

ÁMBITO REGULADOR

ÓRGANO OFICIAL REGULADOR
CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE
MEDICAMENTOS, EQUIPOS Y DISPOSITIVOS MÉDICOS

EDICIÓN ORDINARIA

LA HABANA 09/04/2021

AÑO XXII

NÚMERO: 00-390

SUSCRIPCIÓN: ambitor@cecmed.cu

ISSN 1684-1832

INFORMACIÓN A LOS LECTORES: En esta edición de nuestro Boletín se publica lo siguiente:

Contenido	Pág.
RESOLUCIÓN No. 57/2021: Aprueba y pone en vigor la actualización de la Regulación D-59 correspondiente al año 2021 <i>Requisitos de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología.</i>	1
REQUISITOS DE LOS DIAGNOSTICADORES UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA.	2
1. Generalidades.....	2
2. Términos y definiciones.....	3
3. Requisitos generales para los productos usados en Inmunohematología.....	4
3.1 Características generales.....	4
3.2 Envase primario.....	4
3.3 Estabilidad.....	4
3.4 Rotulado.....	4
3.5 Colorantes.....	4
3.6 Criterios de aceptación para el control de la calidad por el fabricante.....	4
3.7 Liberación de lotes por el CECMED.....	4
4. Requisitos para la preparación de eritrocitos, utilizados en el control de reactivos.....	4
5. Requisitos específicos para la evaluación y control de calidad de los hemoclasificadores del sistema ABO (ANTI-A, ANTI-B, ANTI-AB) y del sistema RH (ANTI-D).....	5
5.1 Potencia.....	5
5.2 Avidez.....	5
5.3 Especificidad.....	5
5.4 Código de colores.....	6
5.5 Rotulado.....	6
5.6 Efecto prozona.....	6
6. Requisitos específicos para la evaluación y control de calidad de los sueros hemoclasificadores de otros antígenos del sistema RH (anti-C, -c, -E, -e, -C ^w).	6
6.1 Potencia.....	6
6.2 Avidez.....	7
6.3 Especificidad.....	7
6.4 Código de colores.....	7
6.5 Rotulado.....	7
7. Requisitos específicos para la evaluación y control de calidad de los sueros hemoclasificadores anti-K, -Fy ^a , -Fy ^b , -Jk ^a , -Jk ^b , -S, -s, -M, -N, -Le ^a , -Le ^b , y anti-P ₁	7
7.1 Potencia.....	7
7.2 Avidez.....	8
7.3 Especificidad.....	8

7.4 Rotulado.....	8
7.5 Código de colores.....	9
8. Requisitos específicos para la evaluación y control de calidad de los sueros antiglobulínicos humanos (suero de Coombs).....	9
8.1 Requisitos generales.....	9
8.2 Potencia.....	9
8.3 Especificidad.....	9
8.4 Código de colores.....	10
8.5 Rotulado.....	10
9. Evaluación del desempeño.....	10
10. Control de cambios.....	12
11. Bibliografía.....	12
Anexo I. Soluciones para la preparación de células revestidas con componentes de complemento C3b, C4b, C3d, C4d	14
Anexo II. Determinación del título promedio por el método del logaritmo de base 2 (log ₂).....	15
Anexo III. Cálculo de la especificidad y de sensibilidad clínica.....	16

REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE
MEDICAMENTOS, EQUIPOS Y DISPOSITIVOS MÉDICOS
CECMED

OLGA LIDIA JACOBO CASANUEVA
DIRECTORA

RESOLUCIÓN No. 57/2021

POR CUANTO: Por Resolución No. 153 de fecha 27 de junio del año 2011, emitida por el Ministerio de Salud Pública, se creó el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, en lo adelante CECMED.

POR CUANTO: Por Resolución No. 165 de fecha 14 de abril del año 2014, emitida por el Ministro de Salud Pública, se aprobaron y pusieron en vigor la misión y las funciones que rigen el funcionamiento del CECMED y dispuso en su RESUELVO SEGUNDO apartado 1, Establecer las disposiciones legales, técnicas y administrativas para el ejercicio de las funciones de regulación, fiscalización y vigilancia de productos y servicios para la salud humana así como su implementación, revisión y actualización sistemática en correspondencia con la política nacional y la práctica internacional.

POR CUANTO: Por Resolución No. 2 de fecha 6 de enero del año 2021, dispuesta por el Ministerio de Salud Pública, se promovió a la M. Sc. Olga Lidia Jacobo Casanueva en el cargo de Directora del CECMED.

POR CUANTO: Por Resolución No. 208 de fecha 24 de agosto del año 2011, emitida por el Ministerio de Salud Pública, se designó a la Lic. Liana Figueras Ferradás como Directora Adjunta del CECMED.

POR CUANTO: Por Resolución No. 35 de fecha 5 de octubre del 2011 dispuesta por la Directora Adjunta del CECMED, se aprobó y puso en vigor la Regulación No. 59-2011 *Requisitos de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología*, la cual actualizó los requisitos de los productos usados en inmunohematología, de modo que estén acorde con el estado del arte de esta especialidad en el ámbito internacional y garantizar así la calidad, seguridad y efectividad de los mismos.

POR CUANTO: Por Resolución No. 164 de fecha 2 de diciembre del año 2013, dispuesta por el Director General del CECMED, se aprobó y puso en vigor la Regulación D-08-13 *Requisitos para la Autorización de Comercialización de Diagnosticadores*, la cual establece en el apartado 10.7.3 que los diagnosticadores utilizados para la determinación de los grupos sanguíneos y el suero antiglobulínico cumplirán adicionalmente con lo establecido en la Regulación No. 59 vigente, *Requisitos de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología*.

POR CUANTO: Resulta necesario actualizar los requisitos de los productos usados en Inmunohematología, de modo que estén acorde con el estado del arte de esta especialidad en el ámbito internacional y garantizar así la calidad, seguridad y efectividad de los mismos.

POR TANTO: En el ejercicio de las facultades y atribuciones que me están conferidas, por Resolución No. 2 de fecha 6 de enero del año 2021, emitida por el Ministerio de Salud Pública,

RESUELVO

PRIMERO: Aprobar la actualización de la Regulación No. D-59 correspondiente al año 2021 *Requisitos de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología*, que se adjunta a la presente resolución y forma parte integrante de la misma.

SEGUNDO: Derogar la Resolución No. 35 de fecha 5 de octubre del 2011 dispuesta por la Directora Adjunta del CECMED.

TERCERO: Lo establecido en la presente Resolución entrará en vigor a partir de la fecha de su firma.

COMUNÍQUESE a todos los fabricantes; distribuidores; importadores; y suministradores de Diagnosticadores e instituciones de salud; a las estructuras del CECMED correspondientes; y a cuantas personas naturales o jurídicas proceda.

PUBLÍQUESE en el Ámbito Regulador, órgano oficial del CECMED, para su general conocimiento.

ARCHÍVESE el original de la presente disposición en el registro de resoluciones del Grupo de Asesoría Jurídica del Centro.

DADA en La Habana, a los 26 días del mes de marzo del año 2021.

“Año 63 de la Revolución”.

