

Reagente per la determinazione del gruppo sanguigno

Istruzioni per l'uso. Per uso diagnostico *in vitro*.

DESTINAZIONE D'USO

La scheda DG Gel Confirm viene utilizzata per confermare i gruppi sanguigni del sistema ABO e Rh (D) con la tecnica gel.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il sistema ABO è stato il primo gruppo sanguigno umano scoperto da Landsteiner nel 1900¹, ed è tuttora il gruppo più importante nelle procedure di trasfusione. Il sistema ABO è definito dalla presenza o assenza di antigeni A e/o B negli eritrociti umani e dalla presenza di anticorpi nel plasma o nel siero, corrispondenti all'antigene o agli antigeni mancanti negli eritrociti. Nel campo della medicina di trasfusione, dopo gli antigeni A e B, l'antigene del gruppo sanguigno più importante è l'antigene D dal gruppo sanguigno Rh.

La determinazione dell'Rh (D) è definita dalla presenza o assenza dell'antigene D (RH1) negli eritrociti.

I reagenti anti-A, anti-B e anti-D^{III} vengono utilizzati per la tipizzazione dei gruppi sanguigni ABO e Rh (D) in due campioni separati.

PRINCIPIO DEL TEST

Il principio del test è basato sulla tecnica gel descritta da Yves Lapiere² nel 1985 per il rilevamento di reazioni di agglutinazione degli eritrociti. Le schede DG Gel si compongono di otto microprovette. Ciascuna microprovetta è costituita da una camera, altrimenti conosciuta come camera di incubazione, posta sulla sommità di una microprovetta lunga e stretta, nota come "colonna". La microprovetta della scheda in plastica è stata riempita preventivamente con soluzione tampone in gel contenente anticorpi monoclonali specifici (anti-A, anti-B o anti-D). L'agglutinazione si verifica quando gli antigeni degli eritrociti reagiscono agli anticorpi corrispondenti presenti nella soluzione in gel. La colonna di gel funge da filtro in quanto blocca gli eritrociti agglutinati durante il passaggio di questi ultimi attraverso la colonna di gel nel corso della centrifugazione della scheda. La colonna di gel separa gli eritrociti agglutinati dagli eritrociti non agglutinati in base alla dimensione. Gli eventuali eritrociti agglutinati vengono bloccati sulla sommità o lungo la colonna di gel, laddove gli eritrociti non agglutinati raggiungono la parte inferiore della microprovetta formando un sedimento.

REAGENTI

Indicazioni osservabili

Controllare la condizione delle schede prima dell'uso.

- Non utilizzare la scheda se si osservano alterazioni o cambiamenti di colore, contaminazione microbiologica o altri artefatti.
- Non utilizzare la scheda se si osserva gel caratterizzato dalla presenza al suo interno di bolle d'aria o fessure, gel frammentato, gel essiccato o gel senza una linea sottile visibile di sopranatante.
- Non utilizzare la scheda se risulta aperta o se il sigillo della pellicola in alluminio è danneggiato.
- Non utilizzare la scheda se si osservano gocce sparse sulla sommità della microprovetta. In tal caso, prima di utilizzarla, è opportuno centrifugare la scheda con la centrifuga per schede gel Grifols. Se in seguito a una centrifugazione le gocce non scendono, non utilizzare la scheda.

Materiale fornito

Ciascuna microprovetta della scheda DG Gel Confirm contiene un gel in un terreno tamponato con un conservante. Le diverse microprovette vengono identificate tramite l'etichetta posta sulla parte anteriore della scheda.

- Microprovetta A: anti-A monoclonale (miscela di anticorpi IgM e IgG di origine murina, cloni 16243G2 + 16247E6).
- Microprovetta B: anti-B monoclonale (anticorpi IgM di origine murina, clone 9621A8).
- Microprovetta D^{III}: anti-D monoclonale (miscela di anticorpi IgC e IgM di origine umana, cloni P3x290, P3x35, P3x61 e P3x2123B10). Questo reagente anti-D monoclonale rileva la variante DVI.
- Microprovetta Ctl.: soluzione tampone senza anticorpi (microprovette di controllo).

