



REACTIVOS MONOCLONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS INSTRUCCIONES DE USO

Anti-D Duoclone 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 es clínicamente 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 cualitativamente la presencia o ausencia del antígeno RhD 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

El reactivo contiene anticuerpos contra el antígeno D en los hematíes humanos y 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 (ausencia de agrupación) indica en general la ausencia del antígeno D en los hematíes humanos (ver **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 (2,0 g %) y potenciadores macromoleculares (1,5 g %). Durante la tipificación de las muestras de pacientes, mediante las técnicas recomendadas, el reactivo aglutinará directamente células RhD positivas, incluida la mayoría de las variantes (**pero no D^{VI}**), y una elevada proporción de fenotipos D débiles (Dⁿ). Los reactivos no contienen ni están compuestos de sustancias CMR o sustancias que alteran el funcionamiento del sistema endócrino o que podrían causar sensibilización o una reacción alérgica al usuario. El reactivo se suministra en la dilución óptima para su utilización 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**.

| IgM/IgG | Línea Celular/Clon |
|---------|--------------------|
| IgM | RUM-1 |
| IgG | MS-26 |

EXPRESIÓN DEBILITADA DEL ANTÍGENO RhD

El término colectivo Dⁿ 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. D^{VI} es una categoría de antígeno D parcial en la que la mayoría de epítomos D están ausentes. El reactivo Duoclone detectará la mayoría de los ejemplos de hematíes D débil y D parcial mediante aglutinación directa, pero no detectará células D^{VI}. El reactivo detectará D^{VI} y células D parcial en la fase de la prueba de antiglobulina indirecta (IAT, por sus siglas en inglés).

CONSERVACIÓN

Los viales de reactivo deben ser conservados 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, citrato, CPDA 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 exhiban una hemólisis macroscópica o contaminación microbiana. Las muestras de sangre que muestren 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

1. El reactivo es solo para uso en diagnóstico *in vitro*.

2. Si el vial del reactivo está roto o agrietado, descartar inmediatamente su contenido.
3. No utilizar el reactivo caducado (ver la **etiqueta del vial**).
4. No utilizar el reactivo si presenta precipitado.
5. La manipulación de los reactivos debe realizarse con la apropiada indumentaria de protección, tales como guantes desechables y bata de laboratorio.
6. El reactivo ha sido filtrado a través de cápsulas de 0.2 µm para reducir la carga biológica, pero no se suministra esterilizado. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Ningún método puede garantizar que los productos derivados de fuentes humanas o animales estén libres de agentes infecciosos. Manipular y desechar con precaución los viales y su contenido.

ELIMINACIÓN DEL PRODUCTO Y MANEJO DE 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

1. Se recomienda la utilización de un control positivo (idealmente células R₁r) y un control negativo (idealmente células rr) para estudiar de forma paralela en cada lote de análisis. Los análisis deben considerarse no válidos si los controles no muestran los resultados esperados.
2. Durante la tipificación 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 (Monoclonal D Negative Control (n.º de catálogo 650010)). Los análisis deben considerarse no válidos si los hematíes se aglutinan con el Monoclonal D Negative Control de Lorne (n.º de catálogo 650010).
3. Para la determinación de la categoría D^{VI}, estudiar las muestras solo mediante las técnicas de **Antiglobulina indirecta, Coombs Bio-Rad, Bio-Rad-ID y Coombs Ortho BioVue**.
4. 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.
5. La técnica de antiglobulina en tubo solo puede considerarse válida si todas las pruebas negativas reaccionan de manera positiva con hematíes sensibilizados con IgG.
6. Antes de su uso, deje que el reactivo adquiera la temperatura ambiente. Ni bien se haya utilizado el reactivo, volver a almacenarlo a 2-8°C.
7. En las **técnicas recomendadas**, un volumen equivale aproximadamente a 50 µl cuando se utiliza el gotero suministrado.
8. 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.
9. El usuario debe determinar la idoneidad de los reactivos para su uso en otras técnicas.

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).
- Pipetas volumétricas.
- Portaobjetos de vidrio para microscopio o tarjetas blancas.
- Varillas para aplicación.
- Tubos de ensayo (10 x 75 mm o 12 x 75 mm).
- Baño de agua o incubadora de calor seco equilibrada a 37°C ± 2°C.
- Centrífuga para tubos.
- Lavador de células de Coombs.
- Microplacas de pocillos "U" validadas.
- Centrífuga para microplacas.
- Agitador para microplacas.
- Lector automático de placas.
- Tarjetas ID Bio-Rad (LISS/Coombs) y (NaCl, ensayo enzimático y aglutininas frías).
- Centrífuga Bio-Rad ID.
- Bio-Rad ID-CellStab o ID-Diluent 2.
- Incubadora Bio-Rad ID equilibrada a 37°C ± 2°.
- Casetes del sistema Ortho BioVue (AHG/Coombs) y (Neutros).

- Centrífuga del sistema Ortho BioVue.
- Calentador de bloque del sistema Ortho BioVue equilibrado a 37°C ±2°C.
- Diluyente de hematíes Ortho 0,8 %.
- Hematíes sensibilizados con IgG; p. ej., Lorne Coombs Control Cells (n.º de cat. 970010).
- Solución tampón fosfato salino (PBS) (pH 6,8-7,2) o solución salina isotónica (pH 6,5-7,5).
- Hematíes para controles positivo (idealmente R_{1r}) y negativo (rr).

