

REACTIVOS MONOCLONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS
INSTRUCCIONES DE USO

Anti-D clon 1 Y CLON 2 monoclonal: Para técnicas en tubo, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, microplaca y portaobjetos.

RESUMEN

El sistema de grupos sanguíneos Rh se descubrió en 1940. El antígeno D, clínicamente, es el más significativo de los antígenos sanguíneos que no son del sistema ABO y se lo ha implicado en causar reacciones transfusionales hemolíticas y enfermedad hemolítica del recién nacido.

Anti-D	Fenotipo	% de caucásicos ³	% de afroamericanos ³
+	RhD +vo	83	92
0	RhD -vo	17	8

USO PREVISTO

Los reactivos Anti-D son reactivos utilizados para la determinación de grupos sanguíneos que tienen la finalidad de comprobar de manera cualitativa la presencia o ausencia del antígeno Rh D en los hematíes de donantes de sangre o pacientes que requieren una transfusión de sangre cuando se evalúan de conformidad con las técnicas recomendadas establecidas en estas instrucciones de uso.

PRINCIPIO

Los reactivos contienen anticuerpos contra el antígeno D presente en los hematíes humanos y provocan una aglutinación (agrupación) directa de los hematíes humanos que portan el antígeno D. La ausencia de aglutinación (ausencia de agrupación) indica en general la ausencia del antígeno D en los hematíes humanos (ver **Limitaciones**).

REACTIVOS

Los reactivos monoclonales IgM anti-D clon 1 y clon 2 para la determinación de grupos sanguíneos de Lorne son reactivos escasamente proteicos que contienen un anticuerpo IgM monoclonal diluido con cloruro sódico (0,9 g %), albúmina bovina (2,0 g %) y potenciadores macromoleculares (1,5 g %). Durante la tipificación de las muestras de pacientes, mediante las técnicas recomendadas, cada reactivo aglutinará directamente células Rh D positivas, incluida la mayoría de las variantes (*salvo D^v*) y una elevada proporción de fenotipos D débiles (D^u). Los reactivos no contienen ni están compuestos por sustancias CMR, ni por sustancias que alteren el funcionamiento del sistema endocrino, ni por sustancias que puedan provocar sensibilización o una reacción alérgica al usuario. Cada reactivo se suministra en la dilución óptima para su uso en las muestras de pacientes en todas las técnicas aquí recomendadas sin necesidad de diluciones o adiciones suplementarias. Para obtener información sobre el número de referencia del lote y la fecha de caducidad, consulte la **etiqueta del vial**.

Producto	Línea Celular/Clon
Anti-D clon 1	RUM-1
Anti-D clon 2	MS-201

EXPRESIÓN DEBILITADA DEL ANTÍGENO RhD

El término colectivo D^u es ampliamente utilizado para describir los hematíes que presentan una expresión del antígeno D inferior a la normal. El término D débil denota individuos con un número reducido de sitios de antígenos D completos por hematíe. El término D parcial denota individuos con epítomos del antígeno D ausentes. Las células DVI constituyen una categoría de antígeno D parcial en la que la mayoría de epítomos D están ausentes. Los reactivos clon 1 y clon 2 detectan la mayoría de los ejemplos de hematíes D débil y D parcial mediante aglutinación directa, pero no detecta las células DVI.

CONSERVACIÓN

Los viales de reactivo deben conservarse a 2-8 °C. El almacenamiento prolongado a temperaturas fuera de este rango puede acelerar la pérdida de reactividad. Este reactivo se ha sometido a estudios de estabilidad durante el traslado a 37 °C y -25 °C, según lo descrito en el documento BS EN ISO 23640:2015.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras pueden recogerse en anticoagulantes EDTA o como una muestra coagulada. Las muestras deben analizarse cuanto antes después de su recolección. Si el análisis va a retrasarse, la muestra debe conservarse a 2-8 °C. No deben analizarse las muestras que presenten una hemólisis macroscópica o contaminación microbiana. Las muestras de sangre que muestren indicios de lisis pueden dar lugar a resultados no fiables. Es preferible (aunque no imprescindible) lavar todas las muestras de sangre con PBS o solución salina isotónica antes de realizar el análisis.

