

DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

Deutsch B006041 02.13

Le^a, Le^b, ctl/Le^a, Le^b, ctl
monoklonal

Bestimmung der Lewis Antigene

Produkt-Identifikation: 51241

INLEITUNG

Im Lewis-System (ISBT Nummer 007) bilden die Antigene keinen inhärenten Teil der Membrane, sondern werden vielmehr aus der flüssigen Phase an die Erythrozytenoberfläche adsorbiert.

Das Lewis-Gen (*LE* oder *FUT3*) reagiert wechselseitig mit dem Sekretor-Gen (*SE* oder *FUT2*). Wenn das Gen *LE* anwesend und das Gen *SE* abwesend ist, entsteht der Phänotyp Le (a+b-). Bei Vorliegen beider Gene erfolgt die Umwandlung des Antigens Le^a (LE1) in das Antigen Le^b (LE2), wodurch der Phänotyp Le (a-b+) entsteht. Individuen mit fehlendem Gen *LE* sind Le (a-b-).

Aufgrund der gemeinsamen Vorläufersubstanz besteht auch eine komplexe Wechselwirkung mit dem ABO-System. Lewis-Antigene sind an den Erythrozyten von Neugeborenen nicht vorhanden oder nur schwach ausgeprägt.

Nach Mollison [1] verhält sich die Frequenz des Lewis-Phänotyps in der kaukasischen Bevölkerung wie folgt:

Phänotyp	Häufigkeit
Le (a-b+)	75%
Le (a+b-)	20%
Le (a-b-)	5%
Le (a+b+)	 sehr selten *

* mehr verbreitet in Ostasien, Südostasien, dem pazifischen Raum und Australasien.

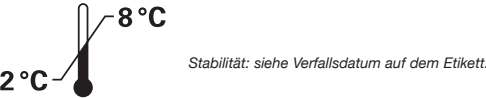
Mit der ID-Karte "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" können zwei Proben getestet werden.

REAGENZIEN



ID-Karte "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" mit 2 Mikroröhrchen mit monoklonalen Antikörpern Anti-Le^a (Zelllinien P3N20V3 + LM112/161) und 2 Mikroröhrchen mit monoklonalen Antikörpern Anti-Le^b (Zelllinie LM129/181 [LB1]) in der Gelmatrix. Die Mikroröhrchen ctl dienen zur negativen Kontrolle. Konservierungsmittel: < 0,1% NaN₃.

Achtung: Alle Reagenzien sollten als potentiell infektiös gehandhabt werden.



ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN

- ID-Diluent 1: Modifizierte Bromelin-Lösung zur Herstellung der Erythrozytensuspension.

(siehe diesbezügliche Packungsbeilage)

WEITERE ERFORDERLICHE MATERIALIEN

- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Tips (Pipettenspitzen)
- Suspensionsröhrchen
- ID-Arbeitsplatz
- ID-Zentrifuge 6, 12 oder 24

PROBENMATERIAL

Für verlässliche Resultate sollte die Bestimmung mit frisch abgenommenen Proben durchgeführt werden oder in Übereinstimmung mit lokalen Laborvorschriften für die Akzeptanz von Probenmaterial erfolgen. Vorzugsweise sollte die Probengewinnung in den Antikoagulantien Citrat, EDTA oder CPD-A erfolgen. Native Proben (kein Antikoagulanzt) können auch verwendet werden.

VORBEREITUNG DER BLUTPROBE

Eine 5%ige Erythrozytensuspension in ID-Diluent 1 wie folgt herstellen:
Diluent vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

1. 0,5 ml ID-Diluent 1 in ein sauberes Röhrchen pipettieren.
2. 50 µl Vollblut oder 25 µl Erythrozytenkonzentrat zugeben; leicht mischen.
3. Die Erythrozytensuspension 10 Minuten bei Raumtemperatur (18–25 °C) inkubieren.

Innerhalb von 15 Minuten nach der Inkubation verwenden.

KONTROLLEN

Bekannte Antigen-positive und -negative Erythrozyten sollten in Übereinstimmung mit den gültigen Richtlinien zur Qualitätssicherung mitgeführt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Keine ID-Karten benutzen mit Anzeichen von Austrocknung, Luftblasen, beschädigter Versiegelung oder Tropfen des Gels bzw. des Überstandes im oberen Teil der Mikrokammer oder auf der Unterseite der Versiegelung.
ID-Karten vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

1. Die ID-Karte mit den Patienten- oder Spenderdaten beschriften.
2. Aluminiumfolie von den benötigten Mikroröhrchen in aufrechter Kartenposition entfernen.
3. 10 oder 12,5 µl der Erythrozytensuspension in das entsprechende Mikroröhrchen der ID-Karte pipettieren.
4. ID-Karten 10 Minuten in der ID-Zentrifuge zentrifugieren.
5. Reaktionen ablesen und aufzeichnen.

DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

English B006041 02.13

Le^a, Le^b, ctl/Le^a, Le^b, ctl
monoclonal

Determination of the Lewis antigens

Product-Identification: 51241

INTRODUCTION

In the Lewis system (ISBT number 007) the antigens are adsorbed onto the red cell surface from the plasma, rather than being an inherent part of the membrane.

The Lewis gene (*LE* or *FUT3*) interacts with the secretor gene (*SE* or *FUT2*). When the *LE* gene is present and the *SE* gene is absent, the resulting phenotype is Le (a+b-). Where both genes are present, the Le^a (LE1) antigen is converted to Le^b (LE2) antigen, giving rise to the Le (a-b+) phenotype. Individuals lacking the *LE* gene group as Le (a-b-).

There is also a complex interaction with the ABO system, due to the commonality of precursor substance. Lewis antigens are absent or only poorly expressed on red cells from newborns.

According to Mollison [1], the Lewis phenotype frequency in the Caucasian population is as follows:

Phenotype	Frequency
Le (a-b+)	75%
Le (a+b-)	20%
Le (a-b-)	5%
Le (a+b+)	 very rare *

* more common in East Asia, South East Asia, the Pacific region and Australasia.

