LORNE LABORATORIES LTD.

GRAN BRETAÑA

CE 1434

REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS

INSTRUCCIONES DE USO

Anti-C, anti-E, anti-c y anti-e monoclonal: Para técnicas en tubo, Bio-Rad ID, Ortho BioVue, microplaca y portaobjetos.

RESUMEN

En 1940, Levine y Stetson descubrieron el sistema del grupo sanguíneo Rh. Además del antígeno D, los otros antígenos principales de Rh son C, E, c y e. El antígeno D es altamente inmunogénico. Los antígenos C y e son menos inmunogénicos que E y c. Los anticuerpos correspondientes son todos clínicamente significativos dado que estos antígenos pueden causar tanto reacciones transfusionales como enfermedad hemolítica del recién nacido.

HAPLOTIPO DE WIENER MODIFICADO	PREVALENCIA (%)		
	POBLACIÓN CAUCÁSICA	POBLACIÓN AFRODESCENDIENTE	POBLACIÓN ASIÁTICA
R_1	42	17	70
R_2	14	11	21
R_0	4	44	3
R_Z	<0,01	<0,001	1
r	37	26	3
r'	2	2	2
r''	1	<0,01	<0,01
r^Y	<0,01	<0,01	<0,01

USO PREVISTO

Los reactivos Rh son reactivos utilizados para la determinación de grupos sanguíneos diseñados para comprobar de manera cualitativa la presencia o ausencia del antígeno Rh 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 los antígenos Rhesus correspondientes en los hematíes humanos y provocarán una aglutinación (agrupación) directa de los hematíes que lleven el correspondiente antígeno Rh. La ausencia de aglutinación (ausencia de agrupación) indica en general la ausencia del antígeno Rh correspondiente (ver **Limitaciones**).

REACTIVOS

Los reactivos para la determinación de grupos sanguíneos Monoclonal IgM Anti-Rh de Lorne (REF: 690005, 691005,692005, 693005, 700010) son reactivos de baja concentración proteica que contienen anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra los antígenos Rh correspondientes (D, C, c, E, e) diluidos en cloruro de sodio, albúmina bovina y potenciadores macromoleculares (ver **Limitaciones**). Los reactivos no contienen ni están compuestos de sustancias CMR, sustancias que alteran el funcionamiento del sistema endocrino ni sustancias que puedan causar sensibilización o una reacción alérgica al usuario. Cada reactivo se suministra en la dilución óptima para su utilización 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 frasco.

Reactivo	Línea Celular / Clon	Tipo de anticuerpo
Anti-C Monoclonal	MS-24	Línea celular de hibridoma secretora de IgM humana
Anti-E Monoclonal	MS-258	Línea celular de hibridoma secretora de IgM humana
Anti-c Monoclonal	MS-33	Línea celular de hibridoma secretora de IgM humana
Anti-e Monoclonal	MS16	Línea celular de hibridoma secretora de IgM humana
	MS-63	Línea celular de hibridoma secretora de IgM 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. Según los estudios de estabilidad durante el uso de los reactivos, una vez abierto el vial, el contenido debería 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.

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, las muestras deben conservarse a 2-8 °C. Las muestras de sangre con EDTA o coaguladas pueden conservarse hasta 1 día después de la extracción a temperatura ambiente y hasta 21 días en refrigeración (2-8 °C). No deben analizarse las muestras que exhiban una hemólisis macroscópica o contaminación microbiana. Las muestras de sangre que muestren indicios 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. Los reactivos son solo para uso en diagnóstico *in vitro*.
2. Si el vial del reactivo está roto o agrietado, descartar inmediatamente su contenido.
3. No utilizar reactivos caducados (ver la **etiqueta del vial**).
4. No utilizar reactivos que presenten precipitados.
5. La manipulación de los reactivos debe realizarse con la apropiada indumentaria de protección, tales como guantes desechables y bata de laboratorio.
6. Los reactivos se han filtrado a través de una cápsula de 0,2 µm para reducir la carga biológica, pero no se suministran estériles. 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. Los reactivos contienen <0,1 % de azida sódica (NaN_3). 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 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.
9. 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