PRECAUCIONES

- Los reactivos son solo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Si el vial del reactivo está roto o agrietado, descartar inmediatamente su contenido.
- No utilizar reactivos caducados (ver la **etiqueta del vial**).
- No utilizar reactivos que presenten precipitados.
- La manipulación de los reactivos debe realizarse con la apropiada indumentaria de protección, tales como guantes desechables y bata de laboratorio.
- Los reactivos han sido filtrados a través de cápsulas de 0.2 µm para reducir la carga biológica, pero no se suministran esterilizados. Una vez abierto el vial, el contenido debe permanecer viable hasta la fecha de caducidad, siempre y

cuando no haya una marcada turbidez, lo que podría indicar un deterioro o contaminación del reactivo.

- Los reactivos contienen <0,1 % de azida sódica. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere y puede reaccionar con el cobre o plomo de las tuberías y formar azidas metálicas explosivas. Al eliminar el producto, hacerlo con abundante agua.
- Los materiales utilizados para producir los productos se probaron en origen y se determinó que son negativos para los anticuerpos contra el VIH 1 + 2 y el VHC y el HBSAg mediante el uso de pruebas microbiológicas aprobadas.
- Ningún método puede garantizar que los productos derivados de fuentes humanas o animales estén libres de agentes infecciosos. Se debe tener precaución en el uso y eliminación de viales y su contenido.

ELIMINACIÓN DEL REACTIVO Y CÓMO ACTUAR EN CASO DE DERRAME

Para obtener información sobre la eliminación del reactivo y la descontaminación del lugar del derrame, consulte las **Hojas de datos de seguridad de los materiales**, disponibles previa solicitud.

CONTROLES Y CONSEJOS

- Deben analizarse un control positivo (preferentemente células R1r) y un control negativo (preferentemente células rr) en paralelo con cada lote de análisis. Los ensayos deben considerarse no válidos si los controles no muestran los resultados esperados.
- Durante el tipado de hematíes de un paciente con diagnóstico de una enfermedad que provoca que los hematíes se recubran con anticuerpos u otras proteínas (como HDN, AIHA), es importante evaluar los hematíes del paciente con el control negativo del reactivo de Lorne (control monoclonal D negativo [n.º de catálogo 650010]).
- La técnica de la tarjeta de gel, la placa de microtitulación y el portaobjetos no detecta de manera eficaz las variantes de antígeno D débil y parcial. Se recomienda analizar las variantes de antígeno D débil y parcial con la técnica de ensayo en tubo.
- Antes de su uso, se debe dejar que el reactivo alcance la temperatura ambiente. Justo después de usar el reactivo, volver a almacenarlo a 2-8 °C.
- En las **técnicas recomendadas**, un volumen equivale aproximadamente a 50 µl cuando se utiliza el gotero suministrado.
- El uso de los reactivos y la interpretación de los resultados se deben llevar a cabo por personal cualificado y debidamente formado, de acuerdo con los requisitos del país donde se estén utilizando los reactivos.
- El usuario final debe determinar la idoneidad de los reactivos para su uso en otras técnicas.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS

- Pipetas volumétricas.
- Tarjetas ID Bio-Rad (NaCl, ensayo enzimático y aglutininas frías).
- Centrífuga Bio-Rad.
- Bio-Rad ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Casets del sistema Ortho BioVue (neutros).
- Centrifugadora del sistema Ortho BioVue.
- Diluyente de hematíes Ortho 0,8 %.
- Portaobjetos de vidrio para microscopio o placas de cerámica blancas.
- Varillas para aplicación.
- Tubos de ensayo de vidrio (10 × 75 mm o 12 × 75 mm).
- Centrífuga para tubos de ensayo.
- Microplacas de pocillos "U" validadas.
- Centrífuga para microplacas.
- Agitador para microplacas.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 6,8-7,2) o solución salina isotónica (pH 6,5-7,5).
- Hematíes de control positivo (idealmente R:r) y negativo (rr).