The ID-Card "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" allows testing of 2 samples.

REAGENTS



ID-Card "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" with 2 microtubes containing monoclonal anti-Le^a (cell lines P3N20V3 + LM112/161) and 2 microtubes containing monoclonal anti-Le^b (cell line LM129/181 [LB1]) within the gel matrix. The microtubes ctl are the negative controls. Preservative: < 0.1% NaN₃.

Caution: All reagents should be treated as potentially infectious.



ADDITIONAL REAGENTS REQUIRED

- ID-Diluent 1: modified bromelin solution for red cell suspension.

(see related package insert)

FURTHER MATERIALS REQUIRED

- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Tips (pipetor tips)
- Suspension Tubes
- ID-Working table
- ID-Centrifuge 6, 12 or 24

SAMPLE MATERIAL

For optimal results, the determination should be performed using a freshly drawn sample, or in accordance with local laboratory procedures for sample acceptance criteria. Preferably, blood samples should be drawn into citrate, EDTA or CPD-A anticoagulant. Samples drawn into plain tubes (no anticoagulant) may also be used.

PREPARATION OF BLOOD SAMPLE

Prepare a 5% red cell suspension in ID-Diluent 1 as follows:
Allow the diluent to reach room temperature before use.

1. Dispense 0.5 ml of ID-Diluent 1 into a clean tube.
2. Add 50 µl of whole blood or 25 µl of packed red cells, mix gently.
3. Incubate the red cell suspension for 10 minutes at room temperature (18–25 °C).

Use within 15 minutes after incubation.

CONTROLS

Known positive and negative samples should be included in accordance with the relevant guidelines of quality assurance.

TEST PROCEDURE

Do not use ID-Cards which show signs of drying, have bubbles, damaged seals, drops of gel or supernatant in the upper part of the microtubes or on the underside of the aluminium foil.
Allow ID-Cards to reach room temperature before use.

1. Identify the ID-Card with the unique patient or donor number/details as appropriate.
2. Remove the aluminium foil from as many microtubes as required by holding the ID card in the upright position.
3. Add 10 or 12.5 µl of the red cell suspension to the appropriate microtube.
4. Centrifuge the ID-Cards for 10 minutes in the ID-Centrifuge.
5. Read and record the results.

DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

Français B006041 02.13

Le^a, Le^b, ctl/Le^a, Le^b, ctl
monoclonal

Détermination des antigènes Lewis

Identification de produit : 51241

INTRODUCTION

Le système Lewis (ISBT numéro 007) est différent des autres systèmes, les antigènes solubles du plasma étant adsorbés à la surface des hématies, au lieu de faire partie intégrante de la membrane.

Il y a une interaction du gène Lewis (*LE* ou *FUT3*) avec le gène sécréteur (*SE* ou *FUT2*), de sorte que lorsque le gène *LE* est présent et le gène *SE* absent, le résultat du phénotype est Le (a+ b-). Lorsque les deux gènes sont présents, l'antigène Le^a (LE1) est converti en antigène Le^b (LE2), donnant le phénotype Le (a- b+). Les individus dont le gène *LE* est absent sont Le (a- b-).

Il y a également des interactions complexes avec le système ABO, étant donné la présence de la meme substance précurseur dans les deux systèmes. Les antigènes Lewis sont absents ou très peu exprimés sur les hématies des nouveau-nés.

Selon Mollison [1], la fréquence des phénotypes Lewis dans la population caucasöide est la suivante :

Phénotype	Fréquence
Le (a-b+)	75%
Le (a+b-)	20%
Le (a-b-)	5%
Le (a+b+)	très rare *

* plus fréquent en Asie de l'est, Asie de sud et dans la région du Pacifique et l'Asie australe.

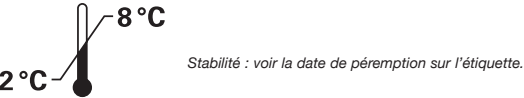
La carte-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" permet de tester 2 échantillons.

RÉACTIFS



Carte-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" avec 2 microtubes contenant des anticorps anti-Le^a monoclonaux (lignées cellulaires P3N20V3 + LM112/161) et 2 microtubes contenant des anticorps anti-Le^b monoclonaux (lignée cellulaire LM129/181 [LB1]) inclus dans le gel. Les microtubes ctl sont les contrôles négatifs. Conservateur : < 0,1% NaN₃.

Attention : Tout réactif doit être considéré comme potentiellement infectieux.



RÉACTIFS SUPPLÉMENTAIRES NÉCESSAIRES

- ID-Diluent 1 : solution de broméline modifiée pour suspensions d'hématies.

(voir mode d'emploi correspondant)

MATÉRIAUX SUPPLÉMENTAIRES NÉCESSAIRES

- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Tips (cônes pour pipette)
- Tubes pour suspensions
- ID-Table de travail
- ID-Centrifuge 6, 12, ou 24

ÉCHANTILLONS

Afin d'obtenir des résultats fiables, la détermination devrait se faire sur du matériel fraîchement prélevé ou conforme aux exigences du laboratoire auquel la demande d'analyses est adressée. L'échantillon devrait être prélevé de préférence sur anticoagulant citrate, EDTA ou CPD-A. Du sang prélevé sans anticoagulant (natif) peut également être utilisé.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON DE SANG

Préparer une suspension d'hématies du patient à 5% en ID-Diluent 1, comme suit :
Ramener le diluant à température ambiante avant utilisation.

1. Distribuer 0,5 ml d'ID-Diluent 1 dans un tube propre.
2. Ajouter 50 µl de sang total ou 25 µl de culot d'hématies, mélanger doucement.
3. Incuber la suspension d'hématies 10 minutes à température ambiante (18–25 °C).

La suspension d'hématies est à utiliser dans les 15 minutes qui suivent l'incubation.

CONTRÔLES

Des échantillons positifs et négatifs connus devront être inclus en concordance avec les réglementations régissant l'assurance qualité.