Tutte le microprovette contengono azoturo di sodio (NaN₃) come conservante a una concentrazione finale di 0,09%.

Preparazione del reagente

Le schede DG Gel Confirm vengono fornite pronte all'uso. È opportuno portare le schede gel a temperatura ambiente (18 - 25 °C) prima di iniziare il test.

Materiale necessario non fornito

Per il metodo manuale

- Pipette automatiche da 10 µL, 50 µL e 1 mL.
- Puntali per pipette monouso.
- Provette per test in vetro o plastica.
- Diluente DG Gel Sol.
- Centrifuga per schede gel Grifols.
- Lettore per schede gel Grifols (opzionale).

Per i metodi completamente automatizzati

- Diluente DG Gel Sol.
- DG Fluid A e DG Fluid B.
- Strumento automatizzato da Grifols.

STOCCAGGIO E STABILITÀ

- Non usare oltre la data di scadenza.
- Conservare in posizione verticale (come indicato dalle due frecce sulla confezione esterna) con il sigillo intatto a 2 - 8 °C.
- Non congelare.
- Non esporre le schede a un calore eccessivo, a sorgenti di aria condizionata o a prese di aerazione.
- Non utilizzare le schede se si identificano condizioni di temperatura errate durante lo stoccaggio o la spedizione.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- I soli risultati di per sé non sono in grado di fornire una diagnosi clinica. Valutare i risultati congiuntamente alle informazioni cliniche del paziente e ad altri dati.
- Il prodotto deve essere utilizzato solo da personale qualificato.
- L'uso di volumi e/o di sospensioni eritrocitarie in concentrazioni diverse da quelle indicate nel metodo potrebbe alterare la reazione e generare risultati errati del test, ad esempio falsi positivi o falsi negativi.
- L'utilizzo di diluenti diversi dal DG Gel Sol per la sospensione eritrocitaria potrebbe alterare la reazione e generare risultati errati del test.
- Non utilizzare una centrifuga diversa da una centrifuga per schede gel Grifols.

- I reagenti della scheda DG Gel Confirm di origine monoclonale umana vengono prodotti utilizzando materiali dei quali, mediante test, si è dimostrata la non reattività per l'antigene HBs e per gli anticorpi anti-HIV e anti-HCV. Non esiste comunque una procedura nota in grado di accertare che i prodotti di origine umana non trasmettano agenti infettivi.
- Tutti i prodotti contenenti materiali di origine animale e i prodotti e i campioni di sangue umano vanno trattati come se fossero potenzialmente in grado di trasmettere malattie infettive.
- Una volta utilizzato, il prodotto deve essere smaltito in contenitori per rifiuti biologici, secondo le normative locali, regionali e nazionali.
- Per eventuali domande o ulteriori informazioni sull'utilizzo di questo prodotto, consultare il rappresentante dell'assistenza Grifols di zona.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

È necessario utilizzare i campioni di sangue raccolti in EDTA, citrato di sodio o sodio-eparina. Il sangue dovrà essere raccolto, separato e maneggiato da personale tecnico qualificato, secondo gli standard³⁺⁴ correnti e seguendo le istruzioni del fabbricante dei materiali usati per raccogliere i campioni.

Non utilizzare campioni eccessivamente emolizzati, torbidi o contaminati.

I campioni vanno testati il prima possibile. Se necessario, i campioni conservati a 2 - 8 °C possono essere utilizzati entro massimo 7 giorni dal prelievo.

Anche gli eritrociti provenienti da sacchetti prelevati in CPD, CPDA o SAG-Mannitolo possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del sacchetto. Se vengono utilizzati gli eritrociti dal segmento del sacchetto, si consiglia di lavarli con soluzione fisiologica salina prima di preparare la sospensione.

PROCEDURA

1. Attendere che le schede DG Gel Confirm, i reagenti supplementari e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (18 - 25 °C).

Nota: Per gli strumenti completamente automatizzati, saltare le fasi successive e fare riferimento alle istruzioni per l'uso degli strumenti in questione.