1. Se utilizarán un control positivo (preferiblemente heterocigoto) y un control negativo 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. Al tipificar los hematíes de pacientes con autoanticuerpos confirmados o sospechados, anomalías proteicas o una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva, es importante que se utilice un control negativo del reactivo en paralelo. Como control negativo del reactivo, debe utilizarse únicamente el Monoclonal Rh Control de Lorne, número de catálogo 640010.
3. Las técnicas en tarjetas de gel, placas de microtítulo y portaobjetos pueden no detectar de manera eficaz los antígenos Rh débiles. Se recomienda que los antígenos Rh débiles se estudien con la técnica de la prueba en tubo.
4. 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 ºC.
5. En las **técnicas recomendadas,** un volumen equivale aproximadamente a 50 µl cuando se utiliza el gotero suministrado.
6. La utilización de los reactivos 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.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

Técnica en tubo

- Tubos de ensayo de vidrio (10 × 75 mm o 12 × 75 mm).
- Centrífuga que pueda girar a 1000 g durante 20 segundos.
- Solución salina amortiguada con fosfato (PBS) (pH 6,8-7,2) o solución salina isotónica (pH 6,5-7,5).
- Hematíes para controles positivos y negativos:
  Monoclonal Anti-C: R_1r (control positivo) y rr (control negativo).
  Monoclonal Anti-E: R_2r (control positivo) y rr (control negativo).
  Monoclonal Anti-c: R_1r (control positivo) y R_1R_1 (control negativo).
  Monoclonal Anti-e: R_2r (control positivo) y R_2R_2 (control negativo).

Técnica de microtipificación en Bio-Rad ID

- Tarjetas Bio-Rad ID Cards (NaCl, ensayo enzimático y aglutininas frías).
- Centrifugadora Bio-Rad Centrifuge.
- Bio-Rad ID-CellStab o ID-Diluent 2.

Técnica de tipificación en Ortho Biovue

- Casetes del sistema Ortho BioVue (neutros).
- Centrifugadora del sistema Ortho BioVue.
- Diluyente de hematíes Ortho 0,8 %.

Técnica en placa de microtítulo

- Placas de microtítulo de pocillos “U” validadas.
- Centrífuga para placas microtítulo.
- Agitador para placas microtítulo.

Técnica en portaobjetos

- Portaobjetos de vidrio para microscopio o placas de cerámica blancas.
- Varillas para aplicación.
- Temporizador o cronómetro

Todas las técnicas

- Pipetas volumétricas.

TÉCNICAS RECOMENDADAS

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 Anti-Rh y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
3. Mezclar minuciosamente y centrifugar todos los tubos durante 20 segundos a 1000 fcr o a una fuerza y tiempo alternativos adecuados.
4. Volver a suspender cuidadosamente los sedimentos de hematíes y realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.
5. Cualquier tubo que muestre un resultado negativo o cuestionable, 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 de una tarjeta ID-Card para NaCl/ensayo enzimático/aglutininas frías.
3. Añadir en el microtubo correspondiente: 50 µl de la suspensión de hematíes y 25 µl del reactivo Anti-Rh de Lorne.
4. Centrifugar la/s tarjeta/s ID en una centrífuga Bio-Rad ID.
5. Realizar un examen macroscópico para comprobar si hay aglutinación.

C. Técnica en Ortho BioVue (casetes neutros)

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 del casete neutro.
3. Añadir en la cámara de reacción correspondiente: 50 µl de la suspensión de hematíes y 40 µl del reactivo Lorne Anti-Rh.
4. Centrifugar el/los casete(s) durante 5 minutos 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 Anti-Rh y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
3. Mezclar minuciosamente, preferiblemente con un agitador para microplacas, procurando evitar cualquier contaminación cruzada.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutes (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.

E. Técnica en portaobjetos

1. Preparar una suspensión de eritrocitos al 35-45 % en suero, plasma, PBS o solución salina isotónica. Si no es posible, también puede utilizarse sangre completa anticoagulada como muestra.
2. Colocar en un portaobjetos de vidrio o tarjeta etiquetado/a: 1 volumen de reactivo Anti-Rh de Lorne y un volumen de la suspensión de hematíes.
3. Mezclar el reactivo y las células con una varilla limpia en un área de unos 20 × 40 mm.
4. Inclinar lentamente el portaobjetos de atrás a delante durante 1 minuto, manteniendo el portaobjetos a temperatura ambiente.
5. Realizar un examen macroscópico después de 1 minuto sobre una luz difusa (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 Rh correspondiente 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 Rh correspondiente en los hematíes.
3. **Control:** La reacción puede interpretarse si los resultados obtenidos con las muestras control son válidos. Se deben excluir los resultados de las pruebas de células que se aglutinen con el Monoclonal Rh Control (ref. 640010), ya que es probable que la aglutinación esté 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 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.
3. Los resultados de los análisis realizados a temperaturas distintas de las aquí recomendadas deben ser interpretados con cautela.