M. Sc. Olga Lidia Jacobo Casanueva
Directora

Anexo Único

REQUISITOS DE LOS DIAGNOSTICADORES UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA

1. Generalidades

Los sueros hemoclasificadores y el suero antiglobulínico humano (Suero de Coombs), diseñados para la identificación de grupos sanguíneos de los sistemas ABO [A (ABO1), B (ABO2), AB (ABO3)]; Rhesus [RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e)]; Kell [Kel1 (K)]; Kidd [JK1 (Jka), JK2 (Jkb)] y Duffy [FY1 (Fy^a), FY2 (Fy^b)]; válidos también para asegurar la compatibilidad inmunológica de la sangre, los componentes sanguíneos, los tejidos o los órganos destinados a la transfusión o trasplante y en el estudio de enfermedades autoinmunitarias; se clasifican dentro del grupo de mayor riesgo (clase D), según la *Regulación No. 50-2012 Clases de riesgo de los diagnosticadores*, ya que tienen asociado un alto riesgo para el paciente en caso de producirse un fallo en su funcionamiento.

Por otra parte, los sueros que se incluyen en el sistema Rhesus (C^w o V), en el Kell (Cellano (k)), y en los sistemas de grupos sanguíneos MNS o Cartwright; destinados a la identificación de grupos sanguíneos y al tipaje de tejidos; pertenecen a la clase de riesgo C según se establece en la Regulación antes mencionada.

Estos productos son dispositivos médicos para el diagnóstico *in vitro* (DMDIV), conocidos en Cuba como diagnosticadores, los cuales tienen una gran importancia en los laboratorios de Inmunología e Inmunohematología, en los Servicios de Transfusiones y en los Bancos de Sangre del Sistema Nacional de Salud (SNS). Para estos diagnosticadores se establecen requisitos regulatorios específicos que deben ser cumplidos por los fabricantes para obtener la Autorización de Comercialización (AC), así como para autorizar la distribución de cada lote en el SNS, fundamentalmente para aquellos que se incluyen en la clase de riesgo D. A su vez, el Laboratorio Nacional de Control (LNC) verifica el cumplimiento de los mismos durante el proceso de evaluación del desempeño de estos productos y de evaluación analítica de los lotes.

El objetivo de este documento es actualizar los requisitos, que el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) estableció desde el 2011 mediante la Regulación No. 59-2011 para los diagnosticadores que se utilizan en Inmunohematología, según el estado del arte a nivel internacional. Los mismos incluyen las especificaciones de las características fisicoquímicas y funcionales, del envase, el rotulado y la coloración, así como los requisitos necesarios para realizar la evaluación del desempeño y el control de la calidad de dichos diagnosticadores. Es aplicable a todos aquellos que se comercializan en el territorio nacional, sean fabricados en el país o importados.

Esta segunda edición de la *Regulación No. 59-2011 Requisitos de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología*, complementa lo establecido en la *Regulación Requisitos para la Autorización de Comercialización de los Diagnosticadores* vigente. Se adicionan requisitos generales, se modifican algunas

definiciones y requisitos, y se eliminan algunos requisitos que ya no están vigentes a nivel internacional.

2. Términos y definiciones

A los efectos de esta regulación se considera:

- 2.1. **Anticuerpos irregulares:** Anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos diferentes al ABO. (Ver 11.11).
- 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. (*Comunicación Trimestral del Grupo de Diagnóstico Clínico (CDG) de Bio-Rad Latinoamérica Control de Calidad para el Laboratorio Clínico, julio 2014. Discrepancias del Grupo sanguíneo ABO: Causas y resolución.*)
- 2.3. **Avidez:** Tiempo que media entre la mezcla del reactivo con los eritrocitos y la aparición de la aglutinación. (Ver 11.11).
- 2.4. **Ensayo de terreno:** Evaluación del desempeño con características específicas y muestras seleccionadas para corroborar las características funcionales de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos.
- 2.5. **Especificidad:** La capacidad del producto para identificar correctamente las muestras carentes del antígeno en cuestión. (Ver 11.11).
- 2.6. **Efecto prozona:** Es el término utilizado para denotar la ausencia o debilitamiento de la aglutinación con exceso de anticuerpos.
- 2.7. **Fenómeno Rouleaux:** Falsa reacción de aglutinación, donde los eritrocitos se agrupan en formación de pilas de monedas. (Ver 11.19).
- 2.8. **Fenotipos A₁ y A₁B:** Eritrocitos de grupo A y AB que reaccionan con anti-A₁, y no reaccionan con anti-H. (Ver 11.10).
- 2.9. **Fenotipos A₂ y A₂B:** Eritrocitos de grupo A y AB que no reaccionan con anti-A₁ y reaccionan con anti-H. (Ver 11.10).

Nota: Cuando no reaccionan con el anti-A₁ ni con el anti-H, los eritrocitos son A₂B con deficiencia de sustancia H (A₂BH^o).

- 2.10. **Fenotipo D débil:** El término D débil se usa para indicar una expresión debilitada de un antígeno D normal. (Ver 11.11).
- 2.11. **Grados de la reacción de aglutinación:** Valores numéricos que se le asignan a la intensidad de la aglutinación. (Ver 11.11).

Nota: Se expresan de la siguiente forma:

5+ Aglutinación total de los eritrocitos en un sólo cúmulo grande en un fondo claro.

4+ Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro.

3+ Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.

2+ Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.

1+ Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos. Para los propósitos de este documento, esta reacción no se considera positiva.

0 No aglutinación. Reacción negativa.

- 2.12. **Materiales de referencia:** Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas. (*NC-OIML V2:2012, apartado 5.13, modificado.*)
- 2.13. **Monoclonales:** Productos obtenidos a partir de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales. (Ver 11.19).
- 2.14. **Policlonales:** Productos obtenidos por inmunización a humanos o a animales con antígenos de los grupos sanguíneos. (Ver 11.19).
- 2.15. **Potencia:** Es el recíproco de la mayor dilución del reactivo que provoca una reacción de aglutinación de 2+.
- 2.16. **Solución de baja fuerza iónica (LISS):** Solución que contiene cloruro de sodio 0,003 M en un tampón de fosfato dibásico de sodio y fosfato monobásico de sodio 0,003 M y de glicina 0,2 M, de pH 6,5-6,7 a 22 ± 1 °C. (Ver 11.11).
- 2.17. **Solución salina:** Solución isotónica que contiene 8,5 a 9,0 g/L de NaCl (0,145-0,154 M) y debe contener suficiente tampón para mantener un pH de 7,0 ± 0,2 a 22 ± 1 °C durante su vida útil. (Ver 11.11).
- 2.18. **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. (Ver 11.11).
- 2.19. **Sueros hemoclasificadores:** Reactivos utilizados para la determinación cualitativa de los antígenos eritrocitarios.

Nota 1: Pueden contener anticuerpos policlonales o monoclonales (AcM). Los más utilizados en la actualidad y los que se han aprobado para los reactivos que pertenecen a la clase de riesgo D, son los elaborados a partir de AcM ya que reconocen las variantes débiles y tienen una elevada especificidad por los antígenos de los sistemas de grupos sanguíneos. Los que contienen anticuerpos policlonales tienen un alto riesgo de transmisión de determinadas infecciones por vía sanguínea y pueden propiciar la aparición de algunas enfermedades del tipo autoinmune en los donantes. (Ver 11.10).

Nota 2: Pueden aplicarse a sustancias certificadas por entidades reconocidas internacionalmente, paneles de sueros o de células, o muestras clínicas, caracterizados mediante procedimientos analíticos científicamente reconocidos y con una trazabilidad demostrada.

- 2.20. **Reacción inequívoca:** Es una reacción que no es ambigua. En la prueba de hemoaglutinación en tubo, esto se define como una reacción de grado 3+ o superior. En las pruebas de columna esto se define como una reacción 2+. (Ver 11.11).