MÉTHODE

Ne pas utiliser les cartes-ID présentant des signes de dessèchement, des bulles d'air dans le gel, un système de fermeture endommagé, des gouttelettes de gel ou de surnageant sur les parois supérieures des microtubes ou sur la face interne de la languette d'aluminium.
Ramener les cartes-ID à température ambiante avant utilisation.

1. Identifier la carte-ID avec le numéro d'enregistrement unique du patient ou donneur/toutes identifications pertinentes.
2. Décoller la languette d'aluminium des microtubes nécessaires en tenant la carte-ID en position verticale.
3. Distribuer 10 ou 12,5 µl de la suspension d'hématies du patient au microtube approprié de la carte-ID.
4. Centrifuger les cartes-ID 10 minutes dans l'ID-Centrifuge.
5. Lire et noter les réactions.



DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

Français B006041 02.13

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

A) Principe (2)
Positif : les hématies agglutinées forment une ligne rouge à la surface du gel ou dispersées dans le gel.
Négatif : Sédimentation complète des hématies au fond du microtube.

B) Réactions pour la détermination des antigènes Le^a et Le^b

- Une réaction positive de + à ++++ indique la présence de l'antigène correspondant.
- Une réaction négative indique l'absence de l'antigène correspondant.

REMARQUES

1. Avant de procéder à une recherche d'antigène, s'assurer que les hématies à tester sont dépourvues d'autoanticorps réagissant en technique enzymatique.
2. La centrifugation répétée des cartes-ID n'affecte pas la performance du produit.
3. Le contrôle négatif doit toujours montrer une réaction négative. Si le contrôle négatif est positif, laver d'abord les hématies en solution saline isotonique chaude ou en ID-Diluent 2 avant de préparer la suspension d'hématies. Ensuite renouveler le contrôle négatif comme ci-dessus. Si le contrôle négatif est devenu négatif, procéder à la réalisation du test à l'antigène. Si le contrôle négatif reste positif des investigations supplémentaires selon les techniques recommandées sont nécessaires, avant de procéder au test d'antigènes.

PERFORMANCES

- Spécificité/Sensibilité
Les études de performance ont été réalisées avec les réactifs DiaClon Anti-Le^a et DiaClon Anti-Le^b. Les résultats obtenus montrent que les performances des réactifs sont conformes au champ d'application et comparables aux autres produits approuvés.

- Reproductibilité
Les reproductibilités intra-essai (répétabilité) et inter-essai des réactifs DiaClon Anti-Le^a et DiaClon Anti-Le^b ont été évaluées en interne. Aucune réaction faussement positive ou faussement négative n'a été observée. Les différences de forces de réactions des échantillons positifs sont inférieures à une force.

LIMITES

- a) Les cartes-ID présentant des bulles d'air dans le gel ou des goutelettes dans la partie supérieure des microtubes ou sur la languette métallique doivent être centrifugées avant utilisation.
- b) Des contaminations, bactériennes ou autres, du matériel utilisé peuvent provoquer des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.
- c) Des résidus de fibrine dans la suspension d'hématies peuvent emprisonner quelques cellules non agglutinées, formant ainsi une fine ligne rose à la surface du gel, alors que la plupart des hématies sont dans le fond du microtube après centrifugation.
- d) L'observation stricte des méthodes et l'emploi de l'équipement recommandé sont essentiels. L'équipement doit être régulièrement contrôlé selon les procédures des BPL.
- e) L'utilisation de diluants autres que l'ID-Diluent 1 peut modifier les résultats.
- f) Des suspensions d'hématies trop concentrées ou trop diluées peuvent provoquer des résultats aberrants.
- g) L'antigène Lewis peut disparaître au cours de certaines maladies. L'antigène Lewis est souvent diminué durant la grossesse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mollison, P.L., Engelfriet, C.P. and Contreras, M. : Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed 1997 ; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
2. Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al. : The gel test ; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990 ; 30 : 109-113.

PRODUITS

Carte-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" 1 x 12 REF 006041

Ces produits sont garantis quant à leurs propriétés et qualités stipulées sur l'étiquette et dans le mode opératoire. Le fabricant décline toute responsabilité pour les cas où ces produits seraient employés ou vendus à d'autres usages.

Les modifications apportées à la version 12.12 sont colorées en gris.

DiaMed GmbH
Pra Rond 23
1785 Cressier FR
Suisse



DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

English B006041 02.13

INTERPRETATION OF THE RESULTS

A) Principle [2]
Positive: Agglutinated cells forming a red line on the surface of the gel or agglutinates dispersed in the gel.
Negative: Compact button of cells on the bottom of the microtube.

B) Reactions for the determination of the antigens Le^a and Le^b

- A positive reactions of + to ++++ indicate the presence of the corresponding antigen.
- A negative reaction indicates the absence of the corresponding antigen.

REMARKS

1. Prior to testing for the presence of antigens, it must be assured that the red cells are free of enzyme reactive autoantibodies.
2. Repeated centrifugation of the ID-Cards does not affect the performance of the product.
3. The negative control must always show a negative reaction. If the negative control is positive, wash the red cells first in warm isotonic saline solution or ID-Diluent 2, before preparing the red cell suspension. Then repeat the negative control test. If the negative control is negative, proceed to the required antigen test. If the negative control remains positive, further investigations following recommended techniques should be undertaken to ascertain the reason, before valid antigen typing can be assured.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- Specificity/sensitivity
Performance evaluation studies have been realized with DiaClon Anti-Le^a and DiaClon Anti-Le^b. Results obtained showed that performance characteristics of the reagent are in conformity with the application field and comparable to other approved products.

- Reproducibility
Intraassay reproducibility (repeatability) and inter-assay reproducibility of the DiaClon Anti-Le^a and DiaClon Anti-Le^b have been evaluated internally. Neither false positive nor false negative results were observed. Differences between reaction strenghts in positive samples were less than one reaction strength.

LIMITATIONS

- a) ID-Cards which show air bubbles in the gel or drops in the upper part of the microtubes and/or the seal, must be centrifuged before use.
- b) Bacterial or other contamination of materials used can cause false positive or false negative results.
- c) Fibrin residues in the red cell suspension may trap non-agglutinated cells presenting a fine pink line on top of the gel while most of the cells are on the bottom of the microtube after centrifugation.
- d) Strict adherence to the procedures and recommended equipment is essential. The equipment should be checked regularly according to GLP procedures.
- e) Use of suspension solutions other than ID-Diluent 1 may modify the reactions.
- f) Too heavy or too weak red cell suspensions can cause aberrant results.
- g) Lewis antigens may be lost as result of disease. Lewis antigens are often greatly reduced during pregnancy.

BIBLIOGRAPHY

1. Mollison, P.L., Engelfriet, C.P. and Contreras, M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
2. Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.

PRODUCTS

ID-Card "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" 1 x 12 REF 006041

These products are guaranteed to perform as described on the label and in the instruction sheet. The manufacturer declines all responsibility arising out of the use or sale of these products in any way or for any purpose other than those described therein.

Changes to the version 12.12 are shaded gray.

DiaMed GmbH
Pra Rond 23
1785 Cressier FR
Switzerland



DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

Deutsch B006041 02.13

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

A) Prinzip [2]
Positiv: Agglutinierte Erythrozyten bilden eine rote Linie auf dem Gel oder sind im Gel verteilt.
Negativ: Kompaktes Erythrozytensediment am Boden des Mikroröhrchens.

B) Reaktionen für die Identifizierung der Antigene Le^a und Le^b

- Eine positive Reaktion von + bis ++++ zeigt das Vorliegen des entsprechenden Antigens an.
- Eine negative Reaktion zeigt die Abwesenheit des entsprechenden Antigens an.

ANMERKUNGEN

1. Vor dem Testen der Antigene ist sicherzustellen, dass die Erythrozyten keine mit Enzymen reagierenden Autoantikörper enthalten.
2. Wiederholtes Zentrifugieren der ID-Karten hat keinen Einfluss auf die Leistung des Produktes.
3. Die negative Kontrolle muss immer ein negative Reaktion aufweisen. Ist die negative Kontrolle positiv, die Erythrozyten vor der Herstellung der Erythrozytensuspension mit warmer isotonischer Kochsalzlösung oder ID-Diluent 2 waschen. Anschliessend den negativen Kontrolltest wiederholen. Ist die negative Kontrolle negativ, ist der entsprechende Antigentest verwertbar. Bleibt die negative Kontrolle positiv, dürfen die positiven Reaktionen des Antigentests nicht als positiv für das Vorliegen des Antigens interpretiert werden, und weitere Untersuchungen gemäss empfohlenen Techniken sind zu empfehlen.

LEISTUNGSMERKMALE

- Spezifität/Sensitivität
Die Auswertung der Leistungsmerkmale wurde mit DiaClon Anti-Le^a und DiaClon Anti-Le^b durchgeführt. Die Resultate zeigen, dass die Leistungsmerkmale den Reagenzien gemäss dem Anwendungsbereich konform sind und mit anderen genehmigten Produkten vergleichbar sind.

- Reproduzierbarkeit
Die Reproduzierbarkeit innerhalb des Assays (Wiederholbarkeit) und die Reproduzierbarkeit der DiaClon Anti-Le^a und DiaClon Anti-Le^b wurden intern durchgeführt. Es wurden weder falsch positive noch falsch negative Ergebnisse beobachtet. Die Unterschiede zwischen den Reaktionsstärken bei den positiven Reaktionen sind weniger als eine Reaktionsstufe.

EINSCHRÄNKUNGEN

- a) ID-Karten mit Luftblasen im Gel oder Tropfen im oberen Bereich der Mikrokammern und/oder Versiegelung müssen vor Gebrauch zentrifugiert werden.
- b) Bakterielle oder andere Kontaminationen des verwendeten Materials können falsch positive oder falsch negative Ergebnisse verursachen.
- c) Fibrinreste in der Erythrozytensuspension können nicht-agglutinierte Erythrozyten verklben, die sich als feine rosa Linie auf der Geloberfläche darstellen, während die meisten Erythrozyten nach Zentrifugation am Boden der Mikroröhrchen ein kompaktes Sediment bilden.
- d) Striktes Befolgen der Anleitungen und Verwendung des erforderlichen Arbeitsmaterials sind unerlässlich. Das Arbeitsmaterial sollte regelmässig entsprechend der GLP - Richtlinien überprüft werden.
- e) Der Gebrauch anderer Lösungen als ID-Diluent 1 für die Erythrozytensuspensionen kann die Reaktionen beeinflussen.
- f) Zu starke oder zu schwache Erythrozytensuspensionen können abnormale Reaktionen hervorrufen.
- g) Das Lewis Antigen kann bei bestimmten Erkrankungen verloren gehen. Auch in der Schwangerschaft wird das Lewis Antigen öfters unterdrückt.

LITERATUR

1. Mollison, P.L., Engelfriet, C.P. and Contreras, M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
2. Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.

PRODUKTE

ID-Karte "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" 1 x 12 REF 006041

Für diese Produkte wird nur Garantie übernommen, wenn sie gemäss den Angaben auf dem Etikett und der Anwendungsvorschrift verwendet werden. Jegliche Verantwortung wird ausdrücklich abgelehnt, wenn das Präparat für andere Zwecke gebraucht oder verkauft wird.

Änderungen zu der Version 12.12 sind grau gekennzeichnet.

DiaMed GmbH
Pra Rond 23
1785 Cressier FR
Schweiz



DiaClon Anti-Le^a/Le^b

ID-Card

Italiano	B006041	02.13
Le^a, Le^b, ctl/Le^a, Le^b, ctl monoclonale Determinazione degli antigeni Lewis		
Identificazione prodotto: 51241		

INTRODUZIONE

Nel sistema Lewis (ISBT numero 007) gli antigeni non rappresentano una parte integrante della membrana, ma sono invece assorbiti sulla superficie degli eritrociti dal plasma.

