

**REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA**

**CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE
MEDICAMENTOS, EQUIPOS Y DISPOSITIVOS MÉDICOS**

REGULACIÓN No. 59-2011

REQUISITOS DE LOS DIAGNOSTICADORES UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA

CONTENIDO

1	Generalidades.....	3
2	Definiciones	3
3	Requisitos generales para los productos usados en Inmunohematología.....	4
4	Requisitos específicos de los hemoclasificadores del sistema ABO (anti-A, anti-B, anti-AB).....	6
5	Requisitos específicos de los hemoclasificadores del antígeno D del Sistema Rh ₀ (anti-D).....	7
6.	Requisitos específicos de los sueros hemoclasificadores de otros antígenos del Sistema Rh (anti-C, -c, -E, -e, -C ^w) monoclonales, policlonales humanos o de origen animal.....	9
7	Requisitos específicos de los sueros hemoclasificadores anti-K, -k, -Fy ^a , -Fy ^b , -Jk ^a , -Jk ^b , -S, -s, -M, -N, -Le ^a , -Le ^b , y anti-P ₁ , monoclonales, policlonales humanos o de origen animal.....	10
8	Requisitos específicos de los sueros antiglobulínicos humanos (Suero de Coombs).....	12
9	Ensayo de terreno de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos (anti-A, -B, -AB, -D, -C, -c, -E, -e, -C ^w , -K, -k, -Fy ^a , -Fy ^b , -Jk ^a , -Jk ^b , -S, -s, -M, -N, -Le ^a , -Le ^b , y anti-P ₁ ,)....	14
10	Bibliografía	15
	ANEXO 1. Determinación del título promedio por el método del logaritmo de base 2 (log ₂)..	17
	ANEXO 2. Cálculo de la especificidad y de sensibilidad clínica.....	17

1 Generalidades

Internacionalmente se reconoce que los sueros hemoclasificadores y los antiglobulínicos son diagnosticadores que tienen asociado un alto riesgo para el paciente, en caso de producirse una falla en su funcionamiento, pues esto podría provocar un daño importante e incluso la muerte del paciente. En Cuba, estos productos están clasificados en el Categoría III (máximo riesgo), según la Regulación "Clasificación de los Diagnosticadores por Categoría de Riesgo" vigente. Por ello, la Autorización de Comercialización (AC) de estos productos requiere evidenciar que los mismos cumplen determinados requisitos específicos, además de los requisitos generales vigentes para este fin, comunes a la mayoría de los diagnosticadores.

El objetivo de este documento es actualizar los requisitos que el CECMED considera necesarios para evaluar los diagnosticadores que se utilizan en Inmunoematología. Es aplicable a los diagnosticadores diseñados para ese fin, que se comercialicen en el territorio nacional, sean fabricados en el país o importados. Esta regulación sustituye al documento "Recomendaciones para la evaluación de los Diagnosticadores para uso en Inmunoematología", puesta en vigor mediante la Resolución no.5 de 1997 del Director del CECMED y complementa lo establecido en la Regulación vigente "Requisitos Generales para el Registro de los Diagnosticadores".

Esta Regulación está basada en documentos vigentes de autoridades reguladoras de la Unión Europea y Estados Unidos, así como en recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, convenientemente adaptadas. Consta de 10 apartados y dos anexos en sus 17 páginas.

2 Definiciones

A los efectos de esta regulación se considera:

- 2.1 **Anticuerpos irregulares.** Anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos diferentes al ABO.
- 2.2 **Antígeno B adquirido.** Eritrocitos de grupo A₁, que expresan el antígeno B por deacetilación del antígeno A; se encuentran en pacientes con antecedentes de carcinoma de colon o de infecciones gastrointestinales.
- 2.3 **Avidez.** Es el tiempo que media entre la mezcla del reactivo con los eritrocitos y la aparición de la aglutinación.
- 2.4 **Categorías D.** Variantes del antígeno D que carecen de algunos de los epítopes del antígeno.
- 2.5 **Diagnosticadores utilizados en Inmunoematología.** Son los reactivos utilizados en el estudio de los antígenos y de los anticuerpos de los grupos sanguíneos humanos.
- 2.6 **Ensayo de Terreno.** Evaluación del desempeño con características específicas y muestras seleccionadas para corroborar las características funcionales de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos.
- 2.7 **Especificidad.** La capacidad del producto para identificar correctamente las muestras carentes del antígeno en cuestión.
- 2.8 **Fenómeno Rouleaux.** Falsa reacción de aglutinación, donde los eritrocitos se agrupan en formación de "pilas de monedas".
- 2.9 **Fenotipos A₁ y A₁B.** Son los eritrocitos de grupo A y AB que reaccionan con anti-A₁, y no reaccionan con anti-H.
- 2.10 **Fenotipos A₂ y A₂B.** Son los eritrocitos de grupo A y AB que no reaccionan con anti-A₁ y reaccionan con anti-H.
- 2.11 **Fenotipo D débil (D^u).** Expresión débil del antígeno Rh_o(D).