3. Requisitos generales para los productos usados en Inmunohematología

3.1 Características generales

El producto terminado (suero), clarificado mediante filtración a través de un filtro estéril con un tamaño de poro que no exceda los 0,22 µm, será transparente, estará libre de partículas, tendrá el color correspondiente según el tipo de suero y contendrá algún preservante antimicrobiano apropiado para el almacenamiento a la temperatura recomendada.

3.2 Envase primario

Debe ser un frasco gotero estéril constituido por un material transparente y que no cause el deterioro del suero que contiene, durante todo el período recomendado para su uso por el fabricante.

Nota 1: El envase permitirá realizar la inspección visual del suero para observar el grado de transparencia, la presencia de partículas y el color del mismo.

Nota 2: La tetina de la tapa gotero podrá ser blanca, negra, del color del suero o la etiqueta.

3.3 Estabilidad

El producto debe mantener 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 según la NC-ISO 23640:2018.

3.4 Rotulado

El rotulado de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología debe cumplir con lo establecido para el rotulado de todas las clases de riesgo en la Regulación *Requisitos para la Autorización de Comercialización de los Diagnosticadores* vigente, que procedan, y con los requisitos específicos aplicables descritos en los apartados 5.5, 6.5, 7.4 y 8.5 de este documento.

3.5 Colorantes

Los colorantes utilizados en los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos deben cumplir con los requisitos específicos de color del reactivo descritos en los apartados 5.4, 6.4, 7.5 y 8.4 de esta regulación y además:

- a) No deben afectar las características biológicas del producto.
- b) Deben mantener la coloración del producto sin cambios significativos durante el período de validez del mismo.
- c) Deben permitir la observación del contenido y la detección de partículas o turbidez en el producto durante el uso.

3.6 Criterios de aceptación para el control de la calidad por el fabricante

- a) Cada lote de reactivo debe exhibir resultados inequívocamente positivos o negativos por todas las técnicas recomendadas de acuerdo con los resultados

obtenidos en los datos de evaluación del funcionamiento.

- b) El criterio de liberación por el fabricante debe garantizar que cada lote identifique de manera consistente los antígenos, epítopes y anticuerpos descritos en las especificaciones del reactivo.

3.7 Liberación de lotes por el CECMED

Cada lote, fabricado en el país o importado, de cualquiera de los productos de clase D contemplados en el alcance de esta regulación debe ser evaluado por el CECMED para verificar que se cumplen los requisitos de potencia, avidez, especificidad, color, rotulado, ausencia de formación de Rouleaux, efecto prozona o hemólisis, con posterioridad a la obtención de la AC, previo a la distribución de cada lote hacia las unidades asistenciales del SNS y para dar cumplimiento a lo establecido en la Regulación vigente de Liberación de lotes de diagnosticadores, del CECMED.

4. Requisitos para la preparación de eritrocitos, utilizados en el control de reactivos

- 4.1 Debe confirmarse previamente el fenotipo de los eritrocitos, utilizando un reactivo o material de referencia reconocido.

Nota: Si no hubiera un material reconocido, podría utilizarse un método de la industria o un material preparado in-situ, con el respaldo de su caracterización y de datos que permitan evaluar la racionalidad de su utilización.

- 4.2 Debe demostrarse que los eritrocitos no producen reacciones positivas no deseadas, cuando se utilizan para el control de los reactivos mediante los métodos recomendados por el fabricante.

- 4.3 Deben ser negativos a la prueba de antiglobulina indirecta con anti-IgG y anticplemento, excepto los sensibilizados con IgG y con C3.

- 4.4 Cuando se preparan a partir de más de un donante, la fecha de extracción de la donación más antigua debe registrarse como la fecha de preparación.

- 4.5 Los eritrocitos obtenidos pueden utilizarse hasta 7 días a partir del momento de la extracción si se conservan a una temperatura de 2-8 °C, o por más tiempo en soluciones que no alteren o modifiquen su estructura y expresión antigénica (por ejemplo: ACD o CPD, Adenina, de 7-10 días y en Solución Alsever, durante 4-6 semanas).

- 4.6 Si se van a utilizar por un período de tiempo superior, los eritrocitos pueden congelarse de -20 a -80 °C. Los mismos se podrán descongelar una sola vez.

Nota: En este caso, se debe garantizar el uso de una solución crioprotectora (por ejemplo: glicerol al 40 %, Soluciones salino/glucosadas, HES (hidroxietilalmidón)). La fecha de congelación se considerará como la fecha de preparación de los eritrocitos.

- 4.7 Una vez descongelados para su uso, debe confirmarse el fenotipo, demostrarse la identidad, así como la reactividad deseada del eritrocito.

- 4.8 El método de preparación debe garantizar que las células blancas sean eliminadas de las donaciones de eritrocitos

antes de que estos se lisen y liberen enzimas que puedan afectar adversamente sus propiedades.

- 4.9 Los eritrocitos deben lavarse al menos 3 veces con solución salina, hasta que el sobrenadante sea transparente. Posteriormente deben resuspenderse, con un diluyente aprobado, a la concentración celular indicada en las Instrucciones para el uso (IPU) del fabricante.
- 4.10 Si los eritrocitos van a utilizarse en una técnica que requiera el uso de la solución LISS, los mismos deben someterse a un lavado adicional con LISS y luego se deben resuspender en esa misma solución.
- 4.11 Los eritrocitos resuspendidos en solución salina o en LISS deben ser utilizados solamente hasta 24 horas.
- 4.12 Los eritrocitos descongelados se pueden resuspender en las soluciones de conservación y utilizarse hasta 6 semanas, si se conservan de 2-8 °C.
- 4.13 Los que se utilicen para la identificación de anticuerpos irregulares deben cumplir las directrices establecidas en las guías para los servicios de transfusiones de sangre vigentes. (Ver 11.11).

5. Requisitos específicos para la evaluación y control de calidad de los hemoclasificadores del sistema ABO (anti-A, anti-B, anti-AB) y del sistema Rh (anti-D)

5.1 Potencia

- 5.1.1 La potencia se debe determinar mediante la técnica de hemaglutinación en tubo o por microplacas, de acuerdo con el método recomendado por el fabricante, utilizando solución salina con albúmina bovina al 2 % como diluyente del reactivo y una suspensión de los eritrocitos al 2-3 % en solución salina.
- 5.1.2 Los reactivos anti-A, anti-B y anti-AB deben incubarse por 5 minutos a una temperatura de 20-30 °C y los reactivos anti-D de 20 a 30 °C o 37 °C, según lo recomendado por el fabricante como la temperatura óptima de reacción del reactivo.
- 5.1.3 La potencia de cada lote de reactivo debe compararse con la de un material de referencia reconocido (también llamado material de referencia primario) el cual se utilizará de acuerdo con las IPU que lo acompañan, sólo para determinar la potencia de los reactivos hemoclasificadores como parte de su control de calidad, en las pruebas de estabilidad, pruebas en proceso o en un producto con fines de desarrollo.

Nota: Pueden desarrollarse materiales de referencia internos (también conocidos como Materiales de Referencia de Trabajo (MRT), a partir de los primarios.