TÉCNICAS RECOMENDADAS (NO PARA CATEGORÍA D^U)

A. Técnica en tubo

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

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

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

C. Técnica en Ortho BioVue (tarjetas neutras)

1. Preparar una suspensión de hematíes al 0,8 % en diluyente de hematíes Ortho 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 Lorne Duoclone.
4. Centrifugar la(s) tarjeta(s) en una centrífuga del sistema Ortho BioVue.
5. Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

D. 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 Lorne Duoclone y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
3. Mezclar minuciosamente, preferiblemente con un agitador para microplacas, cuidando de 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 botones 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.

E. Técnica en portaobjetos

1. Preparar una suspensión de hematíes al 35-45 % en suero, plasma, PBS o solución salina isotónica o utilice sangre total anticoagulada (en su propio plasma).
2. Colocar en un portaobjetos de vidrio o tarjeta etiquetado/a: 1 volumen de reactivo Lorne Duoclone y 1 volumen de la suspensión de hematíes de prueba.
3. Mezclar el reactivo y las células con una varilla 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 1 minuto, manteniendo el portaobjetos a temperatura ambiente.
5. Realizar un examen macroscópico luego de 1 minuto sobre una luz difusa y no confundir las fibras de fibrina con la aglutinación.
6. 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)

1. Preparar una suspensión de hematíes al 2-3 % en PBS o solución salina isotónica.
2. Añadir en un tubo etiquetado: 1 volumen de Lorne Duoclone y 1 volumen de la suspensión de hematíes de prueba.
3. Mezclar minuciosamente e incubar a 37°C durante 15 minutos.
4. Lavar los hematíes al menos una vez 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.
5. Añadir 2 gotas de AHG o Anti-IgG a cada botón celular seco.
6. Mezclar minuciosamente y centrifugar todos los tubos durante 20 segundos a 1000 rcf o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
7. Volver a suspender cada botón celular y realizar un examen macroscópico.

8. Confirmar la validez de todas las reacciones negativas con hematíes sensibilizados con IgG.

B. Técnica en Bio-Rad-ID (tarjetas LISS/Coombs)

1. Preparar una suspensión de hematíes al 0,8 % en ID-CellStab o ID-Diluent 2.
2. Retirar el papel de aluminio de los microtubos necesarios.
3. Añadir en el microtubo correspondiente: 50 µl de la suspensión de hematíes y 25 µl de Lorne Duoclone.
4. Incubar la(s) tarjeta(s) ID durante 15 minutos a 37°C.
5. Centrifugar la(s) tarjeta(s) ID en la centrífuga de tarjetas de gel.
6. Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

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

1. Preparar una suspensión de hematíes al 0,8 % en diluyente de hematíes Ortho 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 de Lorne Duoclone.
4. Incubar la(s) tarjeta(s) durante 15 minutos a 37°C.
5. Centrifugar la(s) tarjeta(s) en una centrífuga del sistema Ortho BioVue.
6. Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

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. **Control:** 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. Completar los pasos de lavado sin interrupción, centrifugar y leer las pruebas de inmediato luego 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.
3. Los análisis en portaobjetos deben interpretarse luego de un máximo 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.
4. Los resultados de los análisis realizados a temperaturas distintas de las aquí recomendadas deben ser interpretados con cautela.

LIMITACIONES

1. Lorne Anti-D no es adecuado para su utilización con células tratadas enzimáticamente o suspendidas en LISS.
2. Deben validarse antes de su uso las soluciones utilizadas para realizar suspensiones de hematíes diferentes a las descritas en la sección "Técnicas recomendadas" del documento. Algunas soluciones pueden dar lugar a resultados falsos positivos o falsos negativos.
3. La sangre almacenada puede dar lugar a reacciones más débiles que la sangre fresca.
4. Es posible que se observe aglutinación falsa positiva cuando se realizan análisis con células sensibilizadas con IgG.
5. 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 liberación, cada lote de reactivo monoclonal Lorne Anti-D Duoclone se evalúa con los métodos de pruebas recomendados descritos en estas instrucciones de uso. Los análisis cumplen con los requisitos de pruebas, según se describen en la versión/edición actual de las "Guías para los Servicios de transfusión de sangre del Reino Unido" y las "Especificaciones técnicas comunes".
2. La especificidad en origen de los anticuerpos monoclonales está demostrada frente a un panel de hematíes antígenos-negativo.
3. 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.
4. 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 de sangre del RU y que fueron lavados en 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 como **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, New York 2007; Page 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 |
|-----------------|--------------------|------------------|
| 10 ml | 740010 | 200 |
| 1000 ml | 740000* | 20.000 |
| 5000 ml | 740000x5* | 100.000 |

*Este tamaño es solo para fabricación posterior (FFMU) y, por lo tanto, no cuenta con el marcado CE.



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

| | | |
|----|-----|--|
| EC | REP | Advena Ltd. Tower Business Centre, 2 nd Fl., Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta |
|----|-----|--|