Il gene Lewis (*LE* o *FUT3*) interagisce con il gene secretore (*SE* o *FUT2*). Se è presente il gene *LE*, ma è assente il gene *SE*, il fenotipo risultante è Le (a+b-). Se sono presenti entrambi i geni, l'antigene Le^a (LE1) è convertito nell'antigene Le^b (LE2), dando origine al fenotipo Le (a-b+). I soggetti privi del gene *LE* sono Le (a-b-).

Esiste inoltre una complessa interazione con il sistema ABO per effetto della comune sostanza precursore. Negli eritrociti dei neonati gli antigeni Lewis sono assenti o presentano solo una debole espressione.

Secondo Mollison [1], il fenotipo Lewis è presente con le seguenti frequenze nella popolazione di razza caucasica:

Fenotipo	Frequenza
Le (a-b+)	75%
Le (a+b-)	20%
Le (a-b-)	5%
Le (a+b+)	 molto raro *

* più comune nell'Asia orientale, nell'Asia sudorientale, nella regione del Pacifico e dell'Asia australe.

La scheda-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" permette di analizzare 2 campioni.

REAGENTI



La scheda-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" contiene 2 microprovette con anti-Le^a monoclonale (linee cellulari P3N20V3 + LM112/161) e 2 microprovette con anti-Le^b monoclonale (linea cellulare LM129/181 [LB1]) nella matrice del gel. Le microprovette ctl sono i controlli negativi. Conservante: < 0,1% NaN₃.

Attenzione: Tutti i reagenti devono essere considerati potenzialmente infettivi.



ALTRI REAGENTI OCCORRENTI

- ID-Diluent 1: soluzione modificata di bromelina per la preparazione di sospensioni di eritrociti.

(consultare la relativa scheda tecnica)

ALTRI MATERIALI OCCORRENTI

- Dispensatore-ID
- Pipettatore-ID
- Puntali-ID (puntali per pipettatore)
- Provette per sospensione
- Stazione di lavoro-ID
- Centrifuga-ID 6, 12 o 24

CAMPIONI

Per ottenere risultati attendibili, si consiglia di eseguire la determinazione su un campione fresco o conforme alle procedure del laboratorio per i criteri di accettazione dei campioni. I campioni devono essere prelevati preferibilmente in citrato, EDTA o CPD-A. Si possono comunque usare anche campioni prelevati in provette normali (senza anticoagulante).

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Preparare una sospensione di eritrociti al 5% in diluente "ID-Diluent 1" nel modo seguente:
Portare il diluente a temperatura ambiente prima dell'uso.

- Pipettare 0,5 ml di diluente ID-Diluent 1 in una provetta pulita.
- Aggiungere 50 µl di sangue intero o 25 µl di emazie concentrate, mescolare delicatamente.
- Incubare la sospensione di eritrociti per 10 minuti a temperatura ambiente (18–25 °C).

Utilizzare entro 15 minuti dall'incubazione.

CONTROLLI

Si consiglia di includere sempre controlli noti positivi e negativi in accordo con le direttive in vigore per la garanzia di qualità.

PROCEDURA

Non utilizzare schede-ID che mostrano segni di disidratazione, bolle, pellicole danneggiate, gocce di gel o surnatante nella parte superiore delle microprovette o sotto la copertura di alluminio.
Portare le schede-ID a temperatura ambiente prima dell'uso.

- Identificare in modo appropriato la scheda-ID con il corrispondente numero e/o i dati relativi al paziente o al donatore.
- Rimuovere la copertura di alluminio dalle microprovette da utilizzare, tenendo la scheda-ID in posizione verticale.
- Aggiungere 10 o 12,5 µl di sospensione di eritrociti nella microprovetta corrispondente.
- Centrifugare le schede-ID per 10 minuti nella centrifuga-ID.
- Leggere e annotare le reazioni.

DiaClon Anti-Le^a/Le^b

ID-Card

Español	B006041	02.13
Le^a, Le^b, ctl/Le^a, Le^b, ctl monoclonal Determinación de los antígenos Lewis		
Identificación del producto: 51241		

INTRODUCCIÓN

En el sistema Lewis (ISBT: número 007), los antígenos son adsorbidos desde el plasma sobre la superficie de los eritrocitos, en lugar de ser parte inherente de la membrana.

El gen Lewis (*LE* o *FUT3*) interactúa con el gen secretor (*SE* o *FUT2*). Cuando el gen *LE* está presente y el gen *SE* está ausente, el fenotipo resultante es Le (a+b-). Cuando están presentes ambos genes, el antígeno Le^a (LE1) es convertido a antígeno Le^b (LE2), dando lugar al fenotipo Le (a-b+). Los individuos que carecen del gen *LE* se clasifican como Le (a-b-).

También existe una compleja interacción con el sistema ABO por la existencia de una misma sustancia precursora. Los antígenos Lewis están ausentes o muy poco expresados en los eritrocitos de los recién nacidos.

Según Mollison [1], las frecuencias de los fenotipos Lewis en la población caucásica son las siguientes:

Fenotipo	Frecuencia
Le (a-b+)	75%
Le (a+b-)	20%
Le (a-b-)	5%
Le (a+b+)	 muy raro *

* más común en el este y sudeste asiáticos, la región del Pacífico y Oceanía.

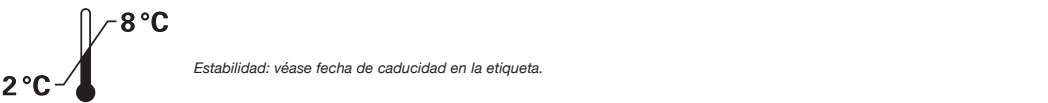
La tarjeta ID-Card "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" permite analizar 2 muestras.

REACTIVOS



Tarjeta ID-Card "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" con 2 microtubos que contienen anti-Le^a monoclonal (líneas celulares P3N20V3 + LM112/161) y 2 microtubos que contienen anti-Le^b monoclonal (línea celular LM129/181 [LB1]) en el interior de la matriz de gel. Los microtubos marcados como "ctl" están los controles negativos. Conservante: < 0,1% NaN₃.