- 5.1.4 La potencia para cada lote de reactivo evaluado, debe ser igual o superior a la del material de referencia correspondiente.
- 5.1.5 Los reactivos para los cuales no estén disponibles dichos materiales, se deben evaluar con un lote de reactivo previamente liberado.
- 5.1.6 La potencia mínima requerida y la cantidad de muestras a ensayar por fenotipo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Potencia mínima y cantidad de muestras requeridas para los hemoclasificadores del sistema ABO (anti-A, anti B, anti AB) y del sistema Rh (anti-D)

Reactivo	Potencia mínima y cantidad de muestras requeridas (X)					
	A ₁	A ₂	A ₁ B	A ₂ B	B	Ror
anti-A	≥ 256 (1)	-	-	≥ 64 (3)	-	-
anti-B	-	-	≥ 256 (3)	-	≥ 256 (1)	-
anti-AB	≥ 256 (1)	≥ 256 (2)	-	-	≥ 256 (2)	-
anti-D	-	-	-	-	-	≥ 256 (1)

- 5.1.7 El reactivo que no cumpla la potencia requerida con alguna muestra en particular, se debe evaluar nuevamente con 4 muestras de eritrocitos de diferentes individuos, pero de igual fenotipo al de la muestra discrepante.
- 5.1.8 Se debe aceptar aquel producto que después de repetirse el ensayo, cumpla con los requisitos de potencia con más de una muestra del total de fenotipos utilizados. De lo contrario, se rechaza.

5.2 Avidez

- 5.2.1 Se debe determinar mediante la técnica de hemaglutinación en lámina, mezclando sobre un área ovalada de aproximadamente 20 mm x 40 mm en un portaobjeto de vidrio, un volumen del reactivo no diluido y un volumen de una suspensión de eritrocitos al 30-45 % en suero alogénico, plasma compatible con grupos ABO o un diluyente apropiado (solución salina).
- 5.2.2 Se debe mantener el portaobjeto a la temperatura recomendada para la prueba en las IPU del fabricante.
- 5.2.3 Se debe determinar el tiempo de mezcla a partir del cual aparece la aglutinación macroscópica, así como registrar la intensidad de la misma expresada en grados de la reacción en 1 minuto.
- 5.2.4 La cantidad de muestras a ensayar para la avidéz será la misma a la descrita en la Tabla 1.
- 5.2.5 Se deben observar aglutinados en un intervalo ≤ 30 segundos, según inspección visual.

5.3 Especificidad

- 5.3.1 Se debe realizar mediante todos los métodos recomendados por el fabricante para la especificidad y reactividad, cumpliendo con el rango de tiempo y la temperatura de incubación. El reactivo se empleará sin diluir.
- 5.3.2 Para cada reactivo, se deben analizar al menos 4 donantes diferentes cuyos eritrocitos muestren expresión del antígeno correspondiente.
- 5.3.3 Se debe comprobar el contenido de todos los tubos de control negativo en busca de ausencia de Rouleaux, por observación microscópica.

5.3.4 Se debe ensayar el reactivo para detectar, o descartar, la presencia de anticuerpos irregulares, mediante el uso de eritrocitos de al menos 4 donantes diferentes carentes del antígeno correspondiente al anticuerpo del reactivo. Los resultados serán interpretados por el método más sensible descrito en las IPU del fabricante.

5.3.5 La cantidad de muestras mínima requerida por fenotipo para determinar la especificidad debe ser el indicado en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Cantidad de muestras requeridas según el fenotipo para determinar la especificidad de los hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB

Reactivos	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

Tabla 3. Cantidad de muestras requeridas según el fenotipo para determinar la especificidad del reactivo hemoclasificador anti-D del sistema Rh

Cantidad de muestras requeridas según el fenotipo para el ensayo de especificidad según fenotipo			
Reacciones positivas		Reacciones negativas	
Fenotipos	Cantidad	Fenotipos	Cantidad
R ₁ r	1	r'r	1
R ₀ r	2	r''r	1
R ₂ r	1	rr	1
D Débil	2	A ₁ ccddee	1
-	-	B ccddee o A ₁ B ccddee	1

5.3.6 Los hemoclasificadores del sistema ABO y del sistema Rh (anti-D), cualquiera que sea el método de ensayo, deben cumplir con los siguientes requisitos:

- a) Los reactivos deben ser satisfactorios si se obtiene un resultado positivo inequívoco con todas las muestras de eritrocitos que tienen el antígeno correspondiente al grupo sanguíneo del reactivo en evaluación, de acuerdo con el método recomendado por el fabricante. Se debe registrar la intensidad del botón del aglutinado obtenido en la técnica de tubo. Con los que no se obtenga dicho resultado se deben rechazar.

Nota: Para variantes débiles o subgrupos de un antígeno particular o que requieran prueba de antiglobulina indirecta, la intensidad debe ser ≥ 2+.

- b) Los reactivos deben producir una reacción negativa cuando se prueban con eritrocitos que carecen del antígeno correspondiente a la especificidad del anticuerpo que se evalúa, por cualquier método recomendado por el fabricante.
- c) La formación de Rouleaux, efecto prozona o hemólisis debe estar ausente en pruebas que usen cualquiera de los métodos recomendados por el fabricante.
- d) Los reactivos anti-A, anti-B y anti-AB no deben presentar anticuerpos contra los antígenos: 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.

- e) Los reactivos anti-D no deben presentar 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.

5.4 Código de colores

Se debe utilizar el indicado en la Tabla 4.

Tabla 4. Código de colores requerido para los hemoclasificadores del sistema ABO (anti-A, anti B, anti AB) y del sistema Rh (anti-D)

Reactivo	Color del reactivo	Color de las etiquetas
Anti-A	azul	azul
Anti-B	amarillo	amarillo
Anti-AB	rojo o incoloro	rojo
Anti-D	incoloro	gris

5.5 Rotulado

5.5.1 Deben cumplir con lo descrito en el apartado 3.4 de esta regulación y, además, en la etiqueta de los envases externo y primario, así como en las IPU, debe aparecer lo siguiente:

- 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.

5.5.2 En las IPU se debe incluir, además, el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados.

5.6 Efecto prozona

5.6.1 Los sueros anti-D no deben mostrar 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 debe ser ≥ 3+.

6. Requisitos específicos para la evaluación y control de calidad de los sueros hemoclasificadores de otros antígenos del sistema Rh (anti-C, -c, -E, -e, -C^w)

6.1 Potencia

6.1.1 El ensayo de potencia se debe realizar por la técnica de aglutinación en tubo de acuerdo al método recomendado por el fabricante.

6.1.2 La potencia requerida debe ser mayor de 4 con eritrocitos de los fenotipos que se expresan en la Tabla 5.

Tabla 5. Muestras requeridas según el fenotipo para el ensayo de potencia de los hemoclasificadores anti-C, anti-c, anti-E, anti-e y anti-C^w)

Reactivos	Fenotipos *
anti-C	R ₁ r
anti-c	R ₁ r
anti-E	R ₂ r
anti-e	R ₂ r
anti-C ^w	R ₁ ^w r

* Cantidad de muestras para cada fenotipo: 2

6.2 Avidéz

- 6.2.1 La avidéz se debe realizar únicamente a los productos recomendados para la técnica aglutinación en lámina.
- 6.2.2 La avidéz se debe determinar mezclando un volumen del suero con un volumen de la suspensión al 40 % de los eritrocitos en solución salina a la temperatura recomendada en las IPU.
- 6.2.3 Se deben observar signos de aglutinación a la mitad del tiempo que recomienda el fabricante y aglutinados ≥ 1 mm de diámetro.
- 6.2.4 Los fenotipos a ensayar para la avidéz deben ser los mismos a los descritos en la Tabla 5.

