

REACTIVOS MONOCLONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGÜÍNEOS

INSTRUCCIONES DE USO



Monoclonal Anti-D Duoclone Standard Grade

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	% raza blanca	% estadounidenses de raza negra
+	RhD +vo	85	72
0	RhD -vo	15	28

PRINCIPIO

El reactivo provocará una aglutinación (agrupación) directa de los hematíes que lleven el antígeno D y una aglutinación indirecta de los hematíes humanos que son categoría D^{VI} en la fase de antiglobulina de la prueba. La ausencia de aglutinación suele indicar la ausencia del antígeno D (véase la sección Limitaciones).

REACTIVO

El reactivo Lorne Monoclonal Anti-D Duoclone para la determinación de grupos sanguíneos es un reactivo escasamente proteico combinado que contiene anti-D humano monoclonal IgM e IgG, diluido en un tampón fosfato con cloruro sódico (0,9 g %), albúmina bovina (3 g %) y potenciadores macromoleculares. Durante la tipificación de las muestras de pacientes, mediante las técnicas recomendadas, el reactivo aglutinará células RhD positivas de forma directa, incluidos los fenotipos D débiles (D^{VI}), y aglutinará fenotipos D^{VI} de forma indirecta. El reactivo se suministra en la dilución óptima 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 frasco.

Producto	Línea Celular/Clon	Tipo de anticuerpo
Anti-D Duoclone (RH1)	RUM-1	Línea celular de hibridoma secretora de IgM humana
	MS-26	Línea celular de hibridoma secretora IgG humana

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.

OBTENCION DE MUESTRAS Y PREPARACION

Las muestras pueden recogerse en anticoagulantes EDTA, citrato, CPDA o como una muestra coagulada. Las muestras deben analizarse cuanto antes después de su recogida. 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 tengan evidencias de lisis pueden dar lugar a resultados no fiables. Es preferible (pero no esencial) lavar todas las muestras de sangre con PBS o solución salina isotónica antes de realizar el análisis.

PRECAUCIONES

- El reactivo no está indicado para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Si el vial del reactivo está roto o agrietado, descartar inmediatamente su contenido.
- No utilizar el reactivo caducado (véase la etiqueta del vial).
- No utilizar el reactivo si presenta precipitado.
- La manipulación de los reactivos debe realizarse con la apropiada indumentaria de protección, tales como guantes desechables y bata de laboratorio.
- El reactivo ha sido filtrado a través de cápsulas de 0,2 µm para reducir la carga microbiana. 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.
- El reactivo contiene < 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 el reactivo 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 los frascos y su contenido.

DERRAMES

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

- Los controles positivos y negativos conocidos deben analizarse en paralelo con cada lote de pruebas. Los análisis deben considerarse no válidos si los controles no muestran los resultados esperados. El control positivo es una muestra que contiene el antígeno correspondiente al anticuerpo utilizado en el reactivo, mientras que el control negativo es una muestra que carece del mismo.
- Durante la tipificación de hematíes con anticuerpos u otras proteínas (como HDN, ALHA), es importante evaluar los hematíes con un control negativo del reactivo (como el Control Negativo Monoclonal D de Lorne, n.º de catálogo 650010). Los hematíes recubiertos con anticuerpos o proteínas anómalas pueden aglutinarse cuando se suspenden en reactivos que contienen potenciadores químicos.
- Para la determinación de la categoría DVI estudiar las muestras solo mediante las técnicas de Antiglobulina indirecta, Coombs Bio-Rad-ID y Coombs Ortho BioVue.
- Las técnicas en tarjetas de gel, placas de microtítulo y portaobjetos no detectan de manera eficaz los antígenos D débiles y sus variantes. Se recomienda que las variantes débiles y parciales se estudien con la técnica de la prueba en tubo.
- La técnica de antiglobulina en tubo solo puede considerarse válida si todas las pruebas negativas reaccionan de manera positiva con hematíes sensibilizados con IgG.
- En las Técnicas recomendadas, un volumen equivale aproximadamente a 50 µl cuando se utiliza el cuantagotas del vial suministrado.
- La utilización del reactivo y la interpretación de los resultados deben llevarse a cabo por personal cualificado y formado de acuerdo a los requisitos del país donde se estén utilizando los reactivos.
- El usuario debe determinar la idoneidad de los reactivos para su uso en otras técnicas.
- Para incidentes graves en otros países, informe al fabricante y, si corresponde, a su autoridad competente nacional.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS

- Globulina antihumana; p. ej., Lorne AHG Elite (n.º de cat. 435010) o IgG antihumana; p. ej., Lorne Anti-Human IgG (n.º de cat. 402010).
- Varillas para aplicación.
- Lector automático de placas.
- Lavador de células de Coombs.
- Tarjetas ID Bio-Rad (LISS/Coombs) y (NaCl, ensayo enzimático y aglutininas frías).
- Centrifugadora ID Bio-Rad.
- Bio-Rad ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Incubadora Bio-Rad ID equilibrada a 37 °C ±2°.
- Portaobjetos de vidrio para microscopio o tarjetas blancas.
- Tubos de ensayo de vidrio (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Hematíes sensibilizados con IgG; p. ej., Lorne Coombs Control Cells (n.º de cat. 970010).
- Centrífuga para microplacas.
- Casetes del sistema Ortho BioVue (AHG/Coombs) y (Neutros).
- Centrifugadora del sistema Ortho BioVue.
- Calentador de bloque del sistema Ortho BioVue equilibrado a 37 °C ±2 °C.
- Diluyente de hematíes Ortho 0,8 %.
- Agitador para microplacas.
- Solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) (pH 6,8-7,2) o solución salina isotónica (pH 6,5-7,5).
- Hematíes para controles positivo (idealmente R:r) y negativo (rr).
- Centrífuga para tubos.
- Microplacas de pocillos "U" validadas.
- Pipetas volumétricas.
- Baño de agua o incubadora de calor seco equilibrada a 37 °C ± 2 °C.

TÉCNICAS RECOMENDADAS (NO PARA CATEGORÍA D^{VI})

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 Lorne Duoclone y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar todos los tubos durante 20 segundos a 1000 fcr 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

REACTIVOS MONOCLONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS

INSTRUCCIONES DE USO

Monoclonal Anti-D Duoclone Standard Grade

Para técnicas en tubo, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, microplaca y portaobjetos



cuestionable (que se puede presentar con las muestras de hemáties D^u o D débiles), debe ser incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- Tras la incubación, repetir los pasos 3 y 4.

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

- Preparar una suspensión de hemáties 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 hemáties y 25 µl del reactivo Lorne Duoclone.
- Centrifugar la(s) tarjeta(s) ID en la centrifuga de tarjetas de gel Bio-Rad.
- Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

C. Técnica de tipificación en Ortho BioVue (tarjetas neutras)

- Preparar una suspensión de hemáties al 0,8 % en diluyente de hemáties Ortho 0,8 %.
- Retirar el papel de aluminio de las cámaras de reacción necesarias.
- Añadir en la cámara de reacción correspondiente: 50 µl de la suspensión de hemáties y 40 µl del reactivo Lorne Duoclone.
- Centrifugar el/los casete(s) en una centrifuga del sistema Ortho BioVue.
- Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

D. Técnica en microplacas con pocillos “U”

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

E. Técnica en portaobjetos

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

TÉCNICAS RECOMENDADAS (PARA DETECTAR LA CATEGORÍA D^u)

A. Técnica de antiglobulina indirecta (IAT)

- Preparar una suspensión de hemáties al 2-3 % en PBS o solución salina isotónica.
- Añadir en un tubo etiquetado: 1 volumen de reactivo de Lorne Duoclone y 1 volumen de la suspensión de hemáties.
- Mezclar minuciosamente e incubar a 37 °C durante 15 minutos.
- Lavar los hemáties de prueba 4 veces con PBS o solución salina isotónica, teniendo cuidado de decantar la solución salina entre lavados y volver a suspender los botones celulares después de cada lavado. Decantar completamente la solución salina después del último lavado.
- Añadir 2 gotas de anticuerpos contra las globulinas humanas o anticuerpos IgG a cada sedimento celular.
- Mezclar minuciosamente y centrifugar todos los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
- Volver a suspender cada botón celular y realizar un examen macroscópico.
- Confirmar la validez de todas las reacciones negativas con

hemáties sensibilizados con IgG.