Precaución: Todos los reactivos deben tratarse como potencialmente infecciosos.



REACTIVOS ADICIONALES NECESARIOS

- ID-Diluent 1: solución de bromelina modificada para suspensión de eritrocitos.

(véase el prospecto correspondiente)

OTROS MATERIALES NECESARIOS

- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Tips (puntas para pipeta)
- Tubos de suspensión
- ID-Working table (superficie de trabajo)
- ID-Centrifuge (centrifuga) 6, 12 o 24

MUESTRAS

Para un resultado óptimo, la determinación debe realizarse con una muestra recién extraída, o cumpliendo la normativa local del laboratorio en cuanto a criterios de aceptabilidad de las muestras. Preferiblemente, las muestras de sangre deben recogerse utilizando citrato, EDTA o CPD-A como anticoagulante. También es posible utilizar muestras recogidas en tubos sin anticoagulante.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE

Prepare una suspensión de eritrocitos al 5% en ID-Diluent 1 del modo siguiente:
Deje que el diluyente alcance la temperatura ambiente antes de utilizarlo.

- Pipetee 0,5 ml de ID-Diluent 1 en un tubo limpio.
- Añada 50 µl de sangre completa o 25 µl de concentrado de eritrocitos y agite suavemente.
- Incube la suspensión de eritrocitos durante 10 minutos a temperatura ambiente (18–25 °C).

Utilice la suspensión de eritrocitos dentro en los 15 minutos siguientes a la incubación.

CONTROLES

Deben incluirse muestras positivas y negativas conocidas de acuerdo con las normas de garantía de calidad aplicables.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

No usar las tarjetas ID-Card que muestren signos de desecación, burbujas en el gel, sellado defectuoso, gotas de gel o de sobrenadante en la parte superior de los microtubos o en la superficie interior del aluminio de sellado.
Antes de usar dejar que las tarjetas ID-Card alcancen la temperatura ambiente.

- Identificar la tarjeta ID-Card con el número o nombre de identificación del donante o del paciente.
- Retirar la lámina de sellado sólo de los microtubo que se vayan a utilizar manteniendo la tarjeta ID-Card en posición vertical.
- Añada 10 ó 12,5 µl de la suspensión de eritrocitos al microtubo correspondiente.
- Centrifugue las tarjetas ID-Card durante 10 minutos en la ID-Centrifuge.
- Lea y registre los resultados.

DiaClon Anti-Le^a/Le^b

ID-Card

Português	B006041	02.13
Le^a, Le^b, ctl/Le^a, Le^b, ctl monoclonal Determinação dos antígenos Lewis		
Identificação do Produto: 51241		

INTRODUÇÃO

No sistema Lewis (ISBT, número 007), os antígenos do plasma são adsorvidos à superfície dos eritrócitos, em vez de fazerem parte integrante da membrana.

O gene Lewis (*LE* ou *FUT3*) interage com o gene secretor (*SE* ou *FUT2*). Quando o gene *LE* se encontra presente e o gene *SE* ausente, o fenótipo resultante é Le (a+b-). Quando ambos os genes se encontram presentes, o antígeno Le^a (LE1) é convertido no antígeno Le^b (LE2), dando origem ao fenótipo Le (a-b+). Os indivíduos que carecem do gene *LE* são agrupados como Le (a-b-).

Também ocorre uma interação complexa com o sistema ABO, devida à afinidade da substância precursora. Os antígenos Lewis estão ausentes ou têm fraca expressão nos eritrócitos do recém-nascido.

Segundo Mollison [1], a frequência do fenótipo Lewis na população caucasiana é:

Fenótipo	Frequência
Le (a-b+)	75%
Le (a+b-)	20%
Le (a-b-)	5%
Le (a+b+)	 muito rara *

* mais comum no leste asiático, sudeste asiático, região do Pacífico e Australásia.

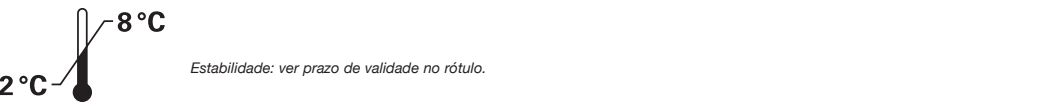
O Card-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" permite testar 2 amostras.

REAGENTES



Card-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" com 2 microtubos contendo anticorpos monoclonais anti-Le^a (clones P3N20V3 + LM112/161) e 2 microtubos contendo anticorpos monoclonais anti-Le^b (clone LM129/181 [LB1]) em suspensão no gel. Os microtubos ctl são os controles negativos. Conservante: < 0,1% NaN₃.

Atenção: Todos os reagentes devem ser tratados como potencialmente infecciosos.



REAGENTES ADICIONAIS NECESSÁRIOS

- ID-Diluent 1: solução de bromelina modificada para suspensão de eritrócitos.

(ver folheto informativo correspondente)

OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS

- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Tips (pontas para pipetador)
- Tubos de Suspensão
- ID-Working table
- ID-Centrifuge 6, 12 ou 24

AMOSTRAS

Para obtenção dos resultados ideais, a determinação deve ser realizada numa amostra recentemente colhida, ou em conformidade com os critérios de aceitação do procedimento laboratorial local. As amostras de sangue devem, de preferência, ser colhidas em anticoagulante citrato, EDTA ou CPD-A. Também é possível utilizar amostras colhidas em tubos limpos (sem anticoagulante).

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE SANGUE

Prepare uma suspensão de eritrócitos a 5% em ID-Diluent 1 do seguinte modo:
Antes de utilizar, deixe o diluente atingir a temperatura ambiente.

- Dispense 0,5 ml de ID-Diluent 1 num tubo limpo.
- Adicione 50 µl de sangue total ou 25 µl de concentrado de eritrócitos, misture suavemente.
- Incube a suspensão de eritrócitos durante 10 minutos à temperatura ambiente (18–25 °C).

