

Anti-D blend (monoclonale, IgG + IgM umane)

Per test su vetrino, provetta, schedina e micropiastra

ESCLUSIVAMENTE PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

USO

Il siero Anti-D da miscela di monoclonali si ottiene da surnatanti di colture cellulari di linee di etero-ibridomi. Una linea di cellule secerne un anticorpo di tipo IgG e l'altra un anticorpo di tipo IgM, entrambi reagiscono specificamente con l'antigene corrispondente. Il siero si utilizza per determinare se gli eritrociti umani possiedono o meno l'antigene D corrispondente. Questo reagente reagisce negativamente con gli eritrociti di categoria D^{VI} con l'anticorpo IgM e positivamente con l'anticorpo IgG nel test di Coombs indiretto. Il reagente deve essere usato esclusivamente da personale tecnico qualificato.

PRINCIPIO DEL TEST

Il procedimento utilizzato per questo reagente si basa sul principio di agglutinazione. Gli eritrociti umani normali che possiedono l'antigene corrispondente, agglutinano in presenza dell'anticorpo specifico diretto verso l'antigene.

REAGENTI

Il reagente elencato contiene anticorpi provenienti dai seguenti cloni cellulari: Anti-D blend (monoclonale, IgG + IgM umani, cloni: MS-26; TH-28). Questo reagente contiene <0,1% (p/v) di sodio azide come conservante. In aggiunta, il reagente si compone di anticorpo attivo, cloruro di sodio, macromolecole e albumina bovina.

AVVERTENZE

Questo reagente si ottiene da surnatanti di colture cellulari. In quanto prodotto biologico, deve essere ritenuto potenzialmente infettivo, dal momento che non si può mai escludere completamente il pericolo di causare malattie. Il reagente contiene sodio azide, che può essere tossica e può reagire con piombo o rame formando sali altamente esplosivi. Per queste ragioni, il reagente deve essere maneggiato con cautela.

MODALITA' DI CONSERVAZIONE

Conservare tra +2 e +8 °C. Può essere tenuto a temperatura ambiente (15-30 °C) durante l'utilizzo. In linea di principio, conservare e utilizzare i reagenti solo entro la data di scadenza indicata.

OSSERVAZIONI

1. L'intensità delle reazioni positive dipende anche dal periodo di conservazione del sangue utilizzato.
2. Per ogni test si dovranno eseguire controlli positivi e negativi.
3. Una conservazione inappropriata dei reagenti ne riduce l'efficacia.
4. Una centrifugazione notevolmente differente rispetto alla forza centrifuga relativa indicata può portare a risultati falsati.
5. I campioni di sangue da analizzare devono essere utilizzati il prima possibile. Se l'analisi viene ritardata, i campioni devono essere conservati ad una temperatura tra 2-8 °C. Il sangue anticoagulato con sodio citrato o EDTA dovrà essere analizzato entro 14 giorni dal prelievo. Il sangue ottenuto mediante puntura capillare deve essere analizzato direttamente sul vetrino, tuttavia, per evitare la coagulazione, il sangue ottenuto con questo metodo deve essere mescolato rapidamente con il reagente.
6. Per l'impiego di questi antisieri devono essere rispettate tutte le leggi, direttive e linee guida nazionali in vigore, in particolare modo quelle relative alle GLP.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Non è richiesta alcuna preparazione del reagente. Utilizzare il reagente direttamente dal suo flacone.

PROCEDIMENTO

Materiale necessario non fornito:

Per test su vetrino: vetrino; pipetta Pasteur; bastoncino per miscelare

Per test su provetta: provette da 10x75 mm o 12x75 mm; pipette per la dispensazione di circa 100 µl; centrifuga; soluzione salina isotonica (0,85 - 0,9% di cloruro di sodio); siero antiglobuline umane

Per test in schedina: schedine Grifols "DG Gel® Neutral" / „DG Gel® Coombs“; pipetta; centrifuga per schedine; diluente specifico per schedine (DG Gel® Sol).

Per test su micropiastra: micropiastra da 96 pozzetti; pipetta di precisione; centrifuga per micropiastre; agitatore; soluzione salina isotonica (0,85-0,9% di cloruro di sodio)

Esecuzione del test

Su vetrino

1. Utilizzare unicamente sedimento di eritrociti o sangue intero.
2. Distribuire una goccia (50 µl circa) del reagente su un vetrino.
3. Usando una pipetta Pasteur, aggiungere una goccia di sedimento di eritrociti o sangue intero (50 µl circa) sul vetrino.
4. Mescolare bene gli eritrociti al reagente con un miscelatore e distribuire su un'area di circa 2 cm di diametro.
5. Ruotando leggermente il vetrino, verificare se entro un minuto si produce agglutinazione (la reazione ha inizio dopo pochi secondi). Si possono verificare reazioni non specifiche /inappropriate se si secca la reazione o si scalda il vetrino. Documentare il risultato.

In provetta

1. Preparare una sospensione al 2% - 5% di eritrociti in soluzione salina isotonica (cellule lavate da una a tre volte con soluzione salina).
2. Aggiungere 100 µl (in alternativa: una goccia = 50 µl circa) del reagente appropriato in ciascuna provetta.
3. Aggiungere 100 µl (in alternativa: una goccia = 50 µl circa) dell'appropriata sospensione di cellule in ciascuna provetta.
4. Mescolare bene agitando leggermente.
5. Incubare la provetta a temperatura ambiente (15-30°C) per 1-15 minuti.
6. Centrifugare la provetta per 1 minuto a 2.000 rpm (circa 800-1.000 x g).
7. Risospendere leggermente gli eritrociti e verificare macroscopicamente se si produce agglutinazione entro 3 minuti. Documentare il risultato.