B. Técnica de microtipificación en Bio-Rad-ID (tarjeta LISS/Coombs)

- Preparar una suspensión de hemáties 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 hemáties y 25 µl de Lorne Duoclone.
- Incubar la(s) tarjeta(s) ID durante 15 minutos a 37 °C.
- Centrifugar la(s) tarjeta(s) ID en la centrifuga de tarjetas de gel Bio-Rad.
- Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

C. Técnica de tipificación en Ortho BioVue (tarjetas AHG/Coombs)

- Preparar una suspensión de hemáties al 0,8 % en diluyente de hemáties Ortho 0,8 %.
- Retirar el papel de aluminio de las cámaras de reacción necesarias.
- Añadir en la cámara de reacción correspondiente: 50 µl de la suspensión de hemáties y 25 µl de Lorne Duoclone.
- Incubar el/los casete(s) durante 15 minutos a 37 °C.
- Centrifugar el/los casete(s) en una centrifugadora del sistema Ortho BioVue.
- Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

- 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 hemáties.
- 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 hemáties.
- 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

- Leer los análisis realizados en microplacas y tubos inmediatamente tras la centrifugación.
- Completar los pasos de lavado sin interrupción, centrifugar y leer las pruebas de inmediato después de la adición de la globulina antihumana debido a que los retrasos pueden suponer la disociación de los complejos antígeno-anticuerpo, lo que provoca resultados falsos negativos o positivos débiles.
- Los análisis en portaobjetos deben interpretarse en el plazo de 1 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.
- Los resultados de los análisis realizados a temperaturas distintas de las aquí recomendadas deben ser interpretados con cautela.

LIMITACIONES

- Lorne Anti-D no es adecuado para su utilización con células tratadas enzimáticamente o suspendidas en LISS.
- La sangre almacenada puede dar lugar a reacciones más débiles que la sangre fresca.
- Es posible que se observe aglutinación falsa positiva cuando se realizan análisis con células sensibilizadas con IgG.
- También pueden darse resultados positivos falsos o negativos falsos debido a:
 - Contaminación de los materiales del análisis
 - Conservación, concentración celular, tiempo o temperatura de incubación inadecuados
 - Desviación de las técnicas recomendadas
 - Centrifugación inadecuada o excesiva

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

- El kit se ha caracterizado mediante todos los procedimientos mencionados en la sección Técnicas recomendadas.
- Antes de su comercialización, cada lote de Lorne Monoclonal Anti-D Duoclone se evalúa con los métodos de pruebas recomendados frente a los hemáties recubiertos con anticuerpos para comprobar la reactividad adecuada.
- La especificidad de los anticuerpos monoclonales fuente se demuestra utilizando un perfil de células antígeno-negativas.
- La potencia del reactivo 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.
- El control de calidad del reactivo se llevó a cabo mediante el uso de hemáties que fueron lavados dos veces en PBS o solución salina isotónica antes de su uso.

REACTIVOS MONOCLONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS

INSTRUCCIONES DE USO

Monoclonal Anti-D Duoclone Standard Grade

Para técnicas en tubo, Bio-Rad-ID, Ortho BioVue, microplaca y portaobjetos



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 uso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Race RR, Sanger R. Blood Groups in Man 6th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publishers 1975, Chapter 2.
2. Issitt PD. Applied Blood Group Serology, 3rd Edition, Montgomery Scientific, Miami, 1985, Chapter 10.
3. Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987, Chapter 7.
4. Tippett P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. Medical Laboratory Science 1988; 45, 88-93
5. 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
6. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
7. 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
10 ml	740010E
1000 ml	740000E
5000 ml	740000EX5

TABLA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Definición	Símbolo	Definición
	Responsable de la fabricación		Número de catálogo
	Limites de temperatura		Utilizar antes de YYYY-MM-DD
	Consultar las instrucciones de uso.		Número de lote



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
www.lornelabs.com