- 2.12 **Grados de la reacción de aglutinación.** Valores numéricos que se le asignan a la intensidad de la aglutinación y se expresan de la siguiente forma:
- 4+ Aglutinación total de los eritrocitos en un sólo cúmulo grande en un fondo claro.
 - 3+ Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro.
 - 2+ Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.
 - 1+ Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.
 - ±: Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos. Para los propósitos de este documento, esta reacción es negativa.
 - 0 No aglutinación.
- 2.13 **Monoclonales.** Son aquellos productos obtenidos a partir de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales.
- 2.14 **Policlonales.** Son aquellos diagnosticadores obtenidos por inmunización a humanos o a animales con antígenos de los grupos sanguíneos.
- 2.15 **Potencia.** Es el recíproco de la mayor dilución del reactivo que provoca una reacción de aglutinación de 1+.
- 2.16 **Prozona.** Es el término usado para definir la ausencia o la presencia de aglutinaciones débiles en exceso de anticuerpos.
- 2.17 **Salina.** A los efectos de este documento es una solución isotónica que contiene de 8,5 a 9 g/L de cloruro de sodio y tiene un pH de $7,0 \pm 0,2$ a temperatura de 22 ± 1 °C.
- 2.18 **Solución de baja fuerza iónica (LISS).** Solución que contiene 0,003 M de cloruro de sodio en un tampón fosfato 0,003 M de fosfato dibásico de sodio y fosfato monobásico de sodio y 0,2 M de glicina, de pH 6,7 a 22 ± 1 °C.
- 2.19 **Sueros antiglobulínicos.** Reactivos obtenidos por inmunización a animales o reactivos monoclonales con anticuerpos contra las inmunoglobulinas humanas o el fragmento C₃ del complemento, conocidos como suero de Coombs.
- 2.20 **Sueros hemoclasificadores.** Son los productos utilizados en la determinación de los antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios.

3 Requisitos generales para los productos usados en Inmunoematología

3.1 Características fisicoquímicas

El producto terminado deberá clarificarse mediante filtración; será transparente, estará libre de partículas y contendrá algún preservante antimicrobiano apropiado.

3.2 Envase primario

El producto terminado se envasará en frascos gotero de vidrio neutro transparente.

3.3 Estabilidad

El producto mantendrá la actividad biológica y las características fisicoquímicas durante el período de validez declarado, a la temperatura de conservación recomendada por el fabricante. El estudio de estabilidad se realizará acorde a las normas y regulaciones vigentes.

3.4 Reproducibilidad

- a. Se estudiará la reproducibilidad de los diagnosticadores utilizados en Inmunoematología considerando el número de muestras y las características de las mismas que se describe en los apartados 4 al 8 de esta regulación.

- b. En los estudios se incluirá un material de referencia apropiado, de carácter internacional o, en su defecto, uno que cuente con la AC del CECMED y la trazabilidad con su correspondiente estándar internacional. Los resultados discrepantes entre el producto en estudio y el material de referencia serán analizados para investigar las causas de las discrepancias.

3.5 Rotulado

El rotulado de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología cumplirá con lo establecido en la Regulación "Requisitos para el Registro Sanitario de los Diagnosticadores" vigente y con los requisitos específicos descritos en los apartados 4 al 8 de este documento.

3.6 Colorantes

Los colorantes utilizados en los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos cumplirán con los requisitos específicos descritos en los apartados 4 al 8 de esta regulación y además:

- a. No afectarán las características biológicas del producto.
- b. Mantendrán la coloración del producto sin cambios significativos durante el período de validez del mismo.
- c. Permitirán la observación del contenido y la detección de partículas o turbiedad en el producto durante el uso.

3.7 Evaluación del desempeño.

- 3.7.1 Los estudios para demostrar la evaluación del desempeño de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos se realizarán siguiendo la metodología establecida en la Regulación "Requisitos para la Evaluación del Desempeño de los Diagnosticadores" vigente del CECMED.
- 3.7.2 Los protocolos correspondientes de las evaluaciones del desempeño descritas en el apartado 3.7 de esta regulación serán aprobados por el CECMED previo a la realización de las mismas.
- 3.7.3 Se realizará una evaluación del desempeño *in situ* de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos, en la cual se considerarán los requisitos generales y específicos descritos en los apartados 4 al 8 de esta regulación, como requerimiento indispensable para obtener la AC de dichos diagnosticadores.
- 3.7.4 Se realizará un Ensayo de Terreno después de haber obtenido la AC de los diagnosticadores correspondientes. Los requerimientos específicos del Ensayo de Terreno se describen en el apartado 9 de esta regulación.
- 3.7.5 EL CECMED podría eximir al fabricante de la realización de un Ensayo de Terreno, si durante el proceso de AC se hubieran presentado evidencias que demuestren los resultados satisfactorios de la validación del producto.

3.8 Liberación de lotes por el CECMED

Cada lote, fabricado en el país o importado, de cualquiera de los productos contemplados en el alcance de esta regulación será evaluado por el CECMED para verificar que se cumplen los requisitos de potencia, avidéz, especificidad, colores, rotulado y el efecto prozona en el caso del anti-D, con posterioridad a la obtención de la AC y previo a la distribución de cada lote hacia las unidades asistenciales del SNS.