6.3 Especificidad

- 6.3.1 La cantidad de muestras mínima requerida por fenotipo para determinar la especificidad debe ser la indicada en la Tabla 6.

Tabla 6. Cantidad de muestras requeridas según fenotipo para el ensayo de especificidad de los hemoclasificadores anti-C, anti-c, anti-E, anti-e y anti-C^w

Reactivos	Reacciones positivas		Reacciones negativas	
	Fenotipos	Cantidad	Fenotipos	Cantidad
anti-C	R ₁ r	1	R ₂ R ₂	1
	R ₁ R ₂	1	r ^{''} r	1
	R ₁ R _Z	1	rr	1
anti-c	R ₁ r	2	R ₁ R ₁	3
	R ₁ R ₂	1	-	-
	r ^{''} r	1	-	-
anti-E	R ₂ r	1	R ₁ R ₁	1
	R ₁ R ₂	2	r ^{''} r	1
	r ^{''} r	1	rr	1
anti-e	R ₂ r	2	R ₂ R ₂	3
	R ₁ R ₂	1	-	-
	r ^{''} r	1	-	-
anti-C ^w	C ^w R ₁ ^w r ó R ₁ ^w R ₂	2	R ₁ r	1
	r ^w r	1	R ₁ R ₁	1

	-	-	r ^{''} r	1
--	---	---	-------------------	---

- 6.3.2 Los sueros hemoclasificadores anti-C, -c, -E, -e en todos los métodos para los cuales se recomienda el producto, deben cumplir con los siguientes requisitos:
- Deben aglutinar con $\geq 2+$ con todas las muestras que expresen el antígeno específico y reacción negativa con todas las muestras negativas para el antígeno.
 - No deben presentar anticuerpos contra los antígenos A, B, H, I, , D, 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.
 - No deben poseer actividad hemolítica ni provocar fenómeno Rouleaux.
- 6.3.3 Los reactivos salinos no deben aglutinar eritrocitos de grupo O, carentes del antígeno específico con prueba de Coombs directa positiva de 3+ a 4+.
- ## 6.4 Código de colores
- 6.4.1 Los sueros anti-C, -c, -E, -e no tienen requisitos específicos de colores.
- ## 6.5 Rotulado
- 6.5.1 Debe cumplir con lo descrito en el apartado 3.4 de esta regulación y, además, en la etiqueta de los envases primario y secundario y en las IPU debe aparecer:
- 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.
- 6.5.2 En las IPU, además, se debe indicar el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados cuando sea procedente.

7. Requisitos específicos para la evaluación y control de calidad de los sueros hemoclasificadores anti-K, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁

7.1 Potencia

- 7.1.1 La prueba de potencia se debe determinar por la técnica de aglutinación en tubo de acuerdo al método que recomiende el fabricante.
- 7.1.2 La potencia requerida debe ser mayor de 4 con eritrocitos de los fenotipos que se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Muestras requeridas según fenotipo para el ensayo de potencia 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

Reactivo	Fenotipos *
anti-K	Kk
anti-k	Kk
anti-Fy ^a	Fy(a+b+)
anti-Fy ^b	Fy(a+b+)
anti-Jk ^a	Jk(a+b+)
anti-Jk ^b	Jk(a+b+)

anti-S	Ss
anti-s	Ss
anti-M	MN
anti-N	MN
anti-Le ^a	Le(a+b-)
anti-Le ^b	Le(a-b+)
anti-P ₁	P ₁ (+)

* Cantidad de muestras para cada fenotipo: 2

7.2 Avidéz

- 7.2.1 La avidéz se debe realizar únicamente a los productos recomendados en la técnica de lámina.
- 7.2.2 Se debe determinar mezclando un volumen del suero con un volumen de la suspensión al 40 % de los eritrocitos en solución salina a la temperatura recomendada en las IPU.
- 7.2.3 Se deben observar signos de aglutinación a la mitad del tiempo que recomienda el fabricante y aglutinados ≥ 1 mm de diámetro.
- 7.2.4 La cantidad de muestras a ensayar para la avidéz debe ser la misma a la descrita en la Tabla 7.

7.3 Especificidad

- 7.3.1 La cantidad de muestras mínima requerida por fenotipo para determinar la especificidad debe ser la indicada en la Tabla 8.

Tabla 8. Cantidad de muestras requeridas según fenotipo para el ensayo de especificidad de los sueros hemoclasificadores anti-K, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁

Reactivo	Fenotipos	
	Reacción positiva *	Reacción negativa *
anti-K	Kk	kk
anti-Fy ^a	Fy(a+b+)	Fy(a-)
anti-Fy ^b	Fy(a+b+)	Fy(b-)
anti-Jk ^a	Jk(a+b+)	Jk(a-)
anti-Jk ^b	Jk(a+b+)	Jk(b-)
anti-S	Ss	ss
anti-s	Ss	SS
anti-M	MN	NN
anti-N	MN	MM
anti-Le ^a	Le(a+b-)	Le(a-)
anti-Le ^b	A ₁ B Le(a-b+)	Le(b-)
anti-P ₁	P ₁ + (Fuerte)	P ₁ - (-)

	P ₁ + (Débil)	
--	--------------------------	--

* Cantidad de muestras para cada fenotipo: 4

- 7.3.2 Los reactivos hemoclasificadores anti -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:
 - a) Deben aglutinar con > 2+ con todas las muestras que expresen el antígeno específico y reacción negativa con todas las muestras negativas para el antígeno.
 - b) Los reactivos anti-K, no deben presentar 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.
 - c) Los reactivos anti-Fy^a, -Fy^b no deben presentar anticuerpos contra los antígenos 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.
 - d) Los reactivos anti-Jk^a, -Jk^b no deben presentar anticuerpos contra los antígenos 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.
 - e) Los reactivos anti-S, -s, no deben presentar anticuerpos contra los antígenos 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.
 - f) Los reactivos anti- Le^a, -Le^b, no deben presentar anticuerpos contra los antígenos 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.
 - g) Los reactivos anti-M y anti-N no deben presentar anticuerpos contra los antígenos A₁, B, 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 reactivos anti-P₁ no deben presentar anticuerpos contra los antígenos A₁, B, 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 debe poseer actividad hemolítica ni provocar fenómeno Rouleaux.

7.4 Rotulado

- 7.4.1 Debe cumplir con lo descrito en el apartado 3.4 de esta regulación y, además, en la etiqueta de los envases externo y primario y en las IPU 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.
- 7.4.2 En las IPU, además, se debe indicar el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados cuando sea procedente.

7.5 Código de colores

- 7.5.1 Los sueros anti-K, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, anti-Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b y anti-P₁ no tienen requisitos específicos de colores.

