

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

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

RIEPILOGO

L'antigene K fu segnalato nel 1946. L'antigene è completamente sviluppato alla nascita e può essere fortemente immunogenico. Anti-K è risultato coinvolto in reazioni trasfusionali emolitiche e nella Malattia emolitica del neonato.

Anti-K	Anti-k	Fenotipo	Caucasici ¹	Afroamericani ¹
+	0	K+k-	0,2%	Raro
+	+	K+k+	8,8%	2%
0	+	K-k+	91%	98%
0	0	K ₀	Molto raro	

USO PREVISTO

Il reagente per la determinazione del gruppo sanguigno è destinato ad essere utilizzato per determinare qualitativamente la presenza o l'assenza dell'antigene Kell (KEL1) 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

Il reagente contiene anticorpi contro l'antigene K presente sugli eritrociti umani e causa l'agglutinazione (formazione di aggregati) diretta degli eritrociti umani che trasportano l'antigene Kell. L'assenza di agglutinazione (assenza di formazione di aggregati) in genere indica l'assenza dell'antigene Kell (vedere **Limitazioni**).

REAGENTE

Il reagente Lorne Monoclonal Anti-K per la determinazione del gruppo sanguigno è un reagente a basso contenuto proteico contenente l'anticorpo IgM monoclonale umano, 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 comprende sostanze CMR, o sostanze che alterano il sistema endocrino o che potrebbero provocare una sensibilizzazione o una reazione allergica nell'utilizzatore. Il reagente viene fornito alla diluizione ottimale per l'uso con tutte le tecniche raccomandate indicate di seguito senza necessità di ulteriori diluizioni o aggiunte. Per il numero di riferimento del lotto e la data di scadenza vedere **Etichetta della fiala**.

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 evidente 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

- Il reagente è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*.
- Se una fiala di reagente presenta crepe o perdite, gettare via il contenuto immediatamente.
- Non usare il reagente dopo la data di scadenza (vedere **Etichetta della fiala**).
- Non usare il reagente se è presente un precipitato.
- Quando si maneggiano i reagenti, indossare indumenti protettivi quali guanti monouso e un camice da laboratorio.
- Il reagente è stato filtrato attraverso una capsula da 0,2 µm per ridurre la carica batterica, ma non viene fornito sterile. 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.
- Il reagente contiene <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.
- I materiali utilizzati per la realizzazione del reagente sono stati testati dal produttore e sono risultati negativi agli anticorpi HIV 1+2 e HCV e ad 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 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

- Si raccomanda di analizzare un controllo positivo (idealmente eterozigote) e un controllo negativo in parallelo con ogni lotto dei test. I test devono essere considerati non validi se i controlli non mostrano i risultati previsti.
- Durante la tipizzazione degli eritrociti di un paziente, è importante che venga incluso un controllo negativo del reagente (Mono Rh Control Lorne, numero catalogo 640010), poiché i potenziatori macromolecolari nel reagente possono causare reazioni false positive con cellule rivestite da IgG.
- È possibile che gli antigeni K deboli vengano scarsamente rilevati dalle tecniche con schede gel, piastre per microtitolazione e su vetrino. Si raccomanda di analizzare gli antigeni K deboli mediante la tecnica di test in provetta.
- Prima dell'uso, far riscaldare il reagente fino a temperatura ambiente. Dopo aver utilizzato il reagente, riportarlo nel luogo di conservazione a 2-8°C.
- Nelle **Tecniche raccomandate** un volume è di circa 50µl se si usa la fiala contagocce fornita.
- 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.
- L'utilizzatore deve stabilire l'idoneità del reagente per l'uso 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 con velocità di rotazione di 1000 g per 20 secondi.
- Soluzione di PBS (pH 6.8-7.2) o 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 (cloruro di sodio, test enzimatici e agglutinine a freddo).
- 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.
- Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.