4 Requisitos específicos de los hemoclasificadores del sistema ABO (anti-A, anti-B, anti-AB)

4.1 Potencia

4.1.1 La potencia se determinará mediante la técnica de tubo con centrifugación, incubando 5 minutos a un intervalo de temperatura de 20 a 30 °C. El diluyente utilizado será salina con albúmina bovina al 2 % y suspensión de los eritrocitos al 2 %.

4.1.2 La potencia mínima requerida y la cantidad de muestras a ensayar por fenotipo se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Potencia mínima y cantidad de muestras requeridas para el ensayo según el fenotipo ABO.

SUEROS	Potencia mínima y cantidad de muestras requeridas (X)				
	A ₁	A ₂	A ₁ B	A ₂ B	B
anti-A	≥ 512 (1)	-	-	≥ 512 (3)	-
anti-B	-	-	≥ 512 (3)	-	≥ 512 (1)
anti-AB	≥ 512 (1)	≥ 512 (2)	-	-	≥ 512 (2)

4.1.3 El suero que no cumpla con los requerimientos de potencia con alguna muestra en particular será analizado nuevamente con 4 muestras de eritrocitos de diferentes individuos de igual fenotipo al de la muestra discrepante.

4.1.4 No se aceptará aquel producto que después de repetirse el ensayo no cumpla con los requerimientos de potencia con más de una muestra del total de fenotipos utilizados.

4.2 Aidez

4.2.1 La avidez se determinará mezclando un volumen del suero con un volumen de la suspensión al 40% de los eritrocitos en salina a temperatura ambiente.

4.2.2 Se observarán aglutinados en un intervalo ≤ 30 s. Los aglutinados tendrán un diámetro ≥ 1 mm a los 2 minutos, según inspección visual.

4.2.3 La cantidad de muestras a ensayar para la avidez será la misma descrita en la Tabla 1.

4.3 Especificidad.

4.3.1 La cantidad mínima de muestras requerida por fenotipo para determinar la especificidad será el indicado en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidad de muestras requeridas para determinar la especificidad según el fenotipo ABO.

SUEROS	Cantidad de muestras requeridas para el ensayo de especificidad según fenotipo					
	A ₁	A ₂	A ₁ B	A ₂ B	B	O
anti-A	2	-	-	2	2	2
anti-B	2	-	2	-	2	2
anti-AB	1	2	-	-	2	4

4.3.2 Los hemoclasificadores del sistema ABO, cualquiera sea el método de ensayo, cumplirán con los siguientes requisitos:

- a. Aglutinarán con $\geq 2+$ con todas las muestras de eritrocitos que contengan el antígeno específico.
- b. No aglutinarán con los eritrocitos carentes del antígeno.
- c. No presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos: H, I, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b P₁, D, C, c, E, e, C^w, M, N, S, s, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a.
- d. No poseerán actividad hemolítica ni provocarán fenómeno Rouleaux.
- e. No aglutinarán a eritrocitos de grupo O con prueba de Coombs directa de 3+ a 4+ obtenidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune o preparados in vitro.

4.4 Reproducibilidad

- a. Se estudiarán no menos de 300 muestras de sangre de donantes en cada uno de los métodos para los que se recomienda el producto.
- b. El grupo sanguíneo ABO de estas muestras será verificado determinando las isoaglutininas en el plasma o suero del donante.

4.5 Código de colores

Se utilizará el indicado en la Tabla 3.

Tabla 3. Código de colores requerido para los hemoclasificadores del sistema ABO.

PRODUCTO	Color del suero	Color de las etiquetas
Anti-A	azul	azul
Anti-B	amarillo	amarillo
Anti-AB	rojo o no coloreado	rojo

4.6 Rotulado

- 4.6.1 Debe cumplir con lo descrito en el apartado 3.5 de esta regulación y además, en las etiquetas de los envases primario y secundario y en la literatura interior aparecerá:
 - a. La palabra "**Monoclonal**", si fuera obtenido en ratones, también la palabra "**murino**" o "**humano**" si fuera obtenido en linfocitos humanos inmortalizados.
 - b. La frase "**Para prueba en tubo o en lámina**".
 - c. La clase o clases de inmunoglobulinas de los anticuerpos monoclonales.
- 4.6.2 En la literatura interior se incluirá, además, el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados.

5 Requisitos específicos de los hemoclasificadores del antígeno D del Sistema Rh₀ (anti-D).

5.1 Potencia

- 5.1.1 La potencia se determinará mediante la técnica de tubo con centrifugación, incubando 5 minutos a un intervalo de temperatura 20 a 30 °C o 37 °C. El diluyente utilizado será salina con albúmina bovina al 2 % y suspensión de los eritrocitos al 2 %.
- 5.1.2 La potencia requerida será ≥ 512 con eritrocitos del fenotipo Ror (ccDee).
- 5.1.3 El producto que no cumpla el requisito de potencia será analizado nuevamente con eritrocitos de 4 individuos de igual fenotipo.