8. Requisitos específicos para la evaluación y control de calidad de los sueros antiglobulínicos humanos (Suero de Coombs)

8.1 Requisitos generales

- 8.1.1 Los requisitos para la preparación de eritrocitos, utilizados en el control de reactivos, descritos en el apartado 4 son aplicables a los sueros antiglobulínicos humanos.
- 8.1.2 Para determinar la potencia de anti-IgG y anti-C3d debe utilizarse el reactivo de referencia reconocido de antiglobulina humana (el primario o el MRT), como parte de su ensayo del control de calidad de acuerdo con las IPU del fabricante.
- 8.1.3 Para la preparación de los eritrocitos sensibilizados con C3b, C4b, C3d, C4d, que son necesarios para la evaluación de la actividad anti-complemento, se deben utilizar técnicas con soluciones de fuerza iónica muy baja. Estos medios no se deben confundir con la solución LISS. (Ver Anexo I).
- 8.1.4 Deben prepararse y analizarse como mínimo dos muestras de diferentes individuos, para determinar el mejor donante sensibilizado. Los eritrocitos de cada donante deben ser sensibilizados con su propio plasma o suero. Estos deben ser tratados en el plazo de una hora de extraídos.
- 8.1.5 Los eritrocitos recubiertos con complemento o inmunoglobulina se deben probar, cada día de uso, con reactivos de control positivo y negativo para asegurar la reactividad. Cuando no se disponga de reactivos de control específicos, se podrá utilizar un lote de suero antiglobulínico humano previamente liberado.

8.2 Potencia

- 8.2.1 Prueba de Potencia anti-IgG para técnicas en tubos o microplacas.
- a) El ensayo de potencia de anti-IgG del reactivo sometido a prueba se debe realizar en paralelo con el material de referencia anti-IgG.
- b) El suero anti-D (de clase IgG), usado para recubrimiento celular debe tener una potencia de 8 a 32 en la prueba de antiglobulina indirecta utilizando una suspensión al 2-3 % de eritrocitos del fenotipo Ror de cuatro individuos.
- c) No es necesario realizar la prueba de potencia del suero anti-D cada día de prueba, siempre que el mismo lote de suero y la misma fuente de donante de eritrocitos sean utilizados para determinar la potencia anti-IgG del suero antiglobulínico humano bajo ensayo.

Nota: Pueden utilizarse sueros comerciales que no contengan mezclas con anticuerpos IgM.

- d) El suero anti-Fy^a usado para recubrir eritrocitos debe tener una potencia de 8 a 32 en la prueba de antiglobulina

indirecta utilizando una suspensión al 2-3 % de eritrocitos del grupo de Fy (a+b+).

- e) El suero antiglobulínico humano poliespecífico (IgG-C3) y el reactivo anti-IgG es satisfactorio, si el grado de reacción en todas las diluciones alcanza o supera el del material de referencia sin efecto prozona significativo, contra los eritrocitos sensibilizados con todas las diluciones de anti-D y anti-Fy^a.

Nota: Un efecto prozona significativo representa más de una diferencia de grado entre la reacción del suero sin diluir y diluido 1:2.

- f) Los reactivos para los cuales no estén disponibles los materiales de referencia, deben ser evaluados utilizando las diluciones 1:2 y 1:4 de suero antiglobulínico humano poliespecífico y el reactivo anti-IgG, los que deben aglutinar eritrocitos Ror y eritrocitos Fy(a+b+) sensibilizados con las diluciones 1:8-1:32 (en dependencia del título de los anticuerpos utilizados) de anti-D y anti-Fy^a.

8.2.2 Potencia anti-complemento C3d.

- a) El ensayo para determinar la potencia de anti-C3d del reactivo sometido a prueba, se debe realizar en paralelo con el reactivo de referencia anti-C3d utilizando eritrocitos O Rh (D) positivo.
- b) El suero antiglobulínico humano poliespecífico y el reactivo anticomplemento deben alcanzar el título de potencia C3d del material de referencia. Cuando no estén disponibles los materiales de referencia, deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C3b en títulos no menor que 1:4 y eritrocitos recubiertos con C3d con un título no menor que 1:1 y reacción de 2+ de aglutinación, lo cual será comparado con un lote de suero ya liberado.
- c) Los sueros antiglobulina humana con actividad anti IgA, deben aglutinar en un título no menor que 4 con eritrocitos recubiertos de IgA.

- 8.2.3 Se deben desarrollar materiales de referencia internos como parte de su control de calidad, en las pruebas de estabilidad, pruebas en proceso o en un producto con fines de desarrollo.

8.3 Especificidad

- 8.3.1 Pruebas de anticuerpos heteroespecíficos de eritrocitos IgM o IgG.
- a) Con estas pruebas se deben detectar anticuerpos heteroespecíficos que pueden causar hemólisis o aglutinación de eritrocitos no sensibilizados en la prueba indirecta de antiglobulina.
- b) Se debe utilizar la sangre de donantes dentro de los 7 días de la recolección, realizando suspensiones del 2-3 % con solución salina de eritrocitos lavados no sensibilizados de dos individuos del grupo A₁ RhD positivo, dos individuos del grupo B RhD positivo y dos individuos del grupo O RhD positivo, y tratados con enzimas proteolíticas tales como papaína, bromelina o ficina.
- c) El suero antiglobulínico humano poliespecífico no debe aglutinar o hemolizar eritrocitos lavados no

sensibilizados de dos individuos del grupo A₁ RhD positivo, dos individuos del grupo B RhD positivo y dos individuos del grupo O RhD positivo, tratados o no con enzimas proteolíticas.

8.3.2 Pruebas de reacciones positivas no deseadas.

- a) Estas pruebas deben detectar exceso de anti-C3d y anti-C3c, que pueden causar reacciones positivas no deseadas en la prueba de antiglobulina indirecta, así como la presencia de cualquier anticuerpo indeseable en el reactivo.
- b) Se deben preparar suspensiones de eritrocitos lavados al 2-3 % con solución salina incubados a 37 °C durante 45 minutos y suspensiones al 1,5-2 % con solución LISS incubados a 37 °C durante 15 minutos, a partir de muestras colectadas del segmento de las unidades de sangre, seleccionando dos segmentos del grupo A₁, dos segmentos del grupo B y dos segmentos del grupo O que estén almacenados de 2-8 °C por un período entre 10 y 15 días. Se deben ensayar en la prueba de antiglobulina indirecta con un suero de 6 donantes, obtenido antes de las 24 horas de realizar el estudio, deben estar libres de anticuerpos irregulares y deben ser ABO compatibles con las muestras de los eritrocitos colectados.
- c) No deben aglutinar ni hemolizar a suspensiones de eritrocitos en solución salina y en LISS, provenientes de 2 donantes de cada uno de los grupos A₁, B y O. Los eritrocitos deben ser 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) Si las IPU del fabricante indican la presencia o ausencia de anti-C4b y/o anti-C4d, se deben probar los eritrocitos recubiertos apropiados.
- e) No deben aglutinar con eritrocitos recubiertos con C4d.
- f) Los sueros antiglobulina humana anti-IgG no deben aglutinar con eritrocitos recubiertos con C3d, C4d.
- g) Los sueros anticomplemento C3 no deben aglutinar eritrocitos recubiertos con IgG y C4d.

8.4 Código de colores

8.4.1 El suero antiglobulínico humano poliespecífico puede ser verde o incoloro. A los demás sueros antiglobulínicos no se les debe añadir colorante.

8.5 Rotulado

8.5.1 Debe cumplir con lo descrito en el apartado 3.4 de esta regulación y, además, en la etiqueta de los envases externo y primario, así como en las IPU, debe aparecer:

- a) Suero antiglobulínico 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.

8.5.2 En las IPU, además, se debe indicar el nombre del clon o de los clones de los anticuerpos monoclonales utilizados.

8.5.3 El color de la etiqueta debe ser verde.

9. Evaluación del desempeño

9.1 Los estudios para demostrar la evaluación del desempeño de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos se deben realizar siguiendo la metodología establecida en la Regulación *Requisitos para la Evaluación del Desempeño de los Diagnosticadores* vigente, del CECMED.