LIMITACIONES

1. Los reactivos Anti-Rh de Lorne no son adecuados para su utilización con células tratadas enzimáticamente o en técnicas de antiglobulina indirecta.
2. Se ha demostrado que muchos anticuerpos monoclonales humanos IgM anti-Rh poseen actividad de aglutininas frías anti-i/I, especialmente con células de cordón umbilical o células tratadas con enzimas. Esto puede hacerse evidente si las pruebas se incuban a una temperatura inferior a la recomendada.
3. Algunos hematíes expresan variantes de antígenos Rh y pueden dar lugar a reacciones más débiles de las observadas en células de control positivas seleccionadas aleatoriamente. Anti-C puede generar reacciones más débiles con el antígeno C de individuos R_2R_Z. De forma similar, Anti-e puede provocar reacciones sensiblemente más débiles en ausencia del antígeno C, p. ej., R_2r, r"r y rr.
4. La supresión o disminución de la expresión de ciertos antígenos de grupos sanguíneos puede, inversamente, dar lugar a reacciones falsas negativas. Por estos motivos, debe realizarse con cautela la asignación de genotipos en base a los resultados del análisis.
5. En caso de obtener resultados ambiguos, se recomienda lavar los hematíes al menos 2 veces.
6. 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.
   - Centrifugación inadecuada o excesiva.
   - Desviación de las técnicas recomendadas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

1. Antes de su distribución, cada lote de reactivo Rh fue sometido a pruebas utilizando los métodos de prueba 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. La especificidad de los anticuerpos monoclonales originales se demuestra utilizando un perfil de células sin antígeno
3. 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 Reino Unido y que se habían lavado con una PBS o solución salina isotónica antes de su uso.
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 Reino Unido y que se habían lavado con una PBS o solución salina isotónica antes de su uso.
5. El rendimiento de los reactivos se confirmó mediante un estudio comparativo frente a reactivos para IVD marcados con CE de eficacia comprobada, en el que los reactivos fueron evaluados en paralelo con todos los métodos recomendados. Los resultados del análisis estadístico global del estudio se muestran a continuación:

	Método	N	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Anti-C	Tubo de ensayo	475	99,6 %	100,0 %	100,0 %	99,5 %
	Ortho	475	100,0 %	99,1 %	99,2 %	100,0 %
	Bio-Rad	475	100,0 %	98,6 %	98,8 %	100,0 %
	Microplaca	475	100,0 %	99,5 %	99,6 %	100,0 %
	Portaobjetos	438	99,6 %	100,0 %	100,0 %	99,5 %
Anti-E	Tubo de ensayo	479	100,0 %	99,7 %	99,2 %	100,0 %
	Ortho	479	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	Bio-Rad	479	100,0 %	99,7 %	99,2 %	100,0 %
	Microplaca	479	97,5 %	100,0 %	100,0 %	99,2 %
	Portaobjetos	447	99,1 %	100,0 %	100,0 %	99,7 %
Anti-c	Tubo de ensayo	475	100,0 %	95,1 %	99,0 %	100,0 %
	Ortho	475	100,0 %	96,3 %	99,2 %	100,0 %
	Bio-Rad	475	100,0 %	95,1 %	99,0 %	100,0 %
	Microplaca	475	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	Portaobjetos	444	100,0 %	97,4 %	99,5 %	100,0 %
Anti-e	Tubo de ensayo	474	100,0 %	94,7 %	99,8 %	100,0 %
	Ortho	474	100,0 %	94,7 %	99,8 %	100,0 %
	Bio-Rad	474	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	Microplaca	474	99,8 %	94,7 %	99,8 %	94,7 %
	Portaobjetos	443	99,5 %	94,7 %	99,8 %	90,0 %

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 t**écnicas recomendadas** debe validarse antes de su uso[5].

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. 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
4. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
5. 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.

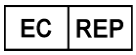
TAMAÑOS DE REACTIVOS DISPONIBLES

	Tamaño del vial	Número de catálogo	Pruebas por vial
Anti-C Monoclonal	5 ml	690005	100
Anti-E Monoclonal	5 ml	691005	100
Anti-c Monoclonal	5 ml	692005	100
Anti-e Monoclonal	5 ml	693005	100

TABLA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Definición	Símbolo	Definición
	Responsable de la fabricación		Número de catálogo
	Limites de temperatura		Utilizar antes de YYYY-MM-DD
	Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*		Consultar las instrucciones de uso
	Representante autorizado		Número de lote
	Símbolo 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


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