2. Identificare le schede da utilizzare e i campioni da testare.
3. Preparare una sospensione eritrocitaria all'5% nel DG Gel Sol (50 µL di eritrociti concentrati in 1 mL di DG Gel Sol).
4. Togliere completamente la pellicola di alluminio dalla scheda DG Gel o dalla singola micro-provetta che verrà utilizzata per l'analisi. Rimuovere delicatamente la pellicola in alluminio per evitare la contaminazione crociata dei contenuti delle microprovette.

Nota: Utilizzare le microprovette immediatamente in seguito all'apertura del sigillo.

5. Verificare l'omogeneità della sospensione della sospensione eritrocitaria al 5% prima di utilizzarla.

6. Erogare 10 µL di sospensione eritrocitaria al 5% in ciascuna microprovetta (A/B/D^{III}/Ctl.).

Nota: Erogare la sospensione eritrocitaria prestando molta attenzione a evitare il contatto del puntale della pipetta con la parete o con i contenuti delle microprovette, al fine di evitare un'eventuale contaminazione.

7. Centrifugare la scheda gel nella centrifuga Grifols.
8. Al termine della centrifugazione, rimuovere la scheda gel dalla centrifuga e leggere i risultati. In alternativa, utilizzare un lettore per schede gel Grifols per leggere e interpretare i risultati.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Si consiglia di includere controlli positivi e negativi nei test per ogni giorno di utilizzo. Se si ottiene un risultato inatteso dal controllo, si dovrà condurre un'ispezione accurata della strumentazione, dei reagenti e dei materiali usati.

RISULTATI

Realizzare un report dei risultati riportando grado di agglutinazione, assenza di agglutinazione o emolisi.

Risultati negativi: nessuna agglutinazione e nessuna emolisi eritrocitaria visibile nella microprovetta. In un risultato negativo, gli eritrociti sono situati sul fondo della colonna di gel.

Risultati positivi: agglutinazione e/o emolisi eritrocitaria visibile nella microprovetta.

In un risultato positivo, è possibile che gli eritrociti agglutinati rimangano lungo tutta la colonna di gel mostrando gradi di reazione differenti, come descritto di seguito. Inoltre, alcune reazioni positive potrebbero formare un sedimento sul fondo della microprovetta.

I campioni con espressione normale di antigeni A, B e D forniscono gradi di reazioni fortemente positive. Delle reazioni più deboli possono indicare un'espressione debole o parziale di antigeni A, B e D. Anche il sottogruppo A₂ del sistema ABO potrebbe presentare un'espressione debole.

Gradi di reazione

Negativo:	0	Sedimento ben definito di eritrociti non agglutinati sul fondo della colonna di gel e assenza di cellule agglutinate visibili nel resto della colonna di gel
Positivo:	+/-	Grumi di dimensioni ridotte appena visibili di cellule agglutinate nella parte inferiore della colonna di gel e sedimento di cellule non agglutinate sul fondo
	1+	Alcuni grumi di dimensioni ridotte di cellule agglutinate, più frequentemente nella metà inferiore della colonna di gel. È inoltre possibile osservare un piccolo sedimento sul fondo della colonna di gel
	2+	Grumi di piccola o media dimensione di cellule agglutinate lungo tutta la colonna di gel. È inoltre possibile notare alcune cellule non agglutinate sul fondo della colonna di gel
	3+	Alcuni grumi di media dimensione di cellule agglutinate nella metà superiore della colonna di gel
	4+	Una striscia ben definita di eritrociti agglutinati nella parte superiore della colonna di gel. È possibile notare alcune cellule agglutinate al di sotto della striscia
Doppia Popolazione	DP	Una striscia di eritrociti posti sulla parte superiore del gel o sparsi lungo la colonna di gel e un sedimento sul fondo alla stregua di un risultato negativo
Emolisi	H	Emolisi nella microprovetta con pochissimi o nessun eritrocita nella colonna di gel. Realizzare un report annotando se l'emolisi è presente nella microprovetta ma non nel campione