Utilize até 15 minutos após incubação.

CONTROLOS

Amostras positivas e negativas conhecidas devem ser incluídas em conformidade com as directrizes relevantes para controlo da qualidade.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Não usar Cards-ID que tenham sinais de secagem, bolhas, selos danificados, gotas de gel ou sobrenadante na parte superior dos microtubos ou na parte de baixo da película de alumínio.
Deixar os cards-ID atingir a temperatura ambiente antes de usar.

- Identifique o Card-ID com o número ou dado únicos do doente ou dador, conforme os casos.
- Retirar a película de alumínio de todos os microtubos necessários segurando o Card-ID na posição vertical.
- Adicione 10 ou 12,5 µl de suspensão de eritrócitos ao microtubo apropriado.
- Centrifugue os Cards-ID durante 10 minutos no ID-Centrifuge.
- Leia e anote os resultados.

DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

Português B006041 02.13

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A) Princípio [2]
Positivo: Eritrócitos aglutinados formando uma linha vermelha à superfície do gel ou aglutinados dispersos no gel.
Negativo: Botão compacto de eritrócitos no fundo do microtubo.

B) Reacções para a determinação dos antígenos Le^a e Le^b

- Uma reacção positiva de + a ++++ indica a presença do antígeno correspondente.
- Uma reacção negativa indica a ausência do antígeno correspondente.

OBSERVAÇÕES

- Antes de investigar a presença de antígenos, é necessário certificar-se de que os eritrócitos estão isentos de autoanticorpos que reajam a técnicas enzimáticas.
- A centrifugação repetida dos Cards-ID não afecta o desempenho do produto.
- O controlo negativo deve apresentar sempre uma reacção negativa. Se o controlo negativo for positivo, lave os eritrócitos primeiro em solução isotónica salina tépida ou em ID-Diluent 2, antes de preparar a suspensão de eritrócitos. Em seguida repita o teste de controlo negativo. No caso do controlo negativo ser negativo, faça o teste antígeno requerido. No caso do controlo negativo permanecer positivo, devem ser realizadas mais investigações segundo as técnicas recomendadas a fim de avaliar a razão para tal, antes de poder ser garantida uma tipagem válida do antígeno.

CARACTERISTICAS DE DESEMPENHO

- Especificidade/Sensibilidade
Estudos de avaliação do desempenho foram realizados com DiaClon Anti-Le^a e DiaClon Anti-Le^b. Os resultados obtidos revelaram que as características de desempenho do reagente estão em conformidade com o campo de aplicação e são comparáveis a outros produtos aprovados.

- Reprodutibilidade
Internamente, foram avaliadas a reprodutibilidade intra-ensaio (repetibilidade) e a reprodutibilidade interensaio de DiaClon Anti-Le^a e DiaClon Anti-Le^b. Não foram observados resultados falsamente positivos nem falsamente negativos. Diferenças entre potencias de reacção em amostras positivas foram inferiores a uma potencia de reacção.

LIMITAÇÕES

- Os Cards-ID que tenham bolhas de ar no gel ou gotas na parte superior dos microtubos e/ou no segmento de alumínio devem ser centrifugados antes de usar.
- A contaminação, bacteriana ou outra, dos materiais utilizados pode originar resultados falsamente positivos ou falsamente negativos.
- Resíduos de fibrinas na suspensão de eritrócitos podem reter eritrócitos não aglutinados, formando assim uma linha cor de rosa fina à superfície do gel, ao passo que a maior parte dos eritrócitos migra para o fundo do microtubo após centrifugação.
- O cumprimento estrito dos procedimentos e a utilização do equipamento recomendado são essenciais. O equipamento deve ser regularmente verificado em conformidade com os procedimentos de BPL.
- a) A utilização de soluções de suspensão diferentes de ID-Diluent 1 pode alterar as reacções.
- f) Suspensões de eritrócitos demasiado concentradas ou demasiado diluídas podem provocar resultados errados.
- g) Os antígenos Lewis podem perder-se em resultado de doença. Os antígenos Lewis são muitas vezes largamente reduzidos durante a gravidez.

BIBLIOGRAFIA

- Mollison, P.L., Engelfriet, C.P. and Contreras, M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.

PRODUTOS

Card-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" 1 x 12 REF 006041

Estes produtos são garantidos quanto ao seu comportamento funcional, tal como descrito no rótulo e no folheto informativo. O fabricante declina toda a responsabilidade decorrente da utilização ou venda destes produtos para fins diferentes dos aí descritos.

DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

Español B006041 02.13

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Principio [2]
Positivo: Los eritrocitos aglutinados forman una línea roja sobre la superficie del gel o aparecen dispersos en el gel.
Negativo: Sedimento compacto de eritrocitos en el fondo del microtubo.

B) Reaccion e para la determinación de los antígenos Le^a y Le^b

- Una reacción positiva (+ a ++++) indica la presencia del correspondiente antígeno.
- Una reacción negativa indica la ausencia del correspondiente antígeno.

OBSERVACIONES

- Antes de determinar la presencia de antígenos, hay que asegurarse de que los eritrocitos no presentan autoanticuerpos reactivos a enzimas.
- El centrifugado repetido de las tarjetas ID-Card no afecta al comportamiento del producto.
- El control negativo siempre debe mostrar una reacción negativa. Si el control negativo da positivo, lave inicialmente los eritrocitos en solución salina isotónica templada o ID-Diluent 2 antes de preparar la suspensión de eritrocitos. A continuación, repita el análisis del control negativo. Si el control negativo da resultado negativo, puede determinarse el fenotipo antígeno con el ID-perfil I y/o II. Si el control negativo sigue dando positivo, deben realizarse estudios adicionales siguiendo técnicas recomendadas para determinar el motivo y poder garantizar una determinación antigénica válida.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

- Especificidad/sensibilidad
Se han realizado estudios de evaluación del rendimiento con DiaClon Anti-Le^a y DiaClon Anti-Le^b. Los resultados obtenidos han demostrado que las características de rendimiento del reactivo corresponden al campo de aplicación y que son comparables a las de otros productos aprobados.

- Reproducibilidad
La reproductibilidad intraanalítica (repetibilidad) e interanalítica de DiaClon Anti-Le^a y DiaClon Anti-Le^b se ha evaluado internamente. No se observaron resultados falsos positivos ni resultados falsos negativos. Las diferencias entre las intensidades de reacción en las muestras positivas fueron inferiores a una intensidad de reacción.

LIMITACIONES

- Las tarjetas ID-Card que muestren burbujas de aire en el gel o gotas en la parte superior de los microtubos y/o de la lámina de sellado, deben ser centrifugadas antes de usarlas.
- La contaminación bacteriana o de otro tipo de los materiales empleados, puede provocar reacciones falsamente positivas o falsamente negativas.
- Los restos de fibrina en la suspensión de eritrocitos pueden atrapar los hematies no aglutinados, de modo que aparezca una fina línea rosada en la parte superior del gel mientras que la mayoría de los eritrocitos se encuentran en el fondo del microtubo tras el centrifugado.
- Es esencial atenerse estrictamente a los procedimientos y equipos recomendados. El equipo debe comprobarse periódicamente según la normativa de prácticas correctas del laboratorio (GLP).
- e) El empleo de soluciones de suspensión distintas al ID-Diluent 1 puede modificar las reacciones.
- f) Las suspensiones de eritrocitos demasiado concentradas o demasiado diluidas pueden dar lugar a resultados aberrantes.
- g) Los antígenos Lewis pueden perderse como resultado de una enfermedad. Con frecuencia, los antígenos Lewis reducen su expresividad durante el embarazo.

BIBLIOGRAFÍA

- Mollison, P.L., Engelfriet, C.P. and Contreras, M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.

PRODUCTOS

Tarjeta ID-Card "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" 1 x 12 REF 006041

Se garantiza que estos productos se comportarán según lo descrito en la etiqueta y en la hoja de instrucciones. El fabricante declina toda responsabilidad en caso de que los productos se utilicen o vendan para cualquier otro uso diferente de los allí descritos.

Cambios en la versión 12.12 están sombreadas en gris.

DiaClon Anti-Le^a/Le^b ID-Card

Italiano B006041 02.13

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

A) Principio [2]
Positivo: Gli eritrociti agglutinati formano una linea rossa sul gel o sono distribuiti nel gel.
Negativo: Bottone compatto di eritrociti sul fondo della provetta.

B) Reazione per la determinazione degli antigeni Le^a e Le^b

- Una reazione positiva da + a ++++ indica la presenza dell'antigene corrispondente.
- Una reazione negativa indica l'assenza dell'antigene corrispondente.

NOTE

- Prima di effettuare le analisi per la presenza degli antigeni, assicurarsi che gli eritrociti siano privi di autoanticorpi reattivi agli enzimi.
- La centrifugazione ripetuta delle schede-ID non influisce sulle prestazioni del prodotto.
- Il controllo negativo deve dare sempre una reazione negativa. Se il controllo negativo è positivo, lavare gli eritrociti con soluzione fisiologica isotonica calda o con diluente ID-Diluent 2 prima di preparare la sospensione di emazie. Quindi ripetere il test di controllo negativo. Se il controllo negativo è negativo, procedere con il test per l'antigene richiesto. Se il controllo negativo rimane positivo, prima di poter assicurare la validità della tipizzazione per gli antigeni si devono effettuare ulteriori in dagini seguendo le tecniche raccomandate per accertarne il motivo.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

- Specificità/sensibilità
Sono stati condotti studi di valutazione delle prestazioni con DiaClon Anti-Le^a e DiaClon Anti-Le^b. I risultati ottenuti hanno mostrato che le caratteristiche delle prestazioni del reagente sono conformi con il campo di applicazione e confrontabili a quelle di altri prodotti approvati.

- Riproducibilità
La riproducibilità intra-dosaggio (ripetibilità) e la riproducibilità inter-dosaggio di DiaClon Anti-Le^a e DiaClon Anti-Le^b sono state valutate internamente. Non sono stati osservati risultati né falsi positivi né falsi negativi. Le differenze fra le intensità di reazione nei campioni positivi sono risultate inferiori ad una intensità di reazione.

LIMITAZIONI

- Le schede-ID che mostrano bolle d'aria nel gel o gocce nella parte superiore del micropozzetto e/o sul foglio di alluminio, devono essere centrifugate prima dell'uso.
- Le contaminazioni batteriche o di altro tipo del materiale utilizzato possono essere causa di risultati falsamente negativi o positivi.
- Eventuali residui di fibrina nella sospensione di eritrociti possono aderire alle emazie non agglutinate, e farle apparire come una sottile linea rosa sulla superficie del gel, mentre la maggior parte degli eritrociti dopo la centrifugazione forma un bottone compatto sul fondo della provetta.
- d) E' indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni e utilizzare esclusivamente materiali di lavoro indicati e verificare le procedure operative secondo gli standard GLP.
- e) L'impiego di soluzioni diverse dal diluente "ID-Diluent 1" per le sospensioni di eritrociti può influire sulle reazioni.
- f) Una sospensione di eritrociti troppo concentrato o troppo diluita può causare reazioni anomale.
- g) Gli antigeni Lewis possono essere persi in caso di malattia. Gli antigeni Lewis sono spesso notevolmente ridotti in gravidanza.

BIBLIOGAFIA

- Mollison, P.L., Engelfriet, C.P. and Contreras, M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.

PRODOTTI

Scheda-ID "DiaClon Anti-Le^a/Le^b" 1 x 12 REF 006041

Si garantiscono per questi prodotti le prestazioni descritte sull'etichetta e nel foglio di istruzioni. Il produttore declina ogni responsabilità derivante dall'uso improprio o dalla vendita di questi prodotti per scopi diversi da quelli qui descritti.

Le modifiche alla versione 12.12 sono evidenziate in grigio.