9.2 Los protocolos de evaluaciones del desempeño descritos en este apartado, deben ser aprobados por el CECMED previo a la realización de las mismas.

9.3 Se debe realizar una evaluación del desempeño *in situ* de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos, en la cual se consideren los requisitos generales y específicos descritos en los apartados 3 al 8 de esta regulación, como requerimiento indispensable para obtener la AC de dichos diagnosticadores.

9.4 Estudios de Reproducibilidad

9.4.1 Los reactivos hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB se deben estudiar con no menos de 300 muestras de sangre de donantes en cada uno de los métodos para los que se recomienda el producto. Además, de lo establecido en el acápite 5.3.7 de esta regulación, estos reactivos en los ensayos de especificidad no deben aglutinar con eritrocitos de grupo O con prueba de Coombs directa de 3+ a 4+ obtenidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune o preparados *in vitro*.

9.4.2 El reactivo hemoclasificador anti-D se debe estudiar con no menos de 350 muestras de donantes de sangre en cada uno de los métodos para los cuales se recomienda el producto.

9.4.3 Otros reactivos hemoclasificadores diferentes del ABO y anti-D se deben estudiar con no menos de 50 muestras de sangre de donantes en todos los métodos para los que se recomienda el producto.

9.4.4 El suero antiglobulínico humano se debe estudiar 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.

9.4.5 En el grupo de pacientes con anticuerpos irregulares se pueden incluir muestras de donantes Rho (D) negativos inmunizados para la producción de anticuerpos anti-D y de mujeres Rho (D) negativas aloinmunizadas por embarazos.

9.4.6 De utilizarse muestras provenientes de los grupos señalados en 9.4.5, el estudio debe comprender la

determinación del título de anticuerpos anti-D en la prueba de Coombs indirecta y la comprobación con los resultados obtenidos con el material de referencia. Pueden existir diferencias de una dilución inferior en el título con respecto al material de referencia.

9.5 Ensayo de terreno

9.5.1 Se debe realizar después de haber obtenido la AC de los diagnosticadores correspondientes.

9.5.2 Requisitos específicos del Ensayo de terreno de los sueros hemoclasificadores (anti-A, -B, -AB, -D, -C, -c, -E, -e, -K, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁) y antiglobulínicos:

- La evaluación de la potencia se debe realizar a no menos de dos lotes del producto, en paralelo con un material de referencia reconocido o con un MRT desarrollado a partir de uno primario.
- Se realizará como mínimo en tres sitios diferentes, excluyendo al productor, y que representen áreas geográficas y distribución poblacional diferentes.
- De los sitios que se seleccionen, al menos uno debe ser un Banco de Sangre y otro un Servicio de Transfusiones.
- Las determinaciones realizadas deben comprender 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 debe realizar únicamente por la técnica de tubo.
- En la evaluación de los sueros hemoclasificadores ABO se deben realizar las determinaciones de las isoaglutininas en el plasma o suero del donante para corroborar el grupo sanguíneo.
- En la evaluación de los sueros antiglobulínicos se debe realizar la prueba de Coombs directa y la prueba de Coombs indirecta.

9.5.3 Características de las muestras a estudiar en el Ensayo de terreno:

- Las muestras seleccionadas para la evaluación de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos deben reunir las características que se indican en la Tabla 9.
 - En la evaluación de los sueros hemoclasificadores el 10 % de las muestras seleccionadas de cada grupo deben ser de eritrocitos carentes del antígeno específico para los anticuerpos evaluados.
- 9.5.4 Muestras no seleccionadas.
- En la evaluación de los sueros hemoclasificadores ABO y Rho (D) se deben estudiar al menos 800 muestras de donantes de sangre, para determinar el grupo sanguíneo con eritrocitos provenientes del coágulo a 400 de ellas y al resto con eritrocitos obtenidos en anticoagulante.
 - En la evaluación de los sueros anti-C, -c, -E, -e, -Cw, -K, -k, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -M, -N, -Le^a, -Le^b, y anti-P₁, se deben estudiar al menos 50 muestras de donantes de sangre con eritrocitos obtenidos en anticoagulante.

c) En la evaluación de los sueros antiglobulínicos se deben estudiar 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.

9.5.5 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.

Tabla 9. Características de las muestras seleccionadas para la evaluación de los sueros hemoclasificadores y antiglobulínicos en el ensayo de terreno

Tipo de muestra	Cantidad de muestras a estudiar		
	ABO, Rho (D)	anti-C, -c, -E, -e, -K, -Fy ^a , -Fy ^b , -Jk ^a , -Jk ^b , -S, -s, -M, -N, -Le ^a , -Le ^b , y anti-P ₁	Sueros antiglobulínicos
Conservadas en anticoagulantes durante su periodo de validez	40	10	20
Eritrocitos congelados, por métodos debidamente aprobados, que demuestren la identidad y reactividad deseada con los reactivos adecuados	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 ^a	10 ^a
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 Un resultado no satisfactorio con estos grupos de muestras no invalida el producto, pero debe aclararse en las IPU que los reactivos no pueden utilizarse en muestras de estas características.

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

9.6 Informe del Ensayo de terreno

9.6.1 El informe se debe elaborar de acuerdo a lo establecido en la Regulación *Requisitos para la Evaluación del*

Desempeño de los Diagnosticadores, vigente del CECMED, y debe contener además el protocolo utilizado en el estudio.

- 9.6.2 Se debe describir un análisis de las discrepancias encontradas, las cuales deben ser analizadas para investigar su causa.
- 9.6.3 Los resultados de todos los métodos evaluados se deben comparar con los materiales de referencia correspondientes. El título de potencia promedio se determinará por el método del logaritmo de base 2 (log₂). (Ver Anexo II).
- 9.6.4 Los parámetros a medir deben ser la especificidad y sensibilidad en todos los procedimientos analizados y se calcularán utilizando tablas de contingencia 2 x 2 (Ver Anexo III).

10. Control de cambios

- 10.1 Se modificó el apartado 2 para incluir dos nuevas definiciones y para eliminar dos que resultaban reiterativas o innecesarias en esta Regulación.
- 10.2 Se actualizó apartado 3 para enriquecer los requisitos generales de los productos usados en Inmunohematología y se elimina de este apartado el requisito relacionado con la Evaluación del desempeño para incluirlo como uno nuevo (9).
- 10.3 Se incluyeron los requisitos para la preparación de los eritrocitos utilizados en el control de reactivos, como un nuevo apartado (4). Se corre la numeración del resto de los apartados.
- 10.4 Se modificó el requisito de título de potencia de los hemoclasificadores del sistema ABO y Rh (RhD), por lo que se actualiza el apartado correspondiente.
- 10.5 Se actualizaron las muestras para cada fenotipo requeridas para los ensayos de potencia y especificidad de los sueros hemoclasificadores, referidas en los apartados 5, 6 y 7.
- 10.6 Se actualizaron los requisitos específicos de los sueros antiglobulínicos humanos (Suero de Coombs), referidos en el apartado 8.
- 10.7 Se actualizó el apartado Bibliografía. Se eliminaron las referencias relacionadas con la sangre, los productos sanguíneos y la detección de donantes, de las décadas de 1980 y 1990, las cuales fueron retiradas por el Centro de Evaluación e Investigación Biológica (CBER) de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). Se incluyeron nuevas.
- 10.8 Se incluyó un nuevo anexo para describir las soluciones utilizadas en la preparación de células revestidas con componentes de complemento C3b, C4b, C3d, C4d.