TÉCNICAS RECOMENDADAS

A. Técnica en tubo

- Preparar una suspensión de hematíes al 2-3 % en PBS o solución salina isotónica.
- Añadir en un tubo etiquetado: 1 volumen de reactivo anti-D de Lorne y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
- Mezclar bien y centrifugar todos los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Volver a suspender cuidadosamente los sedimentos de hematíes y realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.
- Cualquier tubo que muestre un resultado negativo o cuestionable (como se puede presentar con las muestras de hematíes D débiles) debe ser incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Tras la incubación, repetir los pasos 3 y 4.

B. Técnica en Bio-Rad ID (tarjetas NaCl, ensayo enzimático y aglutininas frías)

- Preparar una suspensión de hematíes al 0,8 % en ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Retirar el papel de aluminio de los microtubos necesarios.
- Añadir en el microtubo correspondiente: 50 µl de la suspensión de hematíes y 25 µl del reactivo anti-D de Lorne.
- Centrifugar la/s tarjeta/s ID en la centrífuga de tarjetas de gel Bio-Rad.
- Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

Técnica en Ortho BioVue (tarjetas neutras)

1. Preparar una suspensión de hematíes al 0,8 % en diluyente de hematíes Ortho al 0,8 %.
2. Retirar el papel de aluminio de las cámaras de reacción necesarias.
3. Añadir en la cámara de reacción correspondiente: 50 µl de la suspensión de hematíes y 40 µl del reactivo anti-D de Lorne.
4. Centrifugar el/los casete/s en una centrifugadora del sistema Ortho BioVue.
5. Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

C. Técnica en microplacas con pocillos "U"

1. Preparar una suspensión de hematíes al 2-3 % en PBS o solución salina isotónica.
2. Añadir en el pocillo correspondiente: 1 volumen de reactivo anti-D de Lorne y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
3. Mezclar bien, preferiblemente con un agitador para microplacas, procurando evitar cualquier contaminación cruzada.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos (tiempo en función del usuario).
5. Centrifugar la microplaca durante 1 minuto a 140 rcf o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
6. Volver a suspender los sedimentos celulares mediante una agitación cuidadosamente controlada en un agitador para microplacas.
7. Leer macroscópicamente o con un lector automático validado.
8. Cualquier reacción débil debe ser repetida con la técnica en tubo.

D. Técnica en portaobjetos

1. Preparar una suspensión de hematíes al 35-45 % en suero, plasma, PBS o solución salina isotónica o utilizar sangre total anticoagulada (en su propio plasma).
2. Colocar en un portaobjetos de vidrio o tarjeta etiquetado/a: 1 volumen de reactivo anti-D de Lorne y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
3. Mezclar el reactivo y las células con una varilla aplicadora limpia en un área de unos 20 x 40 mm.
4. Inclinar lentamente el portaobjetos de atrás a delante durante 30 segundos y volver a mezclar ocasionalmente durante un período de un minuto, manteniendo el portaobjetos a temperatura ambiente.
5. Realizar un examen macroscópico después de un minuto con luz difusa y no confundir las fibras de fibrina con la aglutinación.
6. Cualquier reacción débil debe ser repetida con la técnica en tubo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. **Positivo:** La aglutinación constituye un resultado positivo y, dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del análisis, indica la presencia del antígeno D en los hematíes.
2. **Negativo:** La ausencia de aglutinación constituye un resultado negativo y, dentro de las limitaciones aceptadas para el procedimiento del análisis, indica la ausencia del antígeno D en los hematíes.
3. Se deben excluir los resultados de las pruebas de células que se aglutinen con el control negativo del reactivo, ya que la aglutinación más probablemente es causada por el efecto de los potenciadores macromoleculares del reactivo en células sensibilizadas.