Test di Coombs indiretto in provetta

8. Ripetere i passi da 1 a 4 con materiale fresco o continuare direttamente dopo la lettura dei risultati.
9. Incubare la provetta a 37°C per 30 minuti.

10. Lavare gli eritrociti 3 volte con soluzione salina isotonica (fredda).

11. Aggiungere 100 µl di siero di antiglobulina umana (siero di Coombs) a ciascuna provetta.

12. Centrifugare la provetta per 1 minuto a 1.000 rpm (circa 180-270 x g).

13. Risospendere leggermente gli eritrociti e verificare macroscopicamente se si produce agglutinazione entro 3 minuti. Documentare il risultato.

In schedina

1. Utilizzare una sospensione di eritrociti allo 0,8% nel diluente specifico per schedine (DG Gel® Sol).
2. Aggiungere 50 µl dell'appropriata sospensione di eritrociti in ciascun micropozzetto della schedina DG Gel® Neutral
3. Aggiungere 25 µl del siero appropriato in ciascun micropozzetto (in alternativa: una goccia).
4. Centrifugare la schedina nella centrifuga appropriata
5. Verificare macroscopicamente la presenza di agglutinazione (nei successivi 30 minuti). Documentare il risultato.

Test di Coombs indiretto in schedina

1. Preparare una sospensione allo 0,8% di eritrociti nel diluente specifico per schedine (DG Gel® Sol).
2. Aggiungere 50 µl dell'appropriata sospensione di eritrociti in ciascun micropozzetto della schedina DG Gel® Coombs.
3. Aggiungere 25 µl di antisiero in ciascun micropozzetto (in alternativa: una goccia).
4. Incubare la schedina a 37°C per 15 minuti.
5. Centrifugare la schedina nella centrifuga appropriata.
6. Verificare macroscopicamente la presenza di agglutinazione (nei successivi 30 minuti). Documentare il risultato.

Su micropiastra

1. Utilizzare una sospensione al 2% di eritrociti in soluzione salina isotonica (le cellule possono essere lavate una volta o fino a tre volte in soluzione salina).
2. Aggiungere 50 µl dell'appropriata sospensione di eritrociti a ciascun pozzetto.
3. Aggiungere 50 µl del siero reagente appropriato a ciascun pozzetto.
4. Mescolare entrambi per 30 secondi nell'agitatore a velocità massima.
5. Centrifugare la piastra nella centrifuga appropriata per 30 secondi a 400 x g.
6. Miscelare nell'agitatore a velocità media per 30 secondi e verificare macroscopicamente la presenza di agglutinazione. Documentare il risultato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati si osservano ruotando leggermente il vetrino o agitando leggermente la provetta di centrifugazione. Risultati positivi (+): l'agglutinazione visibile di eritrociti è un risultato positivo e indica la presenza dell'antigene corrispondente. Risultati negativi (-): l'agglutinazione non visibile di eritrociti è un risultato negativo e indica l'assenza dell'antigene corrispondente. La lettura e l'interpretazione delle schedine **DG Gel®** deve essere eseguita come descritto nei foglietti illustrativi delle schedine utilizzate.

LIMITAZIONI DEL PROCEDIMENTO

1. L'inosservanza delle istruzioni descritte nelle sezioni "Procedure" e "Interpretazione dei risultati" può portare a risultati inesatti.
2. Se si verificano controlli con risultati incerti o falsi, non si possono ottenere conclusioni valide sui risultati dei test.
3. Eritrociti trattati con enzima possono dare reazioni non specifiche.
4. A causa della variabilità dell'espressione antigenica, la reattività di questi reagenti verso certi fenotipi può dare una reattività più debole comparata alle cellule di controllo.
5. Gli eritrociti rivestiti di allo-anticorpi o auto-anticorpi della stessa o simile specificità del reagente (ossia, cellule che sono positive nel test all'antiglobulina diretto (DAT)) possono dare reazioni deboli. In casi estremi si possono verificare risultati falsi-negativi.
6. Gli eritrociti rivestiti di anticorpi (cellule che sono positive nel test di antiglobuline diretto (DAT)) possono dare risultati falsi-positivi nel metodo in schedina. Queste cellule reagiscono positivamente anche senza il reagente.
7. Prestare attenzione alle limitazioni descritte nei foglietti illustrativi delle schedine **DG Gel®** utilizzate.
8. Con il metodo su vetrino la maggior parte degli antigeni D deboli (D^{weak}) e delle categorie parziali non sono riconosciuti.
9. Questo reagente reagisce negativamente con eritrociti della categoria D^{VI} in un in un test di agglutinazione e positivamente in un test di Coombs indiretto.
10. Le procedure descritte per la sperimentazione si riferiscono all'utilizzo del siero di Coombs prodotto da Antitoxin GmbH e distribuito da Grifols Italia. In linea di principio, anche altri sieri di Coombs possono essere utilizzati, ma i laboratori devono seguire le procedure indicate dal fabbricante. I laboratori devono inoltre seguire i processi di validazione approvati per dimostrare la compatibilità di questo prodotto.

PRODOTTO

Cod. 213108 Anti-D blend (IgG+IgM) 1 x 10 ml

ANTITOXIN GmbH
Industriestrasse 88
69245 Bammental
Deutschland
730-13-2409 Version 009 / Mrz 2009

CE 0483