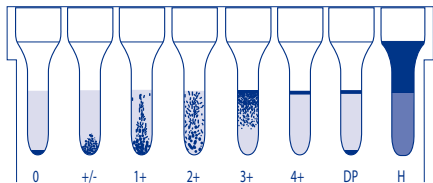


Figura 1. Schema dei gradi di reazione

Stabilità dei risultati

Dopo la centrifuga delle schede si consiglia di leggere i risultati immediatamente. Non lasciare le schede elaborate in posizione orizzontale. Se necessario, è possibile eseguire una lettura ritardata entro massimo 24 ore dall'elaborazione delle schede, nel caso in cui esse siano mantenute in posizione verticale, refrigerate (2 - 8 °C) e sigillate con una pellicola da laboratorio coprente per evitare l'evaporazione del sopranatante.

Interpretazione dei risultati

Sistema ABO. La reazione attesa per le microprovette A e B e la relativa interpretazione sono mostrate nella seguente tabella (+ = positivo e 0 = negativo).

Microprovetta A	Microprovetta B	Microprovetta Ctl.	Interpretazione
0	0	0	Gruppo O
+	0	0	Gruppo A
0	+	0	Gruppo B
+	+	0	Gruppo AB

Antigene D. Un risultato positivo nella microprovetta corrispondente indica la presenza di antigene D (sistema Rh).

Note:

- L'acronimo "Ctl." sta per Control (Controllo).
- Si presuppone che la microprovetta Ctl. sia negativa. Nel caso in cui essa sia positiva, a causa della formazione di "rouleaux", di autoagglutinine fredde potenti o di altre ragioni, invalidare il test. Ripetere la determinazione in seguito al lavaggio degli eritrociti con soluzione salina fisiologica e alla preparazione di una nuova sospensione degli eritrociti lavati. Se la microprovetta Ctl. del test ripetuto è negativa, i risultati del test possono essere interpretati; se invece è positiva, invalidare il test.
- Il gruppo ABO ottenuto deve essere verificato confrontando il risultato ottenuto con un campione precedentemente tipizzato. Se non è disponibile un campione tipizzato, si consiglia di determinare indirettamente il gruppo. Le discrepanze nella determinazione diretta (cellule) devono essere analizzate prima di pubblicare il risultato.
- Per verificare lo stato negativo di D oppure per assicurare il rilevamento di D debole e parziale, sarà opportuno utilizzare altri reagenti e tecniche (come il test dell'antiglobulina indiretto) che potrebbero rilevare varianti D deboli e parziali differenti.
- È necessario adottare precauzioni nell'interpretazione di eventi di Doppia Popolazione. Non tutte le situazioni caratterizzate da cellule miste vengono rilevate. Saranno necessarie informazioni supplementari sulla cartella clinica del paziente e ulteriori analisi per trovare una soluzione. I pazienti trasfusi o quelli sottoposti a trapianto del midollo osseo potrebbero presentare immagini di Doppia Popolazione⁵. Un caso di Doppia Popolazione può essere osservato anche in alcuni sottogruppi ABO (A₃), in criptoantigeni Tn, nel chimerismo sanguigno nei gemelli eterozigoti e nel rarissimo caso di mosaicismismo derivante dalla dispermia^{5,6}.
- L'osservazione di emolisi completa o parziale (liquido sopranatante e/o colonna di gel rosati) nelle microprovette deve essere interpretata come risultato positivo, dopo aver verificato che non sia dovuta a un problema di prelievo e/o di manipolazione del campione.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Campioni grossolanamente emolizzati, torbidi o contaminati o campioni con presenza di coagulo potrebbero dar luogo a risultati falsi positivi o falsi negativi.
- I campioni datati o emolizzati potrebbero indurre reazioni più deboli rispetto a quelle ottenute con un campione fresco.
- I campioni caratterizzati da anticorpi ad alta potenza potrebbero ricoprire gli eritrociti completamente, causando un'agglutinazione⁵ spontanea.
- Concentrazioni anomale di proteine del siero, la presenza di soluzioni macromolecolari nel siero/plasma o la presenza della gelatina di Wharton nei campioni di sangue del funicolo ombelicale potrebbero causare l'agglutinazione non specifica degli eritrociti. Si consiglia di lavare gli eritrociti prima di eseguire il test⁵.
- Gli eritrociti prelevati da individui con varianti A o B potrebbero presentare una debole espressione degli antigeni e potrebbero non essere rilevati.
- L'espressione dell'antigene potrebbe risultare indebolita negli eritrociti delle persone affette da leucemia o altre malattie maligne⁵.
- Un'espressione o varianti estremamente deboli degli antigeni D potrebbero non essere rilevate.
- I reagenti anti-A contenuti in questa scheda potrebbero reagire con i criptoantigeni Tn.
- In alcune occasioni, gli eritrociti non agglutinati potrebbero essere trattenuti da qualche parte nella colonna di gel, presentandosi in forma di piccolissimi punti rossi o macchie. Tuttavia, questa ritenzione non specifica non dovrebbe interferire con l'interpretazione dei risultati.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLA PRESTAZIONE