ESTABILIDAD DE LAS REACCIONES

1. Leer los análisis realizados en microplacas y tubos inmediatamente tras la centrifugación.
2. Los análisis en portaobjetos deben interpretarse en el plazo de un minuto a fin de garantizar la especificidad y evitar la posibilidad de que un resultado negativo se interprete incorrectamente como positivo debido al secado del reactivo.
3. Los resultados de los análisis realizados a temperaturas distintas de las aquí recomendadas deben ser interpretados con cautela.

LIMITACIONES

1. El reactivo anti-D de Lorne no es adecuado para su uso con células tratadas enzimáticamente, células suspendidas en LISS o en técnicas de antiglobulina indirecta (IAT).
2. La sangre almacenada puede dar lugar a reacciones más débiles que la sangre fresca.
3. Puede observarse una aglutinación falsa positiva debido a la presencia de potenciadores macromoleculares en el reactivo cuando se analizan células sensibilizadas con IgG, por ejemplo, en la AIHA o la HDN.
4. También pueden darse resultados falsos positivos o falsos negativos debido a:
 - Contaminación de los materiales del análisis
 - Conservación, concentración celular, tiempo o temperatura de incubación inadecuados
 - Centrifugación inadecuada o excesiva
 - Desviación de las técnicas recomendadas

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

1. Antes de su distribución, cada lote de reactivo monoclonal anti-D de Lorne fue analizado utilizando los métodos de análisis recomendados que figuran en estas instrucciones de uso. Los análisis cumplen con los requisitos de análisis, según se describen en la versión/edición actual de las «Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom» («Directrices para los servicios de transfusión de sangre en el Reino Unido») y las especificaciones técnicas comunes.
2. Los reactivos anti-D para la determinación del grupo D de los pacientes no deben reaccionar con las células DVI cuando se utilicen los métodos recomendados.
3. La especificidad de los anticuerpos monoclonales fuente se demuestra utilizando un perfil de células antígeno-negativas.
4. La potencia de los reactivos se ha estudiado frente al siguiente estándar de referencia de potencia mínima obtenido del National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC):
 - Estándar de referencia Anti-D 99/836.
5. El control de calidad de los reactivos se llevó a cabo mediante el uso de hematíes con fenotipos que fueron verificados por un centro de transfusión

sanguínea del Reino Unido y que se habían lavado con una PBS o solución salina isotónica antes de su uso.

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

1. El usuario es responsable del funcionamiento del reactivo en cualquier otro método distinto de los mencionados en la sección **Técnicas recomendadas**.
2. Cualquier desviación de las **técnicas recomendadas** debe validarse antes de su uso⁶.

BIBLIOGRAFÍA

1. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
2. AABB Technical Manual, 16th edition, AABB 2008.
3. Marion E.Reid & Christine Lomas-Francis, Blood Group Antigens & Antibodies, SBB Books, Nueva York 2007; p. 192.
4. Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. Transfusion Medicine 1995. 5, 171-184
5. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
6. 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.

TAMAÑOS DE REACTIVOS DISPONIBLES

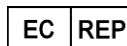
	Tamaño del vial	Número de catálogo	Pruebas por vial
Anti-D clon 1 monoclonal	10 ml	730010	200
Anti-D clon 2 monoclonal	10 ml	710010	200

TABLA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Definición	Símbolo	Definición
	Responsable de la fabricación		Número de catálogo
	Límites de temperatura		Utilizar antes de YYYY-MM-DD
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>		Consultar las instrucciones de uso
	Representante autorizado		Número de lote
	Símbolo CE verificado por un organismo notificado		



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Reino Unido
Tel.: +44 (0) 118 921 2264
Fax: +44 (0) 118 986 4518
Correo electrónico: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta