



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

**Anti-Kp<sup>a</sup> e Anti-Kp<sup>b</sup> Polyclonal:** Per tecniche dell'antiglobulina indiretta.

**RIEPILOGO**

Gli antigeni Kp<sup>a</sup> e Kp<sup>b</sup> furono segnalati, rispettivamente, nel 1957 e 1958. Gli antigeni del sistema Kell sono completamente sviluppati alla nascita. Anti-Kp<sup>a</sup> e Anti-Kp<sup>b</sup> sono risultati entrambi coinvolti in reazioni trasfusionali emolitiche e nella Malattia emolitica del neonato.

Anti-Kp <sup>a</sup>	Anti-Kp <sup>b</sup>	Fenotipo	Caucasici <sup>1</sup>	Afroamericani <sup>1</sup>
+	0	Kp(a+b-)	Raro	0%
+	+	Kp(a+b+)	2,3%	Raro
0	+	Kp(a-b+)	97,7%	100%
0	0	K <sub>0</sub>	Molto raro	Molto raro

**USO PREVISTO**

I reagenti per la determinazione del gruppo sanguigno sono destinati ad essere utilizzati per determinare qualitativamente la presenza o l'assenza dell'antigene Kp<sup>a</sup> (KEL3) o Kp<sup>b</sup> (KEL4) 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 per l'antigene Kp<sup>a</sup> o Kp<sup>b</sup> presente sugli eritrociti umani e causano l'agglutinazione (formazione di aggregati) indiretta degli eritrociti umani che trasportano l'antigene Kell corrispondente nella fase antiglobulinica dei test. L'assenza di agglutinazione (mancata formazione di aggregati) in genere indica l'assenza dell'antigene Kell corrispondente (vedere **Limitazioni**).

**REAGENTI**

I reagenti Lorne Human Anti-Kell per la determinazione del gruppo sanguigno vengono preparati a partire da siero umano diluito in una soluzione di cloruro di sodio contenente potenziatori macromolecolari (1,9 g%) e albumina bovina (4,4 g%). 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 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**.

**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 tamponi 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.
7. Il plasma da cui viene prodotto tale reagente non è più delipidato, pertanto è normale che il reagente abbia un aspetto torbido.
8. 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.

9. I materiali utilizzati per la realizzazione dei reagenti sono stati testati dal produttore e sono risultati negativi agli anticorpi HIV 1+2 e HCV e ad HBsAg mediante test microbiologici approvati.
10. 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 dei reagenti e sulla decontaminazione di un sito di fuoriuscita, vedere le **Schede di dati di sicurezza**, disponibili su richiesta.

**CONTROLLI E CONSIGLI**

1. Si raccomanda di analizzare un controllo positivo (idealmente cellule eterozigoti) 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.
2. Le tecniche dell'antiglobulina possono essere considerate valide solo se tutti i test negativi reagiscono positivamente con gli eritrociti sensibilizzati con IgG.
3. I reagenti contengono potenziatori macromolecolari che possono causare reazioni false positive con le cellule sensibilizzate con IgG. Si raccomanda di testare le cellule del paziente con il plasma del paziente per analizzare eventuali reazioni false positive.
4. 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.
5. Nella **Tecnica in provetta** 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.

**REAGENTI E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

**Tecnica in provetta**

- Antiglobulina umana, ovvero Lorne AHG Elite (Cat # 435010 o 415010) o Anti-IgG umana, ovvero Lorne Anti-Human IgG (Cat # 402010 o 401010).
- Sistema di lavaggio per cellule Coombs.
- Provette in vetro (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Soluzione di PBS (pH 6.8-7.2) o soluzione salina isotonica (pH 6.5-7.5).
- Eritrociti sensibilizzati con IgG, ovvero Lorne Coombs Control Cells (Cat # 970010).
- Eritrociti di controllo positivo (idealmente eterozigoti) e negativo.
- Bagno d'acqua o incubatore di calore a secco equilibrato a 37°C ± 2°C.

**Tecnica di microtipizzazione Bio-Rad-ID**

- ID-Card Bio-Rad (LISS/Coombs o Coombs Anti-IgG).
- ID-Centrifuge Bio-Rad.
- ID-CellStab o ID-Diluent 2 Bio-Rad.
- Bio-Rad ID-Incubator equilibrato a 37°C ± 2°C.

**Tecnica di tipizzazione Ortho BioVue**

- Cassette Ortho BioVue System (AHG polispecifiche o AHG Anti-IgG).
- Centrifuga Ortho BioVue System.
- Blocco di calore Ortho BioVue System equilibrato a 37°C ± 2°C.
- Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.

**Tutte le tecniche**

- Pipette volumetriche.

**TECNICHE RACCOMANDATE**

**A. Tecnica dell'antiglobulina indiretta (IAT)**

1. Preparare una sospensione di eritrociti al 2-3% in PBS o soluzione salina isotonica.
2. Inserire in una provetta etichettata: 1 volume di reagente Lorne e 1 volume di sospensione di eritrociti.
3. Miscelare accuratamente e incubare a 37 °C per 15 minuti.
4. Lavare gli eritrociti 4 volte con PBS o soluzione salina isotonica, avendo cura di travasare la soluzione salina tra un lavaggio e l'altro e di risospendere ciascun sedimento eritrocitario dopo ogni lavaggio. Travasare completamente la soluzione salina dopo l'ultimo lavaggio.
5. Aggiungere 2 volumi di antiglobulina umana o di anti-IgG a ciascun sedimento essiccato.

- 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
- Confermare la validità di tutte le reazioni negative con eritrociti sensibilizzati con IgG.

#### B. Tecnica di microtipizzazione Bio-Rad-ID

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero necessario di microprovette sulle ID-card LISS/Coombs o Coombs Anti-IgG.
- Inserire nella microprovetta appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 25µl di reagente Lorne.
- Incubare la/le ID-Card per 15 minuti a 37°C.
- Centrifugare la/le ID-Card in una centrifuga Bio-Rad-ID.
- Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

#### C. Tecnica di tipizzazione Ortho BioVue

- Preparare una sospensione di eritrociti allo 0,8% in Diluente globuli rossi 0,8% Ortho.
- Rimuovere la linguetta di alluminio dal numero necessario di camere di reazione sulle cassette AHG polispecifiche oppure AHG Anti-IgG.
- Inserire nella camera di reazione appropriata: 50µl di sospensione di eritrociti e 40µl di reagente Lorne.
- Incubare la/le cassetta/e per 15 minuti a 37°C.
- Centrifugare la/le cassetta/e per 5 minuti in una Centrifuga Ortho BioVue System.
- Procedere alla lettura macroscopica dell'agglutinazione.

#### 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 Kell appropriato 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 Kell appropriato sugli eritrociti.

#### STABILITÀ DELLE REAZIONI

- Le fasi di lavaggio devono essere completate senza interruzioni e i test devono essere centrifugati e letti immediatamente dopo l'aggiunta del reagente. Eventuali ritardi possono dare origine alla dissociazione dei complessi antigene-anticorpo con conseguenti risultati falsi negativi o deboli positivi.
- Occorre prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati dei test effettuati a temperature diverse da quelle **raccomandate**.

#### LIMITAZIONI

- Gli eritrociti con DAT positivo dovuto a un rivestimento di IgG non possono essere tipizzati mediante la **Tecnica dell'antiglobulina indiretta**.
- Gli anticorpi diretti verso antigeni a bassa frequenza possono manifestarsi come contaminanti inattesi negli antisieri per la determinazione del gruppo sanguigno. Inoltre, alcuni antigeni (per esempio Bg, Sd<sup>a</sup>) possono presentarsi in uno stato alterato sugli eritrociti. Questi fenomeni possono dare origine a rare reazioni false positive, che possono verificarsi con più di un lotto di una determinata specificità.
- Non è possibile affermare l'assenza di tutti gli anticorpi contaminanti, in quanto gli eritrociti che trasportano antigeni a bassa frequenza o antigeni alterati non sono sempre disponibili per i test.
- Al contrario, l'espressione inibita o ridotta di alcuni antigeni del gruppo sanguigno può dare luogo a reazioni false negative, pertanto occorre sempre prestare attenzione quando si assegnano i genotipi in base ai risultati dei test.
- 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 questi reagenti 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").
- È stata esclusa la presenza di anticorpi contaminanti contro antigeni con un'incidenza dell'1% o superiore all'interno della popolazione casuale sia in test che impiegano eritrociti antigene-negativi appropriati, sia in test che impiegano i reagenti precedentemente assorbiti per rimuovere le specificità interferenti.
- Non è possibile escludere gli anticorpi anti Xg<sup>a</sup>, Do<sup>a</sup>, Yt<sup>a</sup>, Co<sup>b</sup>, Wr<sup>a</sup>, Bg<sup>a</sup> e V<sup>w</sup> nei test di specificità di routine, pertanto la loro individuazione dipenderà dalla disponibilità di cellule per test appropriate. Lo stesso vale anche per Yt<sup>b</sup>, M<sup>a</sup> e V<sup>w</sup> e altri antigeni a bassa frequenza, i quali non possono essere esclusi nei test di specificità di routine e la cui individuazione dipenderà dalla disponibilità di cellule per test appropriate.

- 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'uso<sup>5</sup>.

#### BIBLIOGRAFIA

- Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, New York 2007; Page 186.
- Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> Edition. Montgomery Scientific, Miami 1985; Chapter 6.
- AABB Technical Manual, 16<sup>th</sup> edition, AABB 2008.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6<sup>th</sup> 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-Kp <sup>a</sup> Polyclonal	2 ml	321002	40
	1000 ml	321000*	20.000
Anti-Kp <sup>b</sup> Polyclonal	2 ml	322002	40
	1000 ml	322000*	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, 2<sup>nd</sup> Flr.,  
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta