



UNIVERSIDAD
DE CHILE

MANUAL DE INMUNOHEMATOLOGIA

CURSO: MEDICINA TRANSFUSIONAL
TECNOLOGÍA MÉDICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE



TECNÓLOGO MÉDICO ALICIA GAVILÁN PÉREZ
AÑO 2023

INDICE

INTRODUCCIÓN	2
PROCESO ANALÍTICO	3
LECTURA Y GRADUACIÓN DE LA LECTURA EN TUBO	5
ANTISUEROS CLASIFICADORES	7
CONTROL DE CALIDAD ANTISUEROS CLASIFICADORES.....	9
PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE GLÓBULOS ROJOS AL 3%	12
MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS.....	13
DETERMINACIÓN DE GRUPO ABO EN GLÓBULOS ROJOS Y SUERO.....	16
DETERMINACIÓN DE Rh (D) —PRUEBA EN TUBO	20
ESTUDIO Rh D VARIANTE EN TUBO	22
TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN COLUMNA	25
DETERMINACIÓN DE GRUPO ABO RhD ADULTO EN COLUMNA	27
ESTUDIO Rh D VARIANTE TÉCNICA AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL)	31
PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA INDIRECTA.....	32
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES.....	35
PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA DIRECTA (PAD).....	51

CLASIFICACIÓN ABO RHD EN RECIÉN NACIDOS	59
IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES.....	65
FENOTIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ERITROCITARIOS.....	70
PRUEBAS CRUZADAS.....	76
TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG.....	79
INVESTIGACIÓN DE PAD POSITIVO	87
ÉCNICA DE ADSORCIÓN DE ANTICUERPOS	90
PLANTILLA CONTROL DE CALIDAD ANTISUEROS	92
PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD ADULTO TÉCNICA EN TUBO	93
PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD ADULTO TÉCNICA AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL).....	94
PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD RECIÉN NACIDO TÉCNICA EN TUBO	95
PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD RECIÉN NACIDO TÉCNICA AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL)...	96
PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD ADULTO Y PAI	97
GENOTIPO PROBABLE Rh EN BASE A FENOTIPO.....	98
BIBLIOGRAFIA	100

INTRODUCCIÓN

La inmunohematología eritrocitaria es la ciencia que estudia la **compatibilidad** sanguínea a través de pruebas de laboratorio que buscan reconocer la presencia de antígenos eritrocitarios y los correspondientes anticuerpos.

Es una de las disciplinas necesarias para llevar a cabo el proceso transfusional desde la donación a la transfusión, siendo uno de los pilares de la seguridad transfusional ya que permite evitar posibles reacciones adversas por incompatibilidad de grupo sanguíneo en los pacientes. Así mismo tiene gran importancia en el proceso de trasplante de progenitores hematopoyéticos y órganos y en el contexto de la gestación, evitando posibles rechazos, así como problemas en el feto y recién nacido.

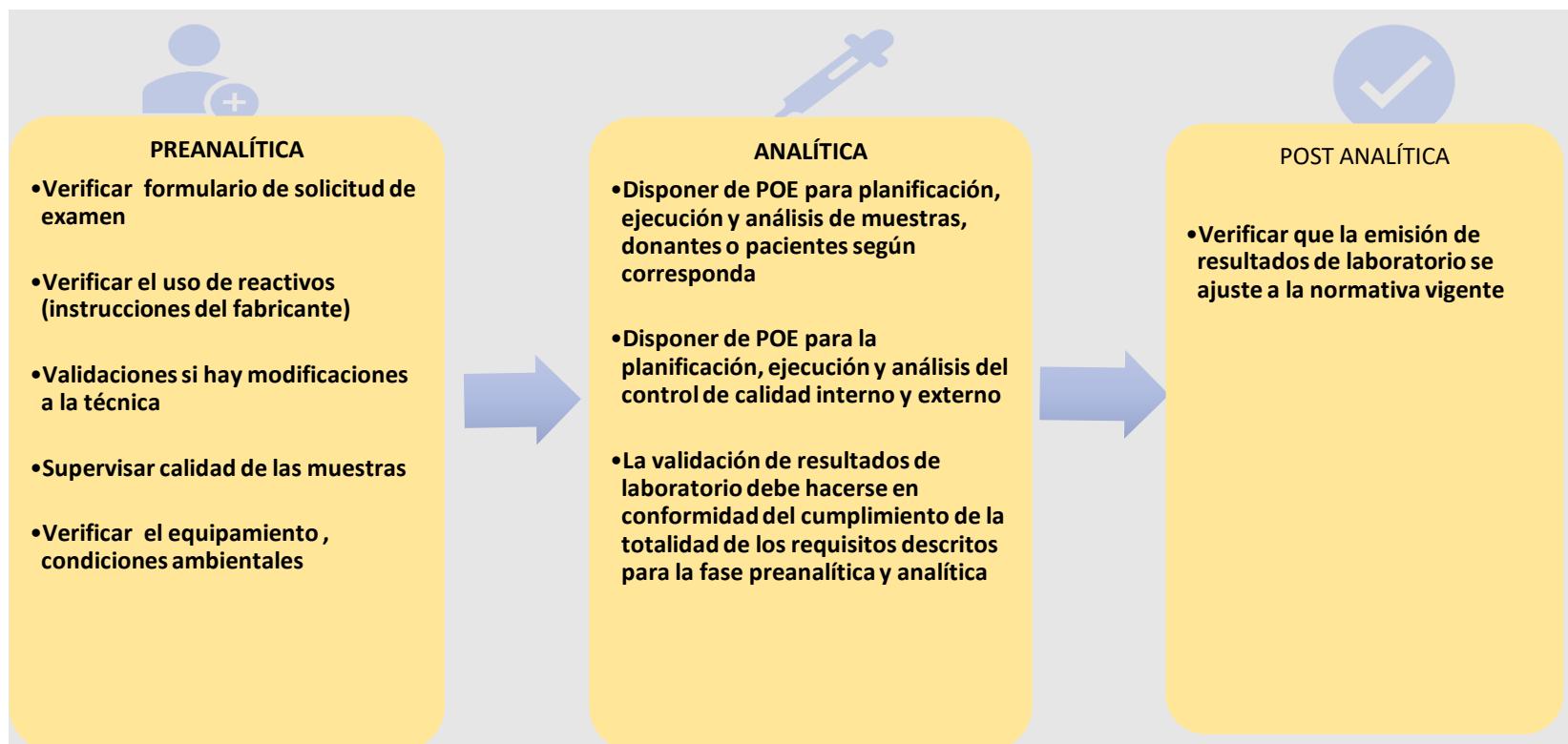
El concepto de “buenas prácticas” (que surge en EE. UU. a principios del siglo XX, ante la necesidad de mejorar y homogeneizar los procesos de fabricación industrial) se adapta a otros contextos como la medicina transfusional y es imprescindible para conseguir unos buenos resultados, reproducibles, ágiles, inequívocos y de calidad.

Es muy importante respetar los procedimientos de trabajo que rigen los estudios inmunohematológicos pretransfusionales, cuyo objetivo es asegurar la compatibilidad entre donante y receptor. Para ello hay que tener en cuenta los procedimientos que detallan las pruebas que hay que realizar al donante de sangre y al receptor. Fundamentalmente hablamos de la clasificación de grupos sanguíneos (ABO y Rh(D)) al menos, otros sistemas de grupo sanguíneos si se considera necesario, el estudio de posibles anticuerpos irregulares y finalmente las pruebas de compatibilidad entre ambos.

El control de calidad en el laboratorio de Inmunohematología, así como en otras áreas, comprende no solamente el análisis de muestras de control de calidad interno y externo, sino que implica el cumplimiento de una serie de aspectos relacionados a la fase preanalítica, analítica, post analítica, manejo de reactivos y equipamiento, competencias del personal, documentación y otros aspectos.

<https://gciamt.org/wp-content/uploads/2021/06/LAS-BUENAS-PRACTICAS-EN-INMUNOHEMATOLOGIA.-V-Callao-Junio-2021.pdf>

PROCESO ANALÍTICO



Adaptado de : <https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2021/09/Recomendaciones-para-el-control-de-calidad-en-t%C3%A9cnicas-serol%C3%B3gicas-de-inmunohematolog%C3%ADA-eritrocitaria.pdf>

LECTURA Y GRADUACIÓN DE LA LECTURA EN TUBO

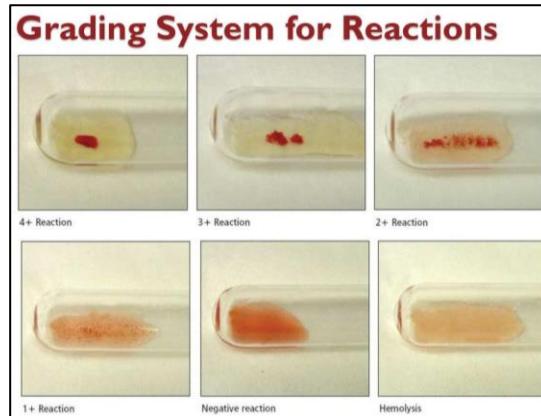
Principio El propósito de graduar las reacciones es permitir la comparación de la intensidad de las reacciones. Esto es de ayuda en la detección de varias especificidades de anticuerpos que exhiben efecto de dosis.

Procedimiento	
Paso	Acción
1	Agitar suavemente o inclinar el tubo para resuspender el botón celular del fondo del tubo La técnica inclinando el tubo usa la solución para desprendere los eritrocitos hacia la pared del tubo
2	Observar la forma en que los eritrocitos se dispersan desde el fondo del tubo
3	Registre la reactividad de acuerdo con las descripciones de la tabla más abajo La reactividad debiera evaluarse cuando los eritrocitos hayan sido completamente resuspendidos desde el fondo del tubo

Interpretación (Observación macroscópica)

Intensidad de Reacción	Score o puntaje	Aglutinación Tubo/Micoplaca
4+	12	Botón único. Fondo claro. Sin células libres.
3+	10	Varios aglutinados de gran tamaño. Fondo claro. Sin células libres
2+	8	Muchos aglutinados de mediano tamaño. Fondo claro. Sin células libres
1+	5	Numerosos aglutinados pequeños. Fondo turbio por GR libres
+/-	2	Apenas la aglutinación es visible. Fondo turbio por GR libres
0	0	Ausencia de aglutinación

<https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2022/03/RECOMENDACIONES-PARA-LA-CLASIFICACION-SANGUINEA-ABO-2022.pdf>



1. Para uniformidad y reproducibilidad, la graduación de las reacciones de aglutinación debiera estandarizarse entre los miembros del equipo de laboratorio.

Notas

2. Este procedimiento debiera estar descrito en un procedimiento escrito disponible para todo el equipo.
3. Algunos sistemas usan valores numéricos asignados para las reacciones observadas (score).

Cuando se recibe el primer lote de un nuevo reactivo a incorporar a la rutina del laboratorio de inmunohematología, que hará el reemplazo de otro reactivo existente, por ejemplo, cambio de metodología o proveedor o la implementación de un nuevo método se debe previamente realizar la verificación de este. Para ello, pueden emplearse guías metodológicas como CLSI EP12-A2 o equivalentes.

ANTISUEROS CLASIFICADORES

Hasta el principio de los años ochenta se utilizaron sueros policlonales humanos como fuente de reactivos hemoclasificadores del grupo ABO. La producción de sueros policlonales humanos está asociada a tareas laboriosas y prolongadas, y además a un conjunto de problemas vinculados al manejo y administración de material biológico en humanos (riesgo de transmisión de infecciones como hepatitis B ó C, VIH, etc.).

A comienzos de la década de los ochenta se generalizó la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) con aplicaciones médicas, diagnósticas y en la investigación científica. La producción de AcMo tiene su origen el año 1975 cuando se produjo el primer AcMo de especificidad predefinida al fusionar linfocitos, obtenidos del bazo de ratones inmunizados, con células de mieloma de origen murido, adaptadas a crecer de manera continua en cultivo de células.

La aplicación de esta tecnología para el desarrollo de reactivos hemoclasificadores ha resultado exitosa y desde los años ochenta, se han producido AcMo anti-A y anti-B de tipo IgM con las características adecuadas para ser empleados como reactivos de hemoclasificación. Su posterior producción a escala industrial ha hecho que hoy día sean de uso universal.

(https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332006000300005)

Criterios visuales, verificar:

- ✓ Que el volumen de reactivo de los recipientes esté acorde a la especificación del fabricante.
- ✓ Que la etiqueta no tenga defectos de impresión y sea legible.
- ✓ Que el reactivo cuente con instrucciones de uso (inserto), en español.

Los reactivos inmunohematológicos deben cumplir estándares de potencia, especificidad y avidez, según la familia de reactivos a verificar



Sueros clasificadores ABO y RhD				
Especificidad	100%			
Potencia	Suero Anti-A: 128 con células A 64 con células AB	Suero Anti-B: 128 con células B 64 con células AB	Suero Anti-AB: 128 con células A 128 con células B 64 con células AB	Suero Anti-D: 32
Avidez	Menor o igual a 60 segundos			

La **potencia** podrá determinarse únicamente en reactivos líquidos destinados para el uso en soporte tubo.

En el caso de la determinación de **avidez**, esta determinación deberá realizarse para reactivos destinados a uso en soporte lámina en procesos de reclasificación.

CONTROL DE CALIDAD ANTISUEROS CLASIFICADORES

Los reactivos inmunohematológicos corresponden a un grupo específico de reactivos usados en el estudio de los antígenos y anticuerpos de los sistemas sanguíneos humanos; son indispensables en la práctica diaria de los Servicios de Sangre y son de gran importancia en pruebas sanguíneas pre y post-transfusionales.

Muestra

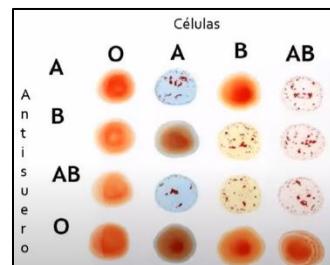
1. Sangre total
2. Glóbulos rojos lavados y suspendidos 3 al 5% en EDTA (A1, B, AB, O (R1r), O(rr)

Reactivos

Anti-A, Anti-B, Anti-A, B (opcional), Anti-D

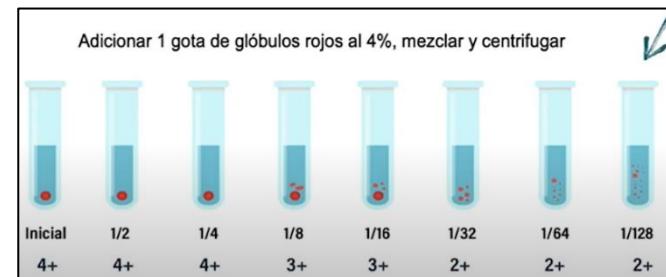
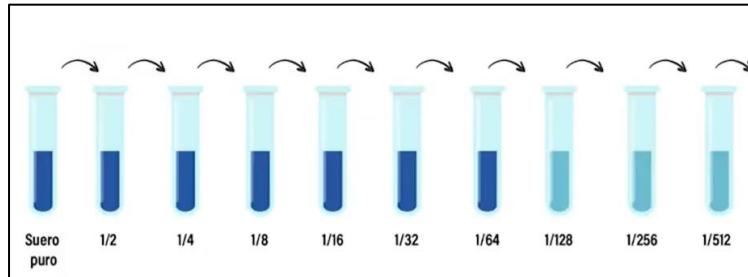
AVIDEZ: Medida de la capacidad de unión y velocidad del anticuerpo que se combina con su correspondiente antígeno, es decir, habilidad de un reactivo para dar reacciones observables en un tiempo

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Seleccionar el antisuero a evaluar
2	En una lámina de vidrio limpia, depositar 2 gotas del suero en estudio más 1 gota de glóbulos rojos al 40% en suero homólogo y que posean el antígeno específico.
3	Mezclar con bagueta de vidrio y describir un círculo de 2,5 cm de diámetro, rotar la placa de lado a lado.
4	Cronometrar el tiempo transcurrido a partir de la mezcla y el inicio de la reacción y el grado de aglutinación en un tiempo menor o igual a 60 segundos.
5	Registre los resultados



POTENCIA o TÍTULO: Máxima dilución del reactivo a la cual es capaz de reaccionar con sus respectivas células. El resultado se expresa como el recíproco de la máxima dilución que entregue una aglutinación macroscópica de 1+ ante un volumen constante de glóbulos rojos al 3%-4%

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Seleccionar el antisuero a evaluar
2	Disponer una serie de 12 tubos Khan para realizar diluciones seriadas del antisuero con buffer PBS o solución salina isotónica (v/v) (Diluciones madre) Colocar a partir del tubo nº 2 un volumen constante (ej.:0.5ml) del diluyente apropiado. El tubo 1 corresponde al suero sin diluir.
3	Depositar en los tubos 1 y 2, igual volumen de suero en estudio al usado para diluir (ej.:0.5ml). Mezclar varias veces el contenido del tubo 2 con una punta de pipeta limpia, evitando la formación de burbujas. Se obtendrá en este tubo una dilución de 1 en 2.
4	Tomar del tubo 2 igual volumen elegido (0.5ml) y agregarlo al tubo 3. Mezclar en forma similar al punto 2. Se obtendrá una dilución 1 en 4.
5	Repetir el proceso utilizando cada vez una punta de pipeta limpia para cada dilución, hasta terminar la corrida de tubos.
6	Preparar otra serie de 12 tubos en donde se realizará la reacción. Depositar 100 ul de cada dilución madre en los tubos correspondientes y agregar 50ul de la suspensión en salino al 4% de las células apropiadas. Puede utilizar la misma punta si se dispensa primero la dilución mayor.
7	Mezclar suavemente y centrifugar en programa de lectura.
8	Examinar macroscópicamente las reacciones, evaluar y registrar los resultados. Como el fenómeno de prozona puede producir reacciones más débiles o negativas en las diluciones menores, es preferible empezar la lectura por el tubo que contiene la mayor dilución.



Interpretación

El título es recíproco a la mayor dilución que presenta aglutinación de 1+, o hemólisis, ej.: si la dilución 1/64 da una reacción positiva pero la dilución siguiente 1/128 es negativa, el título es 64. El reactivo sin diluir debe dar reacción de 4+

Notas

- 1.- Es esencial una técnica de pipeteo cuidadosa. Se recomienda el uso de pipetas automáticas con puntas desechables, las que deben cambiarse después de efectuar cada dilución.
- 2.- Deben utilizarse siempre los tiempos, temperaturas de incubación y centrifugación considerados óptimos.
- 3.- Las determinaciones son más exactas si se emplean mayores cantidades de suero en las diluciones, por lo que se debe trabajar con dilución madre, ya que da resultados más confiables que las diluciones individuales.

ESPECIFICIDAD: Habilidad que posee un reactivo con su respectivo anticuerpo de reconocer un antígeno discriminando mínimas diferencias en su estructura química. Es así como cada antisuero al enfrentarlo en reacción con las diferentes células no debe producir aglutinaciones positivas no deseadas (Los antisueros deben tener una especificidad de 100%)

	Procedimiento
	Acción
1	Preparar una suspensión al 3% en EDTA 5% de glóbulos rojos de grupo A1, A 2, B, A1B, A2B
2	Marcar igual número de tubos de Kahn por cada suero en estudio.
3	Agregar a cada tubo 1 gota de la suspensión de glóbulos rojos correspondiente
4	Agregar a cada tubo 2 gotas del suero en estudio
5	Mezclar y centrifugar inmediatamente, según tiempo y velocidad estandarizados
6	Efectuar lectura macroscópica verificando la presencia o ausencia de aglutinación y hemólisis
7	. Registrar los resultados

PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE GLÓBULOS ROJOS AL 3%

Principio	Una suspensión de glóbulos rojos al 3% se usa en muchas técnicas serológicas. No tiene que estar exactamente al 3%, Una aproximación logra la proporción adecuada de suero con células para la mayoría de los procedimientos y para una cantidad adecuada de glóbulos rojos para que se puedan leer y clasificar las reacciones.
Muestra	Sangre completa
Reactivos	Suspensión de glóbulos rojos comerciales al 3% Solución salina o PBS

Para preparar 10 ml de suspensión de eritrocitos al 3%

Paso	Procedimiento
	Acción
1	Transferir al menos 1 ml de sangre total a un tubo de 10 ml
2	Lavar los glóbulos rojos con solución salina o buffer fosfato (PBS), centrifugar por 5 minutos para obtener un pellet celular. Repetir 2-3 veces. El sobrenadante final debiera ser claro, remover por aspiración con pipeta Pasteur
3	Transferir 0.3 ml de los glóbulos rojos lavados a un tubo con 9.7 ml de solución salina, PBS, o solución de Alsever
4	Cubrir el tubo con parafilm. Mezclar con cuidado por inversión varias veces.
5	Para comparar el color y densidad de la suspensión, transferir un volumen de la suspensión a un tubo Khan. También transferir un volumen similar de suspensión conocida al 3% (reactivo celular comercial) a otro tubo Khan . Disponer los 2 tubos en frente de una fuente luz para compararlos.
6	Para comparar el tamaño del botón de glóbulos rojos esperado a partir de una suspensión al 3%, transferir 1 gota de la suspensión a un tubo Khan. De igual manera, transferir 1 gota de la suspensión comercial a otro tubo Khan. Centrifugar los tubos en una centrífuga serológica usando el tiempo indicado para salino. El tamaño de ambas aglutinaciones debiera ser similar.

Nota: Para mejores resultados use suspensiones de eritrocitos sólo el día de la preparación, a menos que se valide la estabilidad de la suspensión por más días.

MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

El sistema ABO consta de cuatro fenotipos mayores: A, B, O y AB. Estos cuatro fenotipos se determinan mediante la presencia o ausencia de dos antígenos (A y B) en los glóbulos rojos.

El sistema ABO también se caracteriza por la presencia o ausencia de anticuerpos naturales, que reciben el nombre de isoanticuerpos, dirigidas hacia los antígenos A y/o B ausentes.

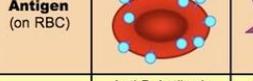
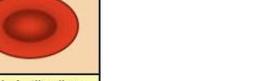
Existe una relación recíproca e inversa entre la presencia de antígenos A y/o B en los glóbulos rojos y la presencia de anti-A, anti-B, o ambos en suero. Por ejemplo, los individuos con grupo O, que no tienen antígenos A y B en los glóbulos rojos, poseen naturalmente tanto anti-A como anti-B. Se cree que las fuentes inmunitizantes para que ocurran dichos anticuerpos naturales, son las bacterias intestinales como las Enterobacterias, que han demostrado poseer estructuras parecidas a ABO en sus cubiertas lipopolisacáridicas.

El nivel de expresión ABO con las características de un eritrocito adulto se observan en general entre los 2 a 4 años de edad.

Los anticuerpos naturales anti-A y anti-B no están presentes en el suero del recién nacido, y si lo están, son de origen materno. La síntesis de anti-A y anti-B en el lactante puede desarrollarse entre los 3 y 6 meses de edad, y casi todos los niños muestran estas isoanticuerpos séricas al finalizar el primer año de edad. La concentración o título sérico de anti-A y anti-B aumenta durante la primera infancia y logra alcanzar los niveles de un adulto entre los 5 y 10 años de edad.

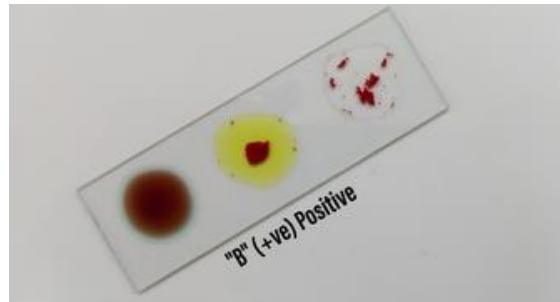
Si los antígenos de los eritrocitos del donante no son compatibles con el receptor, la sangre transfundida es capaz de inducir una respuesta inmune en el receptor. Por lo tanto, es importante identificar las sustancias antigenicas tanto en los glóbulos rojos del donante como del receptor.

Los anticuerpos más inmunogénicos y clínicamente importantes son aquellos dirigidos contra los antígenos de los sistemas sanguíneos ABO y Rh.

ABO Blood Groups				
Antigen (on RBC)	Antigen A	Antigen B	Antigens A + B	Neither A or B
Antibody (in plasma)	Anti-B Antibody 	Anti-A Antibody 	Neither Antibody	Both Antibodies 
Blood Type	Type A Cannot have B or AB blood Can have A or O blood	Type B Cannot have A or AB blood Can have B or O blood	Type AB Can have any type of blood Is the universal recipient	Type O Can only have O blood Is the universal donor

Principio	Dado las consecuencias graves asociadas a incompatibilidad ABO, la tipificación ABO y pruebas de compatibilidad son el fundamento de las pruebas pretransfusionales y son un componente importante en los trasplantes.
Muestra	Se debe consultar las instrucciones del fabricante antes de realizar las pruebas; algunos recomiendan el uso de sangre total, mientras que otros recomiendan usar suspensiones de glóbulos rojos menos concentradas en solución salina, suero o plasma.
Reactivos	1. Sueros clasificadores: Anti-A, Anti-B, Anti-A, B (opcional)

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Colocar 1 gota de anti-A sobre la lámina de vidrio limpia
2	Colocar 1 gota de anti-B sobre la lámina de vidrio limpia
3	Colocar 1 gota de anti-AB sobre la lámina de vidrio limpia
4	Añadir a cada gota de reactivo, una gota de glóbulos rojos bien mezclados suspendidos (en salino, suero o plasma)
5	Mezclar el reactivo y los glóbulos rojos cuidadosamente, usando una bagueta o elemento similar para cada reactivo Extender la mezcla en un área aproximada de 20 mm × 40mm
6	Inclinlar la lámina suavemente de lado a lado de manera continua hasta 2 minutos. No poner la lámina sobre una superficie caliente (como fuente luminosa de lectura)
7	Leer, interpretar y registrar los resultados de las reacciones



- Interpretación**
1. Una aglutinación fuerte de los glóbulos rojos en presencia de cualquier reactivo anti ABO, es un resultado positivo.
 2. La ausencia de aglutinación a los 2 minutos es un resultado negativo.
 3. Muestras con resultados débiles o dudosos debieran analizarse usando técnica en tubo.

- Notas**
1. Todos los reactivos deben usarse siguiendo las instrucciones del fabricante.
 2. La prueba en lámina no es útil para la detección de anticuerpos ABO en suero o plasma.

La utilización de técnica en lámina para la clasificación sanguínea ABO no se encuentra reconocida por el ISP, debido a lo siguiente:

- Es la técnica menos sensible para clasificación ABO, y por lo tanto presenta mayores errores
- Generalmente involucra sólo la parte globular (directa) de la clasificación ABO
- No permite detectar discrepancias y subgrupos en la clasificación ABO

Dado lo anterior, la técnica en lámina sólo sirve para “reclasificar” y verificar el grupo sanguíneo ABO previamente establecido por una técnica en tubo, microplaca o microcolumna. ***En consecuencia, no debe ser utilizada en la rutina y no es reconocida para informar resultados en donantes, pacientes y en el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) de Inmunohematología del ISPCH.***

(<https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2022/03/RECOMENDACIONES-PARA-LA-CLASIFICACION-SANGUINEA-ABO-2022.pdf>)

DETERMINACIÓN DE GRUPO ABO EN GLÓBULOS ROJOS Y SUERO

PRUEBA EN TUBO

Principio

Dado las consecuencias graves asociadas a incompatibilidad ABO, la tipificación ABO y pruebas de compatibilidad son el fundamento de las pruebas pretransfusionales y son un componente importante en los trasplantes. La garantía de calidad de los bancos de sangre incluye un control, el día de su uso, de todos los reactivos utilizados habitualmente en los procedimientos immunohematológicos, con el fin de asegurar que funcionan correctamente y de comprobar las técnicas.

Muestra

El inserto del reactivo debe ser consultado para determinar los requisitos específicos de la muestra.

Generalmente, pueden usarse muestras de sangre con o sin anticoagulante para la determinación de grupo ABO.

Los glóbulos rojos pueden suspenderse en suero o plasma autólogo, solución salina o pueden ser lavados y luego ser resuspendidos en solución salina.

Reactivos

1. Sueros clasificadores: Anti-A, Anti-B, Anti-A, B (opcional).
2. Suspensión 2% a 5% de glóbulos rojos A1, A2 (opcional), y B.
3. Los glóbulos rojos pueden ser comerciales o preparados diariamente en el laboratorio
4. Material control



	Procedimiento
Paso	Acción
PRUEBA DIRECTA	
1	Colocar una gota de reactivo anti-A en un tubo limpio y rotulado
2	Colocar una gota de reactivo anti-B en un tubo limpio y rotulado
3	Colocar una gota de reactivo anti-A, B en un tubo limpio y rotulado (opcional)
4	Con pipeta Pasteur a cada tubo colocar 1 gota de suspensión de glóbulos rojos del 2% a 5% (en salino, suero o plasma)
5	Mezclar suavemente y centrifugar en centrífuga calibrada
6	Resuspender suavemente el botón celular y examinar en busca de aglutinación
7	Leer, interpretar y registrar los resultados. Comparar los resultados con los obtenidos en la prueba inversa
PRUEBA INVERSA (<i>Suero o Plasma</i>)	
1	Colocar 2 gotas de Suero o plasma a dos tubos limpios y rotulados
2	Colocar 1 gota de células reactivo A1 al tubo rotulado A1
3	Colocar 1 gota de células reactivo B al tubo rotulado B
4	Colocar una gota de células reactivo A2 a un tercer tubo con 2 gotas de plasma o suero, si desea
5	Mezclar suavemente y centrifugar en centrífuga calibrada
6	Examinar el suero suspendido sobre los glóbulos rojos para evidenciar hemólisis. Resuspender suavemente las células del fondo del tubo, y examinar para ver aglutinación
7	Leer, interpretar y registrar los resultados. Comparar los resultados con los obtenidos en la prueba directa



Interpretación

1. Aglutinación de los glóbulos rojos testeados, ya sea hemólisis o aglutinación en las pruebas con suero o plasma, constituye un resultado positivo.
2. Una suspensión de glóbulos rojos después de resuspender los eritrocitos del fondo del tubo, es un resultado negativo.
3. La interpretación de las pruebas de glóbulos rojos y plasma o suero para determinación de ABO se resumen en la siguiente tabla:

Routine ABO Grouping							
Reaction of Red Cells with Antisera (Red Cell Grouping)		Reaction of Serum with Reagent Red Cells (Serum Grouping)			Interpre- tation	Prevalence (%) in US Population	
Anti-A	Anti-B	A ₁ Cells	B Cells	O Cells		European Ethnicity	African Ethnicity
0	0	+	+	0	0	45	49
+	0	0	+	0	A	40	27
0	+	+	0	0	B	11	20
+	+	0	0	0	AB	4	4
0	0	+	+	+	Bombay*	Rare	Rare

+ = agglutination; 0 = no agglutination.
*H null phenotype (see section on H antigen).

4. Cualquier discrepancia entre los resultados de la prueba directa (con glóbulos rojos) y la prueba inversa (plasma) debiera ser resuelta antes de la interpretación y registro del grupo ABO, ya sea paciente o donante.
5. Las aglutinaciones con campo mixto debieran ser investigadas.

Notas

1. Todos los reactivos deben ser usados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
2. Las reacciones positivas generalmente dan reacciones de aglutinación de 3+ a 4+ con los antisueros ABO; las reacciones entre el suero y las células reactivo pueden tener aglutinaciones más débiles. Las pruebas séricas pueden incubarse a temperatura ambiente de 5 a 15 minutos para potenciar las reacciones débiles.

Controles La frecuencia del control de calidad debe definirse en función del número de muestras analizadas, por tanto, cuando se procesan números pequeños de muestras, los controles pueden realizarse considerando tres opciones:

- al principio y al final de las corridas analíticas,
- intercalando el material de control de forma aleatoria o
- intercalándolo de forma secuencial (cada un determinado número de muestras)

Cuando el número de muestras analizado es mayor y continuo en el laboratorio, las corridas analíticas serán definidas en número de muestras analizadas o en tiempo de trabajo, siendo recomendado controlar al menos cada 24 horas o su equivalente en número de muestras analizadas.

Se debe registrar el resultado del control con su potencia expresada en cruces para cada reacción y su interpretación, debe ponerse especial énfasis en la detección de reacciones más débiles de lo esperado frente al estándar definido, que puedan indicar una baja en la potencia del reactivo. Si esto se detecta, se debe usar otro material control para confirmar el hallazgo y si se confirma, debe verificar la potencia del reactivo en cuestión antes de continuar con su uso.

El material control utilizado serán muestras con clasificación ABO y RhD con resultado conocido y validado. Existen en el mercado diferentes marcas comerciales que pueden utilizarse para este fin.

Características del Material Control ABO-RhD

Reactivos a Controlar	Control Positivo	Control Negativo
Anti-A	Glóbulos Rojos A	Glóbulos Rojos B
Anti-B	Glóbulos Rojos B	Glóbulos Rojos A
Anti-AB	Glóbulos Rojos A y B	Glóbulos Rojos O
Anti-D	Glóbulos Rojos D Positivo	Glóbulos Rojos D Negativo
Células Testigo A1	Suero/Plasma B	Suero/Plasma A
Células Testigo B	Suero/Plasma A	Suero/Plasma B

DETERMINACIÓN DE Rh (D) —PRUEBA EN TUBO

Principio	El Sistema Rh es altamente inmunogénico y complejo, con numerosos polimorfismos y alelos de importancia clínica. Dado las consecuencias clínicas, la determinación del factor RhD en las pruebas pretransfusionales, es la segunda en importancia después de ABO. La determinación del antígeno D del sistema sanguíneo Rh, corresponde a la detección de la presencia o ausencia del antígeno D en la membrana de los glóbulos rojos. Se efectúa enfrentando glóbulos rojos del paciente o donante con anticuerpos con especificidad anti-D, y se visualiza macroscópicamente por aglutinación directa después de la centrifugación. Una persona que posee en sus glóbulos rojos el antígeno D se conoce como “Rh D positivo”, mientras que la ausencia del antígeno D corresponde a una persona “Rh D negativo”.
Muestra	Sangre completa con o sin anticoagulante (EDTA, ACD). Los glóbulos rojos pueden ser suspendidos en suero o plasma autólogo, en PBS o solución salina, o pueden lavarse y luego resuspender en solución salina.
Reactivos	Suero anti-D IgM o IgM/IgG (comercial)(idealmente dos antisueros de líneas celulares diferentes)

Paso	Procedimiento
	Acción
1	Colocar 1 gota de anti-D en un tubo limpio y rotulado. Nota: La adición del reactivo previo a la adición de la suspensión de glóbulos rojos actúa como un chequeo visual de la presencia del anti-D para eliminar las reacciones falso negativo, causadas por la omisión del reactivo.
2	Colocar 1 gota de del control de reactivo a otro tubo etiquetado.
3	Colocar 1 gota de suspensión de glóbulos rojos del 2% a 5% (en salino, suero o plasma).
4	Mezclar suavemente y centrifugar de acuerdo con el tiempo y velocidad especificadas por el fabricante.
5	Resuspender suavemente y examinar en busca de aglutinación.
6	Graduar las reacciones y registrar los resultados de la prueba y control.

- Interpretación**
1. Si hay aglutinación igual o mayor a 3+, sin aglutinación en el tubo control D, la clasificación sanguínea es Rh D positiva.
 2. Si la aglutinación es negativa, debe continuarse el estudio en el propio laboratorio en busca de variantes del antígeno Rh D de acuerdo con las recomendaciones del ISP (<https://www.ispch.cl/sites/default/files/RECOMENDACIONES%20PARA%20LA%20CLASIFICACI%C3%93N%20SANGUINEA%20RhD.pdf>)
 3. Si la aglutinación es igual o menor a 2+, debe continuarse el estudio molecular en laboratorios que dispongan de las metodologías, como el Laboratorio de Referencia del Instituto de Salud Pública de Chile para identificar el tipo de variante del antígeno Rh D
 4. Un resultado negativo en tubo con anti-A y/o anti-B es un control negativo válido si se usa un reactivo anti-D bajo en proteínas.
 5. La aglutinación en el tubo control invalida la prueba.

Control D Suero control D certificado o PBS: Determina especificidad del suero anti-D. Control debe dar negativo.

ESTUDIO Rh D VARIANTE EN TUBO

Principio

Algunos antígenos D son reconocidos solo por una prueba de Antiglobulina Humana Indirecta (PAI).

Variantes del antígeno D: Expresión fenotípica presente en menos del 1% de la población, tienen una expresión disminuida o parcial del antígeno D en glóbulos rojos, incluye los fenotipos D débil, D parcial y Del.

Muestra

Muestras de sangre recogidas con anticoagulantes (EDTA, CPDA, ACD)

Para la prueba es preferible usar células recién extraídas.

No deben emplearse muestras de sangre con grandes hemólisis o contaminación.

Reactivos

1. Reactivo Antiglobulina Humana, poliespecífico o anti-IgG
2. Células control recubiertas con IgG
3. Células con fenotipo R1r y rr para usar como controles
4. Reactivo anti-D IgG

	Procedimiento
Paso	Acción
1	El mismo tubo original con anti-D puede usarse para el estudio de D variante si se ha usado un reactivo anti-D Blend (IgM/IgG) o IgG. (Ir directo al paso 5)
2	Colocar 1 gota de anti-D en un tubo limpio y rotulado
3	Colocar 1 gota de reactivo control apropiado en un segundo tubo rotulado
4	A cada tubo, añadir 1 gota de glóbulos rojos suspendidos en solución salina al 2% a 5%
5	Mezclar e incubar ambos tubos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Generalmente, 15 a 30 minutos a 37 °C
6	Si lo desea, centrifugar y leer después de la incubación resuspendiendo suavemente los glóbulos rojos del fondo del tubo y examinar si hay aglutinación
7	Lavar los glóbulos rojos un mínimo de 3 veces con solución salina

8	Agregar el reactivo de Antiglobulina Humana de acuerdo con las instrucciones del fabricante
9	Mezclar suavemente y centrifugar de acuerdo con la calibración de la centrifuga
10	Resuspender suavemente y examinar en busca de aglutinación, graduar y registrar los resultados
11	Agregar células control cubiertas con IgG para confirmar la validez de los resultados negativos

Interpretación

Anti-D	Controles	PAD	Informe	Observación
0	OK	0	RhD Negativo	-
+	OK	0	RhD Positivo (Variante)	Presencia de variante débil o parcial del antígeno D. Se recomienda derivar para estudio de identificación
+	OK	+	No se puede interpretar	Realizar estudios adicionales (Ej. Técnicas de elución y adsorción). Derivar para estudio de identificación a laboratorios que dispongan de las metodologías

Controles

Células R1r como control positivo y Células rr como control negativo, usar reactivo anti-D **IgG**

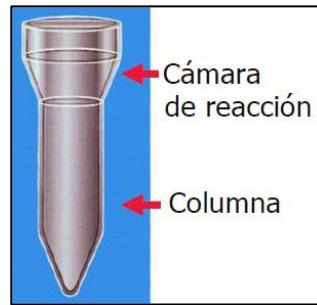
Notas

No todos los reactivos anti-D son útiles para la detección de D variantes, lea el inserto del reactivo para la realización del procedimiento y los controles respectivos.

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN COLUMNAS

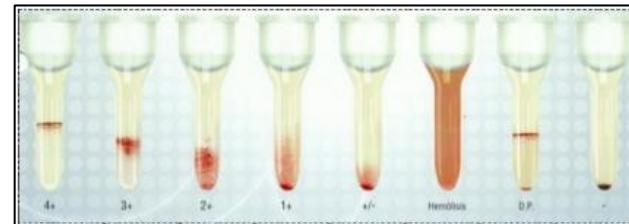
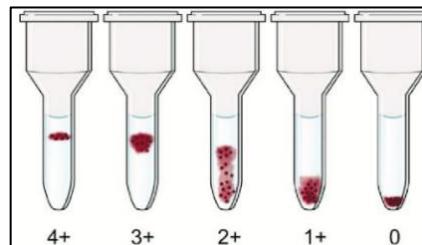
Principio

Esta técnica consiste en una tarjeta plástica con 6 a 8 microcolumnas, las cuales tienen una cámara de reacción en la parte superior y en la parte inferior tienen un gel transparente o microesferas de vidrio, los que pueden contener suero antiglobulina humana o cualquier otro antisuero dependiendo de lo que se quiera determinar (también pueden ser neutros).



La determinación de aglutinación por medio de esta técnica se basa en la separación de los eritrocitos en un gel poroso o microesferas de vidrio en relación con su tamaño, posterior a una centrifugación, donde los de mayor tamaño debido a la aglutinación, quedarán atrapados en la región superior de la columna y los de menor tamaño, y que por lo tanto no han aglutinado, o lo han hecho en menor grado, quedan atrapados a lo largo de la columna o pasan al fondo de ésta.

Esta técnica tiene como objetivo estandarizar el uso de reactivos y la lectura de la reacción antígeno-anticuerpo con facilidad y repetitividad, permitiendo de esta forma disminuir la influencia del operador.



Lectura de los resultados

Negativo	-	Banda de hematíes en el fondo de la columna, resto de la columna sin aglutinados visibles
Positivo	+/-	Escasos aglutinados de pequeño tamaño en la mitad inferior de la columna
	1+	Algunos aglutinados de pequeño tamaño en la columna
	2+	Aglutinados de tamaño pequeño o mediano a lo largo de la columna
	3+	Banda superior de aglutinados, de tamaño mediano en la mitad superior de la columna
	4+	Banda de hematíes aglutinados en la parte superior de la columna
DP		Doble Población (doble banda de hematíes, en el fondo y en la parte superior de la columna)

Almacenamiento y estabilidad

- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Almacenar en posición vertical con el precinto intacto a la temperatura indicada de acuerdo con el tipo de tarjeta
- No congelar.
- No exponer las tarjetas a un calor excesivo, a instrumentos de aire acondicionado ni a salidas de ventilación.
- No utilizar las tarjetas si las condiciones de temperatura durante el almacenamiento o transporte son inadecuadas

Examinar macroscópicamente la ausencia de:

1. Turbidez o cambio de color en los microtubos
2. Presencia de gotas dispersas en la copa de reacción
3. Burbujas atrapadas en el gel
4. Microtubo sin sobrenadante
5. Disminución de gel o agrietado

DETERMINACIÓN DE GRUPO ABO RhD ADULTO EN COLUMNA (Grifols)

Principio

El principio del método se basa en la técnica en gel descrita por Y. Lapierre para la detección de las reacciones de aglutinación de los hematíes. La aglutinación se produce al entrar en contacto los antígenos eritrocitarios con los anticuerpos correspondientes, presentes en el reactivo o en la muestra de suero o plasma. La tarjeta DG Gel es un soporte de plástico constituido por 8 microtubos. Cada microtubo está formado por una columna y una cámara de dispensación/incubación. Cada columna contiene microesferas de dextrans polimerizados en medio tamponado que actúan como filtro. Los dextrans se encuentran mezclados con un reactivo que contiene anticuerpos específicos o un tampón. Los microtubos que contienen los anticuerpos específicos incorporados a la solución de gel actúan como medio de reacción y los hematíes aglutinan en contacto con los anticuerpos. Los microtubos sin anticuerpos se utilizan en técnicas en las que los anticuerpos reaccionan directamente con los hematíes en la cámara de incubación y para controles. Durante la centrifugación, los aglutinados de hematíes son atrapados según su tamaño, en la superficie o a lo largo de la columna de gel. Los hematíes no aglutinados descienden hasta el fondo del microtubo.

Muestra Muestras de sangre de extracción reciente, recogida con los anticoagulantes habituales de banco de sangre (obtención de plasma) o sin anticoagulantes (obtención de suero).

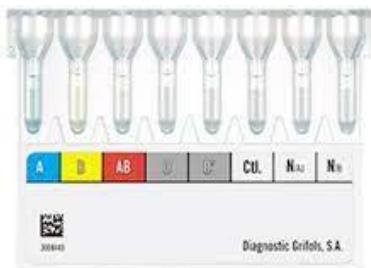
No utilizar muestras hemolizadas, turbias, contaminadas o con presencia de coágulos

Reactivos

1. Tarjetas para aglutinación en columna DG Gel ABO/Rh (2D)
2. Diluyente de muestras (DG Gel Sol).
3. Hematíes reactivo para grupo inverso (A1/B) 0,8%-1%



	Procedimiento
Paso	Acción
Determinación de los antígenos del sistema ABO/Rh (microtubos A/B/AB/D/D'/Ctl.)	
1	Identificar las tarjetas y muestras a utilizar
2	Despegar con precaución la lámina de metal que cubre los microtubos para prevenir contaminaciones cruzadas entre ellos y dispensar con precaución la suspensión de hematíes, evitando que la punta de la pipeta entre en contacto con la pared o el contenido de los microtubos
3	Preparar una suspensión de hematíes al 5% en DG Gel Sol (50 µl de sedimento o concentrado de hematíes en 1 ml de DG Gel Sol). Asegurar la resuspensión de los hematíes antes de utilizar. ¹
4	Añadir en cada uno de los microtubos indicados, 10 µl de suspensión de hematíes al 5%
Determinación del grupo sérico (microtubos N)	
5	Homogeneizar los viales de hematíes reactivo A1/B
6	Dispensar en el microtubo N/A1 50 µl de hematíes reactivo A1 y en el microtubo N/B 50 µl de hematíes reactivo B
7	Añadir 50 µl de suero o plasma
8	Centrifugar en centrífuga para tarjetas DG Gel
9	Leer y registrar los resultados



Interpretación de los resultados

Sistema ABO

<i>Grupo hemático</i>				<i>Grupo sérico</i>		<i>Interpretación</i>
Microtubo A	Microtubo B	Microtubo AB	Microtubo Ctl.	Microtubo hematíes reactivo A1	Microtubo hematíes reactivo B	Grupo ABO
0	0	0	0	+	+	O
+	0	+	0	0	+	A
0	+	+	0	+	0	B
+	+	+	0	0	0	AB

Sistema Rh (antígeno D)

Microtubo D	Microtubo D'	Microtubo Ctl	Interpretación
+	+	0	D positivo
0	0	0	D negativo
0	+	0	D débil o parcial
+	0	0	

Controles El microtubo Ctl. debe ser negativo. Si es positivo, invalidar la prueba. Repetir la determinación lavando previamente los hematíes con solución salina fisiológica y preparar de nuevo una suspensión de los hematíes lavados. Si el microtubo Ctl. de la repetición es negativo se pueden interpretar los resultados de la prueba, si es positivo invalidar la prueba.

Al igual que en clasificación en tubo debe usarse muestras con grupo sanguíneo ABO y RhD conocidos diariamente.

Notas:

1. Los resultados por sí solos no son un diagnóstico, deben valorarse en conjunto con la información clínica y otros datos del paciente.
2. En caso de obtener una discrepancia hemático-sérica, debe investigarse antes de emitir el resultado.
3. Sistema ABO/Rh: ante reacciones +/- a 3+ debe investigarse la presencia de un antígeno débil.
4. Se deben comprobar las reacciones negativas con el reactivo anti-D, utilizando otros reactivos y técnicas capaces de detectar diferentes variantes del antígeno D.
5. En caso de obtener resultados discordantes en los microtubos D y D' debe interpretarse como un antígeno D débil o parcial. Se recomienda caracterizar la expresión de este antígeno.
6. La observación de hemólisis (sobrenadante y/o columna de gel de color rosado) total o parcial en los microtubos debe interpretarse como un resultado positivo, después de comprobar que no se trata de una hemólisis debida a un problema de extracción y/o manipulación de la muestra.
7. Ocasionalmente puede darse una retención de hematíes en la cámara de incubación con muestras positivas de 4+, que no interfiere en la lectura del resultado.

Aglutinación en columna / tarjeta La columna contiene gel, microesferas...

Utilizan aditivos (LISS) para potenciar la reacción Ag-Ac y reducir el tiempo de incubación.
La reacción es semipermanente y puede evaluarse horas-días después.

Ventajas
Entrenamiento mínimo y poca manipulación.
Se requieren pocos reactivos.

Desventajas
Requieren equipamiento
Muy sensibles

Gel Technique

Gel card for blood group determination

Microtube

Agglutination

Gel

ESTUDIO Rh D VARIANTE TÉCNICA AGLUTINACIÓN EN COLUMNAS (GEL)

Muestra Muestras de sangre de extracción reciente, recogida con los anticoagulantes habituales de banco de sangre (obtención de plasma) o sin anticoagulantes (obtención de suero).
No utilizar muestras hemolizadas, turbias, contaminadas o con presencia de coágulos.