5.1.4 No se aceptará aquel producto que después de repetirse el ensayo no cumpla con el requisito de potencia con más de una muestra del total de eritrocitos utilizados.

5.2 Avidéz

5.2.1 La avidéz se determinará mezclando un volumen del suero con dos volúmenes de la suspensión al 50% en salina de eritrocitos de fenotipo Ror (ccDee) e incubarlo a temperatura ambiente sobre una lámpara para facilitar la lectura.

5.2.2 Se observarán aglutinados en un intervalo ≤ 30 s. Los aglutinados tendrán un diámetro ≥ 1 mm a los 2 minutos, según inspección visual.

5.3 Especificidad

5.3.1 Los sueros anti-D cumplirán los siguientes requisitos:

- a. Aglutinarán con $\geq 2+$ con 2 muestras de eritrocitos de fenotipo CcDee(R₁r) y ccDee(Ror).
- b. No aglutinarán eritrocitos de fenotipo Ccddee(r'r); ccddEe(r'r) y A₁ccddee; Bccddee o A₁Bccddee y Occddee(rr).
- c. Aglutinarán con $\geq 2+$ con 2 muestras de eritrocitos de fenotipo D débil en la técnica de aglutinación en tubo o en la prueba de antiglobulina indirecta (Coombs), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- d. No presentarán anticuerpos contra los antígenos H, I, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b P₁, C, c, E, e, C^w, M, N, S, s, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a.
- e. No poseerán actividad hemolítica ni provocarán fenómeno Rouleaux.

5.4 Reproducibilidad

Se estudiarán no menos de 350 muestras de donantes de sangre en cada uno de los métodos para los cuales se recomienda el producto.

5.5 Prozona

Los sueros anti-D no mostrarán disminución de la aglutinación con el incremento del tiempo de incubación al estudiarse con eritrocitos de fenotipo R₁r en la técnica en tubo y en tiempos de incubación de 15, 30 y 60 minutos. En todos los tiempos la aglutinación será $\geq 2+$.

5.6 Código de colores

- a. Al suero anti-D no se le adicionará ningún colorante.
- b. La etiqueta de los envases primario y secundario será de color gris.

5.7 Rotulado

5.7.1 Debe cumplir con lo descrito en el apartado 3.5 de esta regulación y además, en la etiqueta de los envases primario y secundario y en la literatura interior aparecerá:

- a. La palabra "**Monoclonal**" y, si se tratara de una mezcla de anticuerpos monoclonales, se agregará la palabra "**mezclado**".
- b. La frase "**Para prueba en tubo o en lámina**".
- c. La clase o clases de inmunoglobulinas de los anticuerpos monoclonales.

5.7.2 En la literatura interior se incluirá, además, el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados.

6. Requisitos específicos de los sueros hemoclasificadores de otros antígenos del Sistema Rh (anti-C, -c, -E, -e, -C^w) monoclonales, policlonales humanos o de origen animal.

6.1 Potencia

- 6.1.1 La potencia se determinará en la técnica de tubo de acuerdo al método que recomiende el fabricante.
- 6.1.2 La potencia requerida será un título no menor de 1:8 con eritrocitos de los fenotipos que se expresan a continuación:

Tabla 4. Cantidad de muestras requeridas para el ensayo de potencia.

Sueros	Fenotipos	
anti-C	CcDEe (1)	Ccdee (1)
anti-c		CcDee (1)
anti-E		ccdEe (1)
anti-e		ccDEe (1)
anti-C ^w	C ^w cDee (1)	C ^w cdee (1)

6.2 Aidez

- 6.2.1 La avidez se le realizará únicamente a los productos recomendados en la técnica de lámina.
- 6.2.2 La avidez se determinará mezclando un volumen del suero con un volumen de la suspensión al 40% de los eritrocitos en salina a temperatura ambiente.
- 6.2.3 Se observarán signos de aglutinación a la mitad del tiempo que recomienda el fabricante con diámetro ≥ 1 mm en el tiempo recomendado, según inspección visual.
- 6.2.4 La cantidad de muestras a ensayar para la avidez será la misma descrita en la Tabla 4.

6.3 Especificidad

- 6.3.1 La cantidad mínima de muestras requerida por fenotipo para determinar la especificidad será el indicado en la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidad de muestras (x) requeridas según fenotipo para el ensayo de especificidad.

Sueros	Fenotipos (x) reacción +	Fenotipos (x) reacción -
anti-C	CcDEe (2), CcDEE (1), Ccdee (1)	ccDEE(1), ccdEe (1), ccdee (1)
anti-c	CcDEe (1), CcDee (2)	CCDee (1), CCDEe (2)
anti-E	CcDEe (2), CCDEe(1)	CCDee (1), Ccdee (1), ccdee (1)
anti-e	ccDEe (2), CcDEe (2)	ccDEE (1), CcDEE (2)
anti-C ^w	C ^w cDee (2)	ccDee (1), ccdee (1)

- 6.3.2 Los sueros hemoclasificadores anti-C, -c, -E, -e, -C^w en todos los métodos para los cuales se recomienda el producto, deben cumplir con los siguientes requisitos:
- Agglutinarán con $\geq 2+$ con todas las muestras que expresen el antígeno específico y reacción negativa con todas las muestras negativas para el antígeno.
 - No presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos A,B,H, I, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b P₁, M,N, S, s, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a.

