



REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS INSTRUCCIONES DE USO

Monoclonal anti-C, anti-E, anti-c y anti-e: 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.

USO PREVISTO

Los reactivos Rh son reactivos utilizados para la determinación de grupos sanguíneos que tienen la finalidad de comprobar cualitativamente 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 incluidas en estas instrucciones de uso.

PRINCIPIO

Los reactivos contienen anticuerpos contra el antígeno Rhesus correspondiente en los hematíes humanos y provocarán una aglutinación (agrupación) directa de los hematíes portadores del correspondiente antígeno Rh. La ausencia de aglutinación (ausencia de agrupación) indica en general la ausencia del antígeno Rh correspondiente (véanse las **Limitaciones**).

REACTIVOS

Los reactivos monoclonales IgM anti-Rh de Lorne para la determinación de grupos sanguíneos son reactivos bajos en proteínas que contienen anticuerpos monoclonales humanos diluidos con cloruro sódico, albúmina bovina y potenciadores macromoleculares (4,0 g%). Los reactivos no contienen ni están compuestos de sustancias CMR, sustancias que alteran el funcionamiento del sistema endocrino, o que podrían 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 vial**.

Reactivo	Línea celular/Clon
Anti-C	MS-24
Anti-E	MS-258
Anti-c	MS-33
Anti-e	MS-16 + MS-63

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 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

- 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 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.
- 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. 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

- Se recomienda analizar un control positivo (idealmente heterocigoto) y un control negativo en paralelo con cada lote de análisis. Los análisis deben considerarse no válidos si los controles no muestran los resultados esperados.
- Cuando se tipifican eritrocitos de pacientes de los que se sabe o se sospecha que tienen autoanticuerpos, anomalías proteicas o una Prueba de Antiglobulina Directa (DAT) positiva, es importante que se analice en paralelo un control negativo de reactivo. Para el control negativo del reactivo, solo debe utilizarse el control monoclonal Rh de Lorne, número de catálogo 640010.
- Es posible que las técnicas en tarjetas de gel, placas de microtitulación y portaobjetos no detecten de manera eficaz los antígenos Rhesus débiles. Se recomienda que los antígenos Rh débiles se analicen mediante la técnica de análisis en tubo.
- Antes de su uso, 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 cuentagotas del vial suministrado.
- La utilización de los reactivos y la interpretación de los resultados deben llevarse a cabo por personal cualificado y formado de acuerdo con 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 x 75 mm o 12 x 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: R₁r (control positivo) y rr (control negativo).
Monoclonal anti-E: R₂r (control positivo) y rr (control negativo).
Monoclonal anti-c: R₁r (control positivo) y R₁R₁ (control negativo).
Monoclonal anti-e: R₂r (control positivo) y R₂R₂ (control negativo).

Técnica de microtipado en Bio-Rad-ID

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

Técnica de tipado en Ortho Biovue

- Casetas del equipo Ortho BioVue (neutros).
- Centrífuga del sistema Ortho BioVue.
- Diluyente de hematíes Ortho 0,8 %.

Técnica en placa de microtitulación

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

Técnica en portaobjetos

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

Todas las técnicas

- Pipetas volumétricas.

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 Lorne Anti-Rh y 1 volumen de la suspensión de hematíes.
- 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, 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 de 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 la tarjeta ID de NaCl/enzimas/aglutininas frías según resulte necesario.
3. Añadir en el microtubo correspondiente: 50 µl de la suspensión de hematíes y 25 µl del reactivo Lorne Anti-Rh.
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. Retire el papel de aluminio de tantas cámaras de reacción del casete neutro como sea necesario.
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, 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 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 x 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 transcurrido un 1 minuto sobre una luz difusa y no confundir las fibras de fibrina con la aglutinación.
6. Cualquier reacción débil debe repetirse con la técnica en tubo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. **Positivo:** La aglutinación de los eritrocitos constituye un resultado positivo de la prueba y, dentro de las limitaciones aceptadas del procedimiento de prueba, indica la presencia del antígeno Rh apropiado en los eritrocitos.
2. **Negativo:** La ausencia de aglutinación de los eritrocitos constituye un resultado negativo y, dentro de las limitaciones aceptadas del procedimiento de prueba, indica la ausencia del antígeno Rh apropiado en los eritrocitos.
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 todos los análisis realizados en microplacas y tubos inmediatamente tras la centrifugación.
2. Los análisis en portaobjetos deben interpretarse dentro 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 interpretarse 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 anti-i/I de aglutinina fría, en particular con células del cordón umbilical o células tratadas con enzimas. Esto puede ponerse de manifiesto si las pruebas se incuban por debajo de la temperatura 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 R₂R_z. De forma similar, Anti-e puede provocar reacciones sensiblemente más débiles en ausencia del antígeno C, p. ej., R₂r, 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. También pueden darse falsos positivos o falsos negativos en los resultados 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 fuente se demuestra utilizando un perfil de células antígeno-negativas.
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 fueron lavados en PBS o solución salina isotónica antes de su uso.

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

1. El usuario es responsable del funcionamiento de los reactivos en cualquier otro método distinto de los mencionados como **técnicas recomendadas**.
2. Cualquier desviación de las **técnicas recomendadas** debe validarse antes de su uso⁵.

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
Monoclonal anti-C	5 ml	690005	100
	1000 ml	690000*	20.000
Monoclonal anti-E	5 ml	691005	100
	1000 ml	691000*	20.000
Monoclonal anti-c	5 ml	692005	100
	1000 ml	692000*	20.000
Monoclonal anti-e	5 ml	693005	100
	1000 ml	693000*	20.000

*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



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