la tipizzazione degli eritrociti di un paziente con diagnosi di una malattia per la quale gli eritrociti vengono rivestiti da anticorpi o altre proteine (quali HDN, AIHA), è importante analizzare gli eritrociti del paziente mediante il controllo negativo del reagente di Lorne (Monoclonal D Negative Control (catalogo 650010)).
3. Le varianti dell'antigene D debole e D parziale vengono scarsamente rilevate dalle tecniche con schede gel, piastre per microtitolazione e su vetrino. Si raccomanda di analizzare le varianti D debole e D parziale mediante la tecnica di test in provetta.
4. 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.
5. Nelle **Tecniche raccomandate** un volume è di circa 50µl se si usa la fiala contagocce fornita.
6. 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.
7. L'utilizzatore deve stabilire l'idoneità dei reagenti per l'uso in altre tecniche.

REAGENTI E MATERIALI NECESSARI

- Pipette volumetriche.
- ID-Card Bio-Rad (cloruro di sodio, test enzimatico e agglutinine a freddo).
- ID-Centrifuge Bio-Rad.
- ID-CellStab o ID-Diluent 2 Bio-Rad.
- Cassette Ortho BioVue System (Neutre).
- Centrifuga Ortho BioVue System.
- Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.
- 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 a pozzetto "a U" omologate.
- Centrifuga per micropiastre.
- Agitatore per piastre.
- 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).

TECNICHE RACCOMANDATE

A. Tecnica in provetta

1. 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-D 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.
- Risospingere delicatamente il sedimento eritrocitario e procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione
- Le provette che mostrano un risultato negativo o discutibile (come può accadere con i campioni D debole) 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 card con agglutinine a freddo)

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero di microprovette necessario.
- Inserire nella microprovetta appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 25µl di reagente Lorne Anti-D.
- Centrifugare la/e ID-Card in una centrifuga per scheda gel Bio-Rad.
- Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

C. Tecnica Ortho BioVue (cassette neutre)

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.
- Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero di camere di reazione necessario.
- Inserire nella camera di reazione appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 40µl di reagente Lorne Anti-D.
- Centrifugare la/e cassetta/e in una Centrifuga Ortho BioVue System.
- Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

D. Tecnica in micropiastra, con pozzetti "a U"

- Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
- Inserire nel pozzetto appropriato: 1 volume di reagente Lorne Anti-D e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Miscelare accuratamente, preferibilmente utilizzando un agitatore per micropiastre, avendo cura di evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti.
- Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti (il tempo dipende dall'utilizzatore).
- Centrifugare la micropiastra per 1 minuto a 140 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
- Risospingere il sedimento utilizzando l'agitazione accuratamente controllata su un agitatore per micropiastre
- Procedere alla lettura macroscopica o tramite un lettore automatico omologato.
- Eventuali reazioni deboli devono essere ripetute con la tecnica in provetta.

E. Tecnica su vetrino

- Preparare una sospensione di eritrociti al 35-45% in siero, plasma oppure PBS o soluzione salina isotonica o utilizzare sangue intero anticoagulato (nel proprio plasma).
- Aggiungere su un vetrino o su un cartoncino di reazione etichettato: 1 volume di reagente Lorne Anti-D e 1 volume di sospensione di eritrociti.
- Utilizzando un bastoncino applicatore pulito, miscelare il reagente e le cellule su un'area di circa 20 x 40 mm.
- Far oscillare lentamente il vetrino avanti e indietro per 30 secondi, mescolando ulteriormente di tanto in tanto nel periodo di 1 minuto, mantenendo il vetrino a temperatura ambiente.
- Procedere alla lettura macroscopica dopo 1 minuto su una luce diffusa e non confondere i fili di fibrina con l'agglutinazione.
- Eventuali reazioni deboli devono essere ripetute con la tecnica in provetta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST

- 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 D 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 D sugli eritrociti.
- 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

- Leggere tutti i test in provetta e in micropiastra immediatamente dopo la centrifugazione.
- 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.
- Occorre prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati dei test effettuati a temperature diverse da quelle raccomandate.

LIMITAZIONI

- Lorne Anti-D non è idoneo per l'uso con cellule trattate con enzimi, cellule in sospensione a bassa forza ionica (LISS) o per l'uso in tecniche con antiglobulina indiretta (IAT).
- Il sangue conservato può dare reazioni più deboli rispetto al sangue fresco.
- Si può osservare un'agglutinazione falsa positiva per via della presenza di potenziatori macromolecolari nel reagente durante l'analisi di cellule sensibilizzate con IgG, quali AIHA e HDN.
- 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

- Prima del rilascio, ogni lotto di reagente monoclonale Lorne Anti-D 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") e nelle "Common Technical Specifications" ("Specifiche tecniche comuni").
- I reagenti Anti-D per la determinazione del gruppo D dei pazienti non devono reagire con le cellule D^{VI} se si utilizza(no) il/i metodo/i raccomandato/i.
- La specificità degli anticorpi monoclonali di origine è dimostrata utilizzando un pannello di cellule antigene-negative.
- 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, Istituto nazionale degli standard e dei controlli biologici):
 - Riferimento 99/863 Anti-D.
- Il Controllo qualità dei reagenti 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

- L'utilizzatore è responsabile delle prestazioni dei reagenti con qualsiasi metodo diverso da quelli indicati nelle **Tecniche raccomandate**.
- Qualsiasi scostamento dalle **Tecniche raccomandate** deve essere approvato prima dell'uso⁶.

BIBLIOGRAFIA

- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
- AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
- Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 192.
- 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
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
- 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-D Clone 1 Monoclonal	10 ml	730010	200
	1000 ml	730000*	20.000
	5000 ml	730000x5*	100.000
Anti-D Clone 2 Monoclonal	10 ml	710010	200
	1000 ml	710000*	20.000
	5000 ml	710000x5*	100.000

*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