Tecnica con piastra per microtitolazione

- Piastre per microtitolazione a pozzetto "a U" omologate.
- Centrifuga per piastre per microtitolazione.
- Agitatore per piastre per microtitolazione.

Tecnica su vetrino

- Vetrini da microscopio in vetro o cartoncini di reazione bianchi.
- Bastoncini applicatori.
- Contaminuti 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.
- Inserire in una provetta etichettata: 1 volume di reagente Lorne 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.
- Risospendere delicatamente il sedimento eritrocitario e procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione
- Le provette che mostrano un risultato negativo o discutibile 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 enzimatici e scheda con agglutinine a freddo)

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in ID-CellStab o ID-Diluent 2.

2. Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero necessario di microprovette sulla/e ID-Card con cloruro di sodio, test enzimatici e agglutinine a freddo.
3. Inserire nella microprovetta appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 25µl di reagente Lorne.
4. Centrifugare la/e ID-Card in una centrifuga Bio-Rad-ID.
5. Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

C. Tecnica Ortho BioVue (cassette neutre)

1. Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.
2. Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero necessario di camere di reazione sulla/e cassetta/e neutra/e.
3. Inserire nella camera di reazione appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 40µl di reagente Lorne.
4. Centrifugare la/e cassetta/e in una Centrifuga Ortho BioVue System.
5. Procedere alla lettura macroscopica dell'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. Inserire nel pozzetto appropriato: 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 la contaminazione incrociata dei pozzetti.
4. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti (il tempo dipende dall'utilizzatore).
5. Centrifugare la micropiastra per 1 minuto a 140 rcf o per un tempo e una forza alternativi adeguati.
6. Risospendere i sedimenti utilizzando l'agitazione accuratamente controllata su un agitatore per micropiastre.
7. Procedere alla lettura macroscopica o tramite un lettore automatico omologato.
8. Eventuali reazioni deboli devono essere ripetute con la tecnica in provetta.

E. Tecnica su vetrino

1. Preparare una sospensione di eritrociti al 35-45% in siero, plasma, oppure PBS o soluzione salina isotonica. Se non è possibile, può essere utilizzato anche sangue intero anticoagulato come campione.
2. Aggiungere su un vetrino o su un cartoncino di reazione etichettato: 1 volume di reagente Lorne e 1 volume di sospensione di eritrociti.
3. Utilizzando un bastoncino applicatore pulito, miscelare il reagente e le cellule su un'area di circa 20 x 40 mm.
4. Far oscillare lentamente il vetrino avanti e indietro per 1 minuto, mantenendo il vetrino a temperatura ambiente.
5. Procedere alla lettura macroscopica dopo 1 minuto su una luce diffusa e non confondere i fili di fibrina con l'agglutinazione.
6. Eventuali reazioni deboli devono essere ripetute con la tecnica in provetta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST

1. **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 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. 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

1. Leggere tutti i test in provetta e in micropiastra direttamente dopo la centrifugazione.
2. 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.
3. Occorre prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati dei test effettuati a temperature diverse da quelle raccomandate.

LIMITAZIONI

1. Il sangue conservato può dare reazioni più deboli rispetto al sangue fresco
2. 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

1. Prima del rilascio, ogni lotto di questo reagente 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").
2. La specificità degli anticorpi monoclonali di origine è dimostrata utilizzando un pannello di cellule antigene-negative.

3. Il Controllo qualità del reagente 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

1. L'utilizzatore è responsabile delle prestazioni del reagente con qualsiasi metodo diverso da quelli indicati nelle **Tecniche raccomandate**.
2. Qualsiasi scostamento dalle **Tecniche raccomandate** deve essere approvato prima dell'uso⁵.

BIBLIOGRAFIA

1. Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 186.
2. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 12.
3. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th 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.

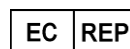
DIMENSIONI DEI REAGENTI DISPONIBILI

Dimensione fiala	Numero catalogo	Test per fiala
10 ml	760010	200
1000 ml	760000*	20.000

*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