- c. No poseerán actividad hemolítica ni provocarán fenómeno Rouleaux.
- 6.3.3 Los reactivos salinos no aglutinarán eritrocitos de grupo O, carentes del antígeno específico con prueba de Coombs directa positiva de 3 + a 4 +.
- 6.4 Reproducibilidad
Se estudiarán no menos de 50 muestras de sangre de donantes en todos los métodos para los que se recomienda el producto.
- 6.5 Código de colores
Los sueros anti-C, -c, -E, -e, -C^w no tienen requisitos específicos de colores.
- 6.6 Rotulado
- 6.6.1 Debe cumplir con lo descrito en el apartado 3.5 de esta regulación y además, en la etiqueta de los envases primario y secundario y en la literatura interior aparecerá:
- La palabra **Policlonal humano** o **Policlonal** con el nombre del animal donde se obtuvo, "**Monoclonal humano o murino**" y, si se tratara de una mezcla de anticuerpos monoclonales, se agregará la palabra "**mezclado**".
 - La frase "**Para prueba en tubo o en lámina**".
 - La clase o clases de inmunoglobulinas de los anticuerpos.
- 6.6.2 En la literatura interior, además, se indicará el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados.
- 7 Requisitos específicos de los sueros hemoclasificadores anti-K, -k, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁, monoclonales, policlonales humanos o de origen animal.**

7.1 Potencia

- 7.1.1 La potencia se determinará en la técnica de tubo de acuerdo al método que recomiende el fabricante.
- 7.1.2 La potencia requerida será un título no menor de 1:8 con eritrocitos de los fenotipos que se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Cantidad de muestras (x) requeridas para el ensayo de potencia.

Sueros	Fenotipos (x)
anti-K	K+k+ (1)
anti-k	K+k+ (1)
anti-Fy ^a	Fy(a+b+) (1)
anti-Fy ^b	Fy(a+b+) (1)
anti-Jk ^a	Jk(a+b+) (1)
anti-Jk ^b	Jk(a+b+) (1)
anti-S	S+s+ (1)
anti-s	S+s+ (1)
anti-M	M+N+ (1)
anti-N	M+N+ (1)
anti-Le ^a	Le(a+b-) (1)
anti-Le ^b	Le(a-b+) (1)

7.2 Avidéz

- 7.2.1 La avidéz se le realizará únicamente a los productos recomendados en la técnica de lámina.

7.2.2 La avidéz se determinará mezclando un volumen del suero con un volumen de la suspensión al 40% de los eritrocitos en salina a temperatura ambiente.

7.2.3 Se observarán signos de aglutinación a la mitad del tiempo que recomienda el productor y se observarán aglutinados no menores que 1 mm de diámetro en el tiempo recomendado, según inspección visual.

7.2.4 La cantidad de muestras a ensayar para la avidéz será la misma descrita en la Tabla 6.

7.3 Especificidad

7.3.1 La cantidad mínima de muestras requerida por fenotipo para determinar la especificidad será el indicado en la Tabla 7.

Tabla 7. Cantidad de muestras (x) requeridas según fenotipo para el ensayo de especificidad.

Sueros	Fenotipos (x) reacción +	Fenotipos (x) reacción -		Sueros	Fenotipos (x) reacción +	Fenotipos (x) reacción -
anti-K	K+k+ (4)	K-k+ (4)		anti-S	S+s+ (4)	S-s+ (4)
anti-k	K+k+ (4)	K+k- (4)		anti-s	S+s+ (4)	S+s- (4)
anti-Fy ^a	Fy(a+b+) (4)	Fy(a-b+) (4)		anti-M	M+N+ (4)	M-N+ (4)
anti-Fy ^b	Fy(a+b+) (4)	Fy(a+b-) (4)		anti-N	M+N+ (4)	M+N- (4)
anti-Jk ^a	Jk(a+b+) (4)	Jk(a-b+) (4)		anti-Le ^a	Le(a+b-) (4)	Le(a-b+) (4)
anti-Jk ^b	Jk(a+b+) (4)	Jk(a+b-) (4)		anti-Le ^b	Le(a-b+) (4)	Le(a+b-) (4)
				anti-P ₁	P ₁ + (4)	P ₁ - (4)

7.3.2 Los sueros hemoclasificadores anti -K, -k, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁, en todos los métodos para los cuales se recomienda el producto, deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Aglutinarán con $\geq 2+$ con todas las muestras que expresen el antígeno específico y reacción negativa con todas las muestras negativas para el antígeno.
- Los reactivos anti-K, -k, no presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos A,B,H, I, D, C, c, E, e, C^w, Le^a, Le^b, Kp^b, Js^b P₁, M,N, S, s, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a.
- Los reactivos anti--Fy^a, -Fy^b no presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos A,B,H, I, D, C, c, E, e, C^w, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b P₁, M,N, S, s, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Xg^a.
- Los reactivos anti-Jk^a, -Jk^b no presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos A,B,H, I, D, C, c, E, e, C^w, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b P₁, M,N, S, s, U, Lu^b, Fy^a Fy^b, Xg^a.
- Los reactivos anti-S, -s, no presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos A,B,H, I, D, C, c, E, e, C^w, Le^a, Le^b, K,k, Kp^b, Js^b P₁, M,N, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a.
- Los reactivos anti- Le^a, Le^b, no presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos A,B,H, I, D, C, c, E, e, C^w, K,k, Kp^b, Js^b P₁, M,N, S, s, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a.
- Los sueros anti-M y anti-N no presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos H, I, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b P₁, D, C, c, E, e, C^w, S, s, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a.

- h. Los sueros anti-P₁ no presentarán anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos H, I, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b D, C, c, E, e, C^w, M, N, S, s, U, Lu^b, Jk^a Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a.
 - i. No poseerán actividad hemolítica ni provocarán fenómeno Rouleaux.
- 7.3.3 Los reactivos salinos no aglutinarán eritrocitos de grupo O, carentes del antígeno específico con prueba de Coombs directa positiva de 3 + a 4 +.
- 7.4 Reproducibilidad
- Se estudiarán no menos de 50 muestras de sangre de donantes en todos los métodos para los que se recomienda el producto.
- 7.5 Código de colores
- Los sueros anti -K, -k, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁, no tienen requisitos específicos de colores.
- 7.6 Rotulado
- 7.6.1 Debe cumplir con lo descrito en el apartado 3.5 de esta regulación y además, en la etiqueta de los envases primario y secundario y en la literatura interior aparecerá:
- a. La palabra **Policlonal humano** o **Policlonal** con el nombre del animal donde se obtuvo, "**Monoclonal humano o murino**" y, si se tratara de una mezcla de anticuerpos monoclonales, se agregará la palabra "**mezclado**".
 - b. La frase "**Para prueba en tubo o en lámina**".
 - c. La clase o clases de inmunoglobulinas de los anticuerpos.
- 7.6.2 En la literatura interior, además, se indicará el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados.

8 Requisitos específicos de los sueros antiglobulínicos humanos (Suero de Coombs).

8.1 Clasificación

Para su evaluación los sueros antiglobulínicos se clasifican en los siguientes grupos:

- a. **Grupo I:** Suero antiglobulina humano poliespecífico (anti IgG, C₃). En ocasiones pueden presentar actividad anti-IgA.
- b. **Grupo II:** Suero anti-IgG.
- c. **Grupo III:** Suero anticomplemento (C₃).

8.2 Potencia

- 8.2.1 En el estudio de potencia de los sueros del **Grupo I y II** se utilizarán sueros anti-D y anti-Fy^a (de la Clase IgG) con un título ≥ 16 y ≤ 64 en la prueba de antiglobulina indirecta.
- 8.2.2 Los sueros del **Grupo I y II** y la dilución 1:2 y 1:4 de los mismos aglutinarán eritrocitos de grupo O Rh₀ (D) positivos, Fy(a+b+) sensibilizados con la dilución 1:16 o 1:64 (en dependencia del título de los anticuerpos utilizados) de anti-D y anti-Fy^a.
- 8.2.3 Los sueros del **Grupo I y III** aglutinarán eritrocitos recubiertos con C₃b en títulos no menor que 4 y con un título no menor que 1:1 y reacción de 2 + de aglutinación con eritrocitos recubiertos con C₃d.
- 8.2.4 Los sueros del **Grupo I** con actividad anti-IgA aglutinarán en un título no menor que 4 a eritrocitos recubiertos de IgA.

8.3 Especificidad

8.3.1 Los sueros del **Grupo I** no aglutinarán a eritrocitos recubiertos con C₄d.

8.3.2 Los sueros del **Grupo II** no aglutinarán a eritrocitos recubiertos con C₃b, C₃d, C₄d.

8.3.3 Los sueros del **Grupo III** no aglutinarán eritrocitos recubiertos con IgG y C₄d.

8.3.4 Los sueros de los **Grupos I, II y III**:

- a. No aglutinarán ni hemolizarán a eritrocitos de los grupos A₁, B y O a temperaturas de 4 °C, de 20 a 30 °C y 37 °C, en un tiempo de incubación de 30 minutos.
- b. No aglutinarán ni hemolizarán a eritrocitos de los grupos A₁, B y O tratados con papaína.
Nota: Podrían utilizarse opcionalmente bromelina, ficina o tripsina, además de papaína.
- c. No aglutinarán ni hemolizarán a suspensiones de eritrocitos en salina y en solución de baja fuerza iónica (LISS), provenientes de 2 donantes de cada uno de los grupos A₁, B y O. Los eritrocitos serán colectados del segmento de las unidades de sangre que estén almacenadas entre 2 y 8 °C por un período entre 10 y 15 días.
- d. No reaccionarán en la prueba de antiglobulina indirecta con los eritrocitos referidos anteriormente y el suero de 6 donantes. Los sueros de los donantes serán obtenidos antes de las 24 horas de realizar el estudio, estarán libres de anticuerpos irregulares y serán ABO compatibles con las muestras de los eritrocitos colectados.