Sensibilità e specificità diagnostica:

Sistema ABO/Rh

La sensibilità e la specificità diagnostica degli anticorpi presenti nella scheda DG Gel Confirm, allo scopo di determinare gli antigeni del sistema ABO e Rh, sono state studiate in un numero indicativo di campioni positivi e negativi.

Anticorpo	N. di campioni	Sensibilità ^(a)	Specificità ^(b)
Anti-A	3041	100%	100%
Anti-B	3046	100%	100%
Anti-D ^(c)	3057 ^(c)	99,50%	100%

- (a) Sensibilità: (numero di risultati veri positivi / (numero di risultati veri positivi + numero di risultati falsi negativi)) x 100
(b) Specificità: (numero di risultati veri negativi / (numero di risultati veri negativi + numero di risultati falsi positivi)) x 100
(c) Questi campioni includono 52 campioni contenenti la debole espressione dell'antigene D. Se si considerano soltanto questi campioni, la sensibilità del reagente anti-D^(c) è 73,10%.

Precisione

La precisione dei reagenti presenti nella scheda DG Gel Confirm è stata determinata insieme a test di ripetibilità, riproducibilità tra i lotti e riproducibilità all'interno del laboratorio. Tra i risultati, non è stato riscontrato alcun falso positivo o falso negativo; inoltre, le differenze tra le intensità di agglutinazione nei campioni positivi sono state di 1 grado di agglutinazione o inferiori in tutte le analisi.

BIBLIOGRAFIA

- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 9th edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993.
- Lapierre Y, et al. The gel test: a new way to detect red cells antigen-antibody reactions. Transfusion, 30: 109-113, 1990.
- CLSI H3-A6: Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; Approved Standard, 6th edition, 2007.
- CLSI H18-A4: Procedures for the handling and processing of blood specimens; Approved Guideline, 4th edition, 2010.
- Technical Manual, 18th edition, American Association of Blood Banks, Bethesda, Maryland, 2014.
- Judd WJ, Johnson ST, Storry JR. Judd's Methods in immunohematology, 3rd edition, AABB Press Bethesda, 516, 2008.

PRESENTAZIONE

210339 DG Gel Confirm 50 Schede Profilo: 2x(A/B/D^(H)/Ctl.)

Prodotto da:

Diagnostic Grifols, S.A.

Passeig Fluvial, 24, 08150 Parets del Vallès (Barcelona), España

Data dell'ultima versione: Ottobre 2016

Questo documento è disponibile in diverse lingue. Le traduzioni sono state realizzate a partire dal documento originale in Inglese. In caso di dubbi o discrepanze, farà fede il documento originale in lingua Inglese.

LEGENDA SIMBOLI

Almeno uno di questi simboli potrebbe essere stato utilizzato sulle etichette o sulla confezione del prodotto.

IVD	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
LOT	Codice di lotto
	Utilizzare entro
	Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso
REF	Riferimento di Catalogo
	Schedine
	Fabbricante
	Alto
	Fragile, maneggiare con cura
	Conservare a secco