11. Bibliografía

- 11.1 Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CU). Resolución No. 165/2013: Requisitos para la Autorización de Comercialización de los Diagnosticadores. Regulación D 08-13. La Habana: CECMED; 2013. 14 p.

- 11.2 Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CU). Resolución No.35-2007: Requisitos para la Evaluación del Desempeño de los Diagnosticadores. Regulación no.47-2007. La Habana: CECMED; 2007. 36 p.
- 11.3 Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CU). Resolución No.46-2012: Clases de Riesgo de los Diagnosticadores. Regulación No. 50-2012. La Habana: CECMED; 2012. 9 p.
- 11.4 Comisión Europea. Decisión de la Comisión, de 3 de febrero de 2009, por la que se modifica la Decisión 2002/364/CE, sobre especificaciones técnicas comunes para productos sanitarios de diagnóstico in vitro 2009/108/CE [Internet]. Diario Oficial de la Unión Europea. 2009 [citado 12 enero 2020]; L39: 34-49. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009D0108&from=ES>.
- 11.5 Comisión Europea. Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento europeo y del Consejo de 5 de abril de 2017 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Diario Oficial de la Unión Europea. 2017; L 117: 176-332.
- 11.6 Comisión Europea. Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de octubre de 1998 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Diario Oficial de la Unión Europea. 1998; L0079: 3-64.
- 11.7 Cortés Buelva A, Muñoz-Díaz E, León de González G. Inmunohematología básica y aplicada [Internet]. Colombia: Feriva; 2014 [consultado diciembre 2020]. 515 p. Disponible en: <https://gciamt.org/wp-content/uploads/2020/03/inmunohematologia-basica-y-aplicada.pdf>.
- 11.8 Kumawat V, Marwaha N, Sharma RR. Discrepancias del Grupo sanguíneo ABO: Causas y resolución. Take Control. 2014; 10 (27): 1-3.
- 11.9 Meihong L. Summary Basis for Regulatory Action. EEUU: FDA; 2019. 14 p.
- 11.10 NC ISO 23640:2018. Dispositivos médicos para diagnóstico in vitro. Evaluación de la estabilidad de los reactivos para diagnóstico in vitro (ISO 23640: 2011, IDT).
- 11.11 NC OIML V2:2012. Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados.
- 11.12 Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. PAHO/HPC/HCT/94.21. Washington D.C.: OPS; 1994. 61 p.
- 11.13 Organización Mundial de la Salud. National standards for blood transfusion service [Internet]. Ginebra: OMS; 2013 [citado 4 de marzo 2020]. 98 p. Disponible en: https://www.who.int/bloodsafety/transfusion_services/BhutanNationalStandardsBTServices.pdf.

-
- 11.14 Ragosta A. Summary Basis for Regulatory Action Template. EEUU: FDA; 2018. 23 p.
- 11.15 Rivero RA, Suárez LE, Bencomo AA, González RA, González JM, Ballester JM, et al. Obtención de un reactivo monoclonal hemoclasificador Anti-A para el sistema de grupos sanguíneos ABO. *Biotecnología Aplicada*. 2004; 21(3):167-171.
- 11.16 Rodríguez Sánchez L. El laboratorio de inmunohematología. *Rev. Mex. Med. Tran.* 2017; 10 (1): 5-13.
- 11.17 Therapeutic Goods Administration (AU). Regulatory requirements for in-house IVDs [Internet]. Australia: TGA; 2018 [citado 4 de mayo de 2020]. 19 p. Disponible en: <https://www.tga.gov.au/publication/regulatory-requirements-house-ivds>.
- 11.18 United Kingdom Blood Transfusion Services. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 8th ed. Londres: TSO; 2013. 414 p.
- 11.19 Vennes JW, Macdonald RE, Gerhardt P. Use of Logarithms to the base 2 in recording serological reactions. *Nature*. 1957; 180(4598):1363.

Anexo I. Soluciones para la preparación de células revestidas con componentes de complemento C3b, C4b, C3d, C4d**Solución A (fosfato dipotásico 1,0 M)**

$K_2HPO_4 - 3H_2O$ 228,2 g
 Completar con Agua purificada (AP) a 1000 mL.
 Almacenar de 2-8 °C.

Solución B (fosfato de potasio 1,0 M)

K_2HPO_4 136,1 g
 Completar con AP a 1000 mL
 Almacenar a 2-8 °C.

Solución L (EDTA disódico 0,2 M)

$Na_2EDTA - 2H_2O$ 7,45 g
 Completar con AP a 100 mL
 Almacenar a temperatura ambiente (TA) de 20-25 °C

Solución F (buffer sacarosa)

Solución A..... 1,25 mL
 Solución L..... 5,25 mL
 Sacarosa..... 23,1 g
 Completar con AP a 250 mL
 Almacenar a 2-8 °C

Solución G (buffer sacarosa)

Solución B..... 1,1 mL
 Solución L..... 5,25 mL
 Sacarosa..... 23,1 g
 Completar con AP a 250 mL
 Almacenar de 2-8 °C

Solución H (cloruro de magnesio 0,4 M)

$MgCl_2$ 38,09 g
 Completar con AP a 1000 mL
 Almacenar a TA

Solución J (buffer sacarosa pH 5,1)

Añadir la Solución F a la Solución G hasta que se alcance el pH 5,1
 Almacenar a 2-8 °C

Solución K (sacarosa al 10 %)

Sacarosa..... 25 g
 Completar con AP a 250 mL
 Alicuotar y almacenar a -20 °C o menos.

Solución M (EDTA Tetrasódico 0,2 M)

Na_4EDTA 8,32 g
 Completar con AP a 100 mL
 Almacenar a TA

Solución N (EDTA Trisódico 0,2 M)

Solución L..... 100 mL
 Solución M..... 100 mL
 Almacenar a TA

Solución Q (Tripsina al 1,0 %)

Tripsina *..... 1,0 g
 HCl 0,05 N a 100 mL
 * Tripsina, cristalizada dos veces
 Alicuotar y almacenar a -20 °C o menos.

Solución R (buffer fosfato diluido pH 7,7)

Solución A..... 5,0 mL
 Completar con AP a 50 mL
 Solución B..... 1,0 mL
 Completar con AP a 10 mL
 Añadir la Solución diluida A a la Solución diluida B y ajustar pH a pH 7,7
 Dispensar en tubos de reacción.
 Almacenar a -20 °C, durante 1 año

Solución S (tripsina al 0,1 %)

Solución Q..... 0,1 mL
 Solución R..... 0,9 mL
 Almacenar de 2-8 °C

Nota: para preparar otros volúmenes tenga en cuenta las proporciones.

Anexo II. Determinación del título promedio por el método del logaritmo de base 2 (\log_2)

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 diluido	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:

$$\text{Valor del } \log_2 34/6 = \log_2 5,66$$

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

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

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

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

El título promedio es 53

Anexo III. Cálculo de la especificidad y de sensibilidad clínica

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 = $d / b + d$	

La edición de este número estuvo a cargo de un grupo de trabajo coordinado por la Sección de Políticas y Asuntos Regulatorios del CECMED integrado por:

M. Sc. Liena Núñez Núñez
 Lic. Laura Rivas Saavedra
 Lic. Humberto Ugarte Peñate
 Dr. C. Celeste Sánchez González
 M. Sc. Delia E. Garbey Laviellez
 M. Sc. Miriam Bravo Vaillant
 M. Sc. Verónica M. Ramírez Campos