8.4 Reproducibilidad

8.4.1 Se estudiará la reproducibilidad mediante la prueba de Coombs directa e indirecta en no menos de 300 muestras de donantes de sangre, 5 muestras de pacientes con anemia hemolítica autoinmune y 5 muestras de pacientes con anticuerpos irregulares.

8.4.2 En el grupo de pacientes con anticuerpos irregulares podrán incluirse muestras de donantes Rh₀ (D) negativos inmunizados para la producción de anticuerpos anti-D y de mujeres Rh₀ (D) negativas aloinmunizadas por embarazos.

8.4.3 De utilizarse muestras provenientes de los grupos señalados en 8.4.2, el estudio comprenderá la determinación del título de anticuerpos anti-D en la prueba de Coombs indirecta y se comparará con los resultados obtenidos con el producto de referencia. Se permitirán diferencias de una dilución inferior en el título con respecto al producto de referencia.

8.5 Código de colores

8.5.1 El suero antiglobulínico poliespecífico puede o no colorearse de verde. A los demás sueros antiglobulínicos no se les añadirá colorante.

8.5.2 El color de la etiqueta se corresponderá con el del suero contenido en el envase.

8.6 Rotulado

8.6.1 Debe cumplir con lo descrito en el apartado 3.5 de esta regulación y además, en la etiqueta de los envases primario y secundario y en la literatura interior aparecerá:

- a. Suero antiglobulina humano poliespecífico (para los diagnosticadores que presentan al menos actividad anti IgG y anti C₃ y estén recomendados para la Prueba de Coombs).
- b. Suero anti IgG o anti C₃ (para los diagnosticadores que presenten una de estas actividades y se recomienden para la Prueba de Coombs).
- c. La frase "**Para la Prueba de Coombs**".

- d. La palabra **Monoclonal**, y, si se tratara de una mezcla de anticuerpos monoclonales, se agregará la palabra "**mezclado**".
 - e. La clase o clases de inmunoglobulinas de los anticuerpos monoclonales contenidos en el suero.
- 8.6.2 En la literatura interior, además, se indicará el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados.

9 Ensayo de terreno de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos (anti-A, -B, -AB, -D, -C, -c, -E, -e, -C^w, -K, -k, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁).

- 9.1 El Ensayo de Terreno se realizará según lo descrito en el apartado 3.7 de esta regulación.
- 9.2 Se evaluarán no menos de dos lotes del producto, en paralelo con otro producto similar que haya sido previamente autorizado por el CECMED.
- 9.3 Se realizará como mínimo en tres sitios diferentes (excluyendo al productor) y que representen áreas geográficas y distribución poblacional diferentes.
- 9.4 De los sitios que se seleccionen, al menos uno debe ser un Banco de Sangre y otro un Servicio de Transfusiones.
- 9.5 Las determinaciones realizadas comprenderán todos los métodos para los cuales se recomienda el producto. Se realizará al menos en un sitio por la técnica de tubo y en uno por la técnica de lámina. Para los sueros antiglobulínicos se realizará únicamente por la técnica de tubo.
- 9.6 En la evaluación de los sueros hemoclasificadores ABO se realizarán las determinaciones de las isoaglutininas para corroborar el grupo sanguíneo.
- 9.7 En la evaluación de los sueros antiglobulínicos se realizará la prueba de Coombs directa y la prueba de Coombs indirecta.
- 9.8 Características de las muestras a estudiar en el ensayo de terreno
 - 9.8.1 Las muestras seleccionadas para la evaluación de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos reunirán las características que se indican en la Tabla 8.
 - 9.8.2 En la evaluación de los sueros hemoclasificadores el 10 % de las muestras seleccionadas de cada grupo corresponderán a eritrocitos carentes del antígeno específico para los anticuerpos evaluados.
 - 9.8.3 Muestras no seleccionadas.
 - a. En la evaluación de los sueros hemoclasificadores ABO y Rh₀(D) se estudiarán al menos 800 muestras de donantes de sangre, de las cuales a 400 se les determinará el grupo sanguíneo con eritrocitos provenientes del coágulo y a 400 con eritrocitos obtenidos en anticoagulante.
 - b. En la evaluación de los sueros anti-C, -c, -E, -e, -C^w, -K, -k, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁, se estudiarán al menos 50 muestras de donantes de sangre con eritrocitos obtenidos en anticoagulante.
 - c. En la evaluación de los sueros antiglobulínicos se estudiarán al menos 100 muestras de donantes de sangre con eritrocitos obtenidos en anticoagulante para la prueba de Coombs directa y el suero para la prueba de Coombs indirecta.

Tabla 8. Características de las muestras seleccionadas.