Reactivos

1. Tarjetas para aglutinación en columna DG Gel Coombs
2. Diluyente de muestras (DG Gel Sol)
3. Antisuero Anti.D IgG

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Preparar una suspensión 1% con DG Sol de los eritrocitos a tipificar
2	En un microtubo de la tarjeta DG Gel Coombs, depositar 50 ul de los eritrocitos suspendidos al 1%
3	Agregar 25 ul del antisuero Anti-D IgG
4	Incubar a 37°C 15 minutos en incubador Grifols
5	Centrifugar en centrífuga para tarjetas Grifols
6	Leer y registrar los resultados. Interpretar de acuerdo al inserto del reactivo

Controles Células R1r como control positivo y Células rr como control negativo.

PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA INDIRECTA

Principio

La prueba de antiglobulina fue descrita en 1945 por Coombs, Mourant y Race. La prueba de antiglobulina humana (AGH) detecta anticuerpos antieritrocitarios que no producen aglutinación directa (anticuerpos sensibilizantes) fijados a la superficie de los glóbulos rojos. La prueba de antiglobulina utiliza un segundo anticuerpo, originado en otra especie y dirigido contra globulinas humanas, a los que se une y aglutinando así a los glóbulos rojos sensibilizados. El anticuerpo se genera al inyectar animales con globulinas humanas para estimular la producción de anticuerpos contra esa proteína humana extraña y se lo denomina suero SAG. Estos tipos de suero pueden tener diferentes especificidades, incluyendo tanto anti-IgG como anticuerpos contra varias fracciones del complemento. El SAG reacciona con los anticuerpos humanos y con moléculas del complemento que está adheridas a los glóbulos rojos. También puede unirse a anticuerpos y complemento no adheridos a células, sino libres en el suero, lo que efectivamente puede neutralizar al SAG, haciendo que no sea posible detectar las proteínas que se adhieren a los glóbulos rojos. La neutralización del SAG puede causar pruebas de antiglobulina con resultados falsamente negativos. En consecuencia, a fin de evitar la neutralización del SAG, los glóbulos rojos deben ser lavados hasta que estén libres de proteínas neutralizantes antes de dispensar el reactivo.

Una Prueba de Antiglobulina Humana Indirecta (PAI) muestra reacciones *in-vitro* entre glóbulos rojos y anticuerpos. En una PAI, el suero (o plasma) se incuba con glóbulos rojos, que luego se lavan para remover las globulinas no adheridas. La presencia de aglutinación con el agregado de SAG indica la unión de un anticuerpo a un antígeno específico presente en el glóbulo rojo.

Una prueba de antiglobulina indirecta (PAI) se usa para la detección de anticuerpos, identificación de anticuerpos, pruebas cruzadas, y fenotipo eritrocitario.

Causas de resultados falsos negativos en la prueba de antiglobulina

Neutralización del Suero Anti-Globulina (SAG)	<ul style="list-style-type: none"> • Imposibilidad de lavar células adecuadamente para remover todo el suero o plasma. Llenar el tubo por lo menos $\frac{3}{4}$ partes con solución salina para cada lavado • Contaminación del SAG con proteína extraña. No utilizar el dedo o la mano para tapar el tubo. Los goteros contaminados o el gotero del reactivo equivocado pueden neutralizar el contenido completo del envase de SAG • Suero problema con alta concentración de paraproteínas IgG; la proteína puede seguir estando presente incluso luego de múltiples lavados
Interrupción de la prueba	<ul style="list-style-type: none"> • La IgG adherida a los GR puede disociarse, entonces, o quedan escasas moléculas de IgG como para ser detectadas o bien las moléculas libres neutralizan el reactivo SAG • La aglutinación de glóbulos rojos revestidos por IgG se debilita. Centrifugar y leer inmediatamente
Incorrecta conservación de reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • El reactivo SAG puede perder reactividad si se congela. Contaminación bacteriana del reactivo • El calor excesivo o el congelamiento o descongelamiento repetido pueden causar pérdida de reactividad del suero en estudio • Los glóbulos rojos reactivos pueden perder antigenicidad durante el almacenamiento. Otros cambios sutiles de células pueden causar pérdida de reactividad
Procedimientos Incorrectos	<ul style="list-style-type: none"> • La centrifugación excesiva puede compactar tanto a los glóbulos rojos que la agitación requerida para resuspenderlos provoca la separación de los glóbulos rojos aglutinados. La centrifugación insuficiente puede no ser óptima para la aglutinación • La omisión del suero en estudio, el medio potenciador o el SAG puede determinar una prueba falsamente negativa • Las concentraciones globulares excesivas pueden ocultar una aglutinación débil. Las suspensiones insuficientes pueden ser difíciles de leer • Relación suero-células incorrecta o insuficiente
Complemento	<ul style="list-style-type: none"> • Los anticuerpos irregulares, en particular algunos anti-Jka o anti-Jkb, pueden detectarse sólo cuando se utiliza SAG poliespecífico y está presente el complemento activo.
Solución salina	<ul style="list-style-type: none"> • El pH bajo de la solución salina puede disminuir la sensibilidad. El pH óptimo de la solución salina para lavado es de 7,0 a 7,2 • Algunos anticuerpos pueden requerir que la solución salina tenga una temperatura específica para retener el anticuerpo adherido a la célula. Utilizar la solución salina 37°C o a 4°C

Causas de resultados falsos positivos en la prueba de antiglobulina

Células aglutinadas antes del lavado	<ul style="list-style-type: none"> En presencia de potentes aglutininas, los aglutinados pueden no dispersarse durante el lavado. Observar los glóbulos rojos antes de dispensar el SAG o usar tubos de control sustituyendo el SAG por solución salina; la reactividad antes de la adición del SAG o en el control con solución salina invalida la lectura en la fase antiglobulínica
Partículas contaminantes	<ul style="list-style-type: none"> La presencia de polvo o suciedad en el material de vidrio puede causar agrupamiento (no aglutinación) de glóbulos rojos. La fibrina o los precipitados en el suero problema puede producir agrupamientos de glóbulos rojos que simulan una aglutinación
Procedimientos Incorrectos	<ul style="list-style-type: none"> La centrifugación excesiva puede compactar tanto las células que no se dispersan fácilmente y simular una aglutinación La centrifugación antes del lavado cuando se utiliza polietilenglicol o polímeros con cargas positivas puede crear grumos que no se dispersan
Células con Prueba Antiglobulina Directa (PAD) positiva	<ul style="list-style-type: none"> Las células PAD positivas, también lo serán en cualquier prueba antiglobulina indirecta
Complemento	<ul style="list-style-type: none"> Los componentes del complemento, en particular el C4, pueden unirse a células de los coágulos o de los donantes presentes en los segmentos de tubuladura con CPDA-1 durante el almacenamiento a 4 °C y ocasionalmente a temperaturas más altas. Para las PAD, utilizar glóbulos rojos anticoagulados con EDTA, ACD o CPD Las muestras obtenidas en tubos que contienen gel de siliconas pueden tener fijado en su superficie complemento espurio El complemento puede adherirse a los glóbulos rojos en muestras extraídas de guías de infusiones utilizadas para administrar soluciones que contienen dextrosa. Se observan reacciones más fuertes cuando se utilizan agujas de gran calibre o cuando el volumen de las muestras es inferior a 0,5 ml

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

Los anticuerpos irregulares corresponden a aquellos anticuerpos distintos a los anticuerpos naturales del sistema ABO, que pueden aparecer en respuesta a la exposición a un antígeno eritrocitario extraño (transfusión o trasplante), por incompatibilidad materno-fetal o sin un estímulo identificable. En algunos casos, su presencia se asocia a la exposición a antígenos ambientales, bacterianos o virales de características bioquímicas similares a los antígenos eritrocitarios.

El objetivo del escrutinio de anticuerpos irregulares es la detección de anticuerpos clínicamente significativos presentes en la muestra del donante o del paciente. En un escrutinio de anticuerpos irregulares positivo, el autocontrol indicará si es debido a la presencia de un autoanticuerpo, un aloanticuerpo o ambos.

En nuestro país, los anticuerpos irregulares más frecuentemente encontrados en donantes de sangre son: anti-Lea, anti-K y anti-E, mientras que en pacientes son: anti-D, anti-E y anti-K. Todos estos anticuerpos son capaces de provocar hemólisis *in vivo* y acortamiento en la sobrevida normal de los glóbulos rojos.

La heterogeneidad de los anticuerpos, en cuanto a su tipo, clase de inmunoglobulina, temperatura de reacción, tipo de hemólisis asociada, su capacidad de activar complemento, entre otras características, hacen que la pesquisa e identificación de ellos, deba hacerse de una manera estandarizada y controlada.