TIPO DE MUESTRA	No. de muestras a estudiar		
	ABO, Rh ₀ (D)	anti-C, -c, -E, -e, -C ^w , -K, -k, -Fy ^a , -Fy ^b , -Jk ^a , -Jk ^b , -S, -s, -M, -N, -Le ^a , -Le ^b , y anti-P ₁ ,	antiglobulínicos
Conservadas en anticoagulantes durante 28 días	40	10	20
Eritrocitos conservados en glicerol a -20 °C entre una semana y seis meses ^a	20	10	10
De individuos mayores de 70 años	10	10	10
De cordón umbilical	20	10	10
De pacientes con anomalías de las proteínas séricas (embarazadas, mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenström)	20	10	10
De pacientes con anemia hemolítica autoinmune	10	10	10
De pacientes con linfomas y leucemias	10	10	10
Lipémicas	20	10	10
Hemolizadas	20	10 ^c	10 ^c
Tratadas con enzimas ^b	20	no aplicable	10
Con antígeno B adquirido	3	no aplicable	no aplicable
De individuos asiáticos	10	no aplicable	no aplicable

^a Debe eliminarse el glicerol antes de usarlos.

^b No se incluirán en el estudio si el fabricante declara que el reactivo no puede utilizarse en técnicas enzimáticas.

^c Un resultado no satisfactorio con estos grupos de muestras no invalida el producto, pero debe aclararse en la Literatura Interior que los reactivos no pueden utilizarse en muestras de estas características.

9.9 Informe del Ensayo de Terreno.

9.9.1 El informe se elaborará de acuerdo a lo establecido en la Regulación 47-2007 del CECMED y contendrá, además el protocolo utilizado en el estudio.

9.9.2 Se describirá un análisis de las discrepancias encontradas, las cuales deberán ser analizadas para investigar su causa.

9.9.3 Los resultados se compararán en todos los métodos evaluados con los encontrados utilizando el producto de referencia correspondiente. Los resultados se expresarán en especificidad y sensibilidad en todos los procedimientos analizados (Ver Anexo 2).

10 Bibliografía

10.1 Especificaciones Técnicas Comunes para productos sanitarios de diagnóstico in vitro. Diario Oficial de la Unión Europea, 2009/108/CE del 10 de febrero de 2009, modificando a la 2002/364/CE.

10.2 Guidelines for the Blood Transfusion Service. HMSO, London, UK, 2005

10.3 Regulación no.8-2001 Requisitos para el Registro Sanitario de los Diagnosticadores.

10.4 Regulación no.47-2007 Requisitos para la Evaluación del Desempeño de los Diagnosticadores.

- 10.5 Regulación no.50-2008 Clasificación de los Diagnosticadores por Categoría de Riesgo.
- 10.6 US Food and Drug Administration. Recommended Methods for Blood Grouping Reagents Evaluation. Docket No. 845 -0181. March, 1992.
- 10.7 US Food and Drug Administration. Points to Consider in the Design of Field Trials for Blood Grouping Reagents and Anti-Human Globulin. Docket No. 91N - 0467, 1st. Draft, 1992.
- 10.8 US Food and Drug Administration. Recommended Methods for Evaluating Potency, Specificity and Reactivity of Anti-Human Globulin. Docket No. 845 - 0182. March 1992.

ANEXO 1. Determinación del título promedio por el método del logaritmo de base 2 (log₂).
Vennes JW et al: Use of Logarithms to the base 2 in recording serological reactions. Nature 180: 1363; 1957).

Cuando sea necesario dar un resultado de los títulos obtenidos en diferentes muestras de un mismo lote con un fenotipo determinado, o de una muestra con iguales fenotipos de diferentes individuos, se utilizará el método del logaritmo de base 2 para promediar las determinaciones.

Título	Log ₂
no diluído	0
2	1
4	2
8	3
16	4
32	5
64	6
128	7
256	8

Ejemplo	No. de fenotipos	Log ₂
Título de 32 con 3 muestras de eritrocitos de igual fenotipo	3	x 5 = 15
Título de 64 con 2 muestras de eritrocitos de igual fenotipo	2	x 6 = 12
Título de 128 con 1 muestra de eritrocitos de igual fenotipo	1	x 7 = 7
TOTALES	6	34

Este valor se convierte a título de la siguiente forma:

$$\text{Valor del log}_2 = 34/6 = 5,66$$

$$\log_2 5,66 = \log_2 5 + \log_2 0,66$$

$$\log_2 5,66 = 32 + (0,66 \times 32)$$

$$\log_2 5,66 = 32 + 21,12$$

$$\log_2 5,66 = 53,12$$

El título promedio es 53

ANEXO 2. Cálculo de la especificidad y de sensibilidad clínica. *Cura E, Wendel S y col. Manual de Procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los Bancos de Sangre, OPS, 1994.*

Se elaborará una tabla de contingencia de 2 x 2.

	Reactivo de referencia		
Reactivo a evaluar	Positivos	Negativos	Total
Positivos	a (verdaderos positivos)	b (falsos positivos)	a + b
Negativos	c (falsos negativos)	d (verdaderos negativos)	c + d
Total	a + c	b + d	N = a + b + c + d
Sensibilidad = a / a + c		Especificidad = d / b + d	