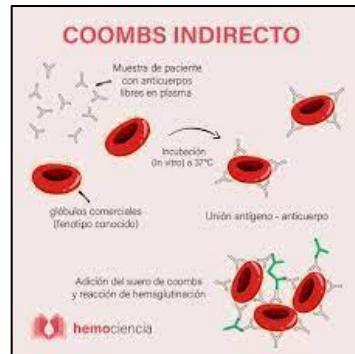
La detección e identificación de anticuerpos irregulares habitualmente se realiza mediante técnicas de aglutinación en tubo, en columna o en microplaca, con etapas a temperatura ambiente, 37°C y antiglobulina humana. En algunas ocasiones y de acuerdo con las condiciones observadas en cada laboratorio, se puede realizar análisis a 4°C frente a la sospecha de crioaglutininas.

A) DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES TÉCNICA EN TUBO

Muestra	Las muestras para estudio deben ser almacenadas a 4°C y las pruebas deben ser realizadas dentro del día, en el menor tiempo posible, no excediendo las 72 horas desde su obtención. Sangre recogida en EDTA o citrato de sodio (suero o plasma) No utilizar muestras fuertemente hemolizadas, turbias o contaminadas
Reactivos	<ol style="list-style-type: none">1. Solución fisiológica o PBS2. Reactivo antiglobulina humana (AGH) polispecífico o anti-IgG.3. Células Panel para detección de anticuerpos irregulares 2-4%: sets comerciales de 2 o 3 frascos. Estas células deben tener certificación de fabricación ISO 13485 o estar aprobadas por organismos (FDA, CE), sobre su capacidad de detectar anticuerpos clínicamente significativos, debiendo expresar al menos los siguientes antígenos: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb y Dia. El laboratorio debiese disponer de reactivos con expresiones homocigotas para los antígenos D, C, E, S, s, Fya, Fyb, Jka y Jkb.4. En los sets de dos células, uno de los frascos debe ser R1/R1 y el otro R2/R2, en los sets de tres células, el tercero debe ser r/r.5. Glóbulos rojos sensibilizados con IgG.



	Procedimiento
	Acción
1	Colocar 2 gotas de Suero o plasma en tubos rotulados (I y II)
2	Agregar 1 gota de Células O reactivo comerciales (2-4%) a cada tubo y mezclar
3	Centrifugar y observar en busca de hemólisis y aglutinación. Graduar y registrar los resultados
4	Incubar a 37° C durante 30 a 60 minutos
5	Centrifugar y observar en busca de hemólisis y aglutinación. Graduar y registrar los resultados
6	Lavar los glóbulos rojos 3-4 veces con solución salina o PBS y eliminar completamente el lavado final
7	Agregar el reactivo AGH al botón seco de glóbulos rojos, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Mezclar bien
8	Centrifugar y observar en busca de hemólisis y aglutinación. Graduar y registrar sus resultados.
9	Confirmar la validez de los resultados negativos con la adición de células control recubiertas con IgG.



Interpretación

1. La presencia de aglutinación /hemólisis después de la incubación a 37° C se considera un resultado positivo.
2. La presencia de aglutinación después de la adición de AGH (en las pruebas negativas) constituye una prueba positiva.
3. Los resultados de las pruebas antiglobulina son negativos cuando no se observa aglutinación después de la centrifugación inicial seguida de aglutinación después de la adición de células control recubiertas con IgG y centrifugación. Si no hay aglutinación, se invalidan los resultados negativos y la prueba debe repetirse.

Controles

1. El procedimiento usado para la detección de anticuerpos inesperados, debieran chequearse diariamente con muestras que contengan anticuerpos débiles.
2. Los sueros control pueden ser preparados a partir de antisueros diluidos con albúmina bovina al 6% que den una aglutinación de 2+ en PAI. También pueden usarse anticuerpos IgG de muestras humanas (suero/plasma con Anti-D (0,05 UI/ml) o Anti-Fya como control positivo y suero/plasma Inerte AB como control negativo)

Notas

1. El paso 3 puede omitirse para evitar la detección de anticuerpos reactivos a temperatura ambiente.
2. Desde los pasos 6 al 9 no debe haber interrupciones.

matrix™ ERYGEN AS Antigram.
GEL SYSTEM

ANTIGEN CHART

Cell No.	Rh Phenotype	Rheseus						Kell		Duffy		Kidd		Lewis		MNS				P	Test Results		
		D	C	E	c	e	C ^w	K	k	Fy ^r	Fy ^s	JK ^r	JK ^s	Le ^r	Le ^s	M	N	S	s	P ₁	AHG	ENZ	SAL/4°C
I	R.R. ₁	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+		
II	R.R. ₂	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0			
III	*	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	NT	+	+			
Patient																							

+ = Positive
0 = Negative
NT = Not tested
W = Weak
S = Strong

Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment.

Cat. No.	102700032
LOT	823310
Expiry Date	

B) DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES TÉCNICA EN TUBO CON ADICIÓN DE LISS O ALBÚMINA

Principio

El método con albúmina reduce las fuerzas repulsivas entre las células y, por lo tanto, promueve la aglutinación. El uso de LISS acelera la unión del anticuerpo al glóbulo rojo. La solución LISS (Solución salina de baja fuerza iónica), tiene una fuerza iónica menor en comparación con la solución salina normal, y acelera la unión de los anticuerpos a los eritrocitos.

Muestra	Suero o plasma
Reactivos	<ol style="list-style-type: none">1. Albúmina bovina 22%2. LISS3. Reactivo antiglobulina human (AGH) poliespecífico o IgG4. Células comerciales para detección de anticuerpos 2% a 5%5. Glóbulos rojos recubiertos con IgG

	Procedimiento
	Acción
1	Agregar 2 gotas de suero o plasma a los tubos previamente rotulados.
2	Agregar un volumen equivalente de albúmina bovina 22% o LISS (a no ser que el fabricante indique otra cosa).
3	Agregar 1 gota de glóbulos rojos 2% a 5% a cada tubo y mezclar
4	Para la albúmina incubar a 37°C durante 30 a 60 minutos. Para LISS, incubar de 10 a 15 minutos, según las instrucciones del fabricante.
5	Centrifugar y observar hemólisis o aglutinación. Graduar y registrar los resultados.
6	Lavar los glóbulos rojos 3 a 4 veces con salina, y eliminar por completo el sobrenadante final.
7	Agregar AGH al botón globular seco de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mezclar bien
8	Centrifugar y observar en busca de aglutinación. Graduar la intensidad de la reacción y registrar los resultados
9	Confirmar la validez de los resultados negativos añadiendo glóbulos rojos recubiertos con IgG.

Interpretación

1. La presencia de aglutinación/hemólisis después de la incubación a 37 °C se considera un resultado positivo.
2. La presencia de aglutinación después de la adición de AHG se considera un resultado positivo.
3. Los resultados de la prueba de anticuerpos son negativos cuando no se observa aglutinación después de la centrifugación inicial seguida de aglutinación luego de la adición de glóbulos rojos cubiertos con IgG y centrifugación. Si los glóbulos rojos cubiertos con IgG no aglutinan, el resultado negativo se invalida y la prueba debe repetirse.

- | | |
|------------------|---|
| Controles | <ol style="list-style-type: none">1. El procedimiento usado para la detección de anticuerpos inesperados en las pruebas pretransfusionales debiera chequearse diariamente con muestras débiles de anticuerpos.2. Los sueros control pueden ser preparados a partir de antisueros diluidos con albúmina bovina al 6% que den una aglutinación de 2+ en PAI. También pueden usarse anticuerpos IgG de muestras humanas (suero/plasma con Anti-D (0,05 UI/ml) o Anti-Fya como control positivo y suero/plasma Inerte AB como control negativo). |
| Notas | <ol style="list-style-type: none">1. El tiempo de incubación, el volumen y concentración de los glóbulos rojos, son aquellos que indica la literatura. Los laboratorios pueden estandarizar sus técnicas.
Cualquiera sea el caso, debieran consultarse las instrucciones del fabricante contenidas en el inserto antes de modificar algún procedimiento.2. Desde el paso 6 al 9 no debe haber interrupciones. |

C) DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES TÉCNICA EN TUBO CON SUSPENSIÓN DE LISS

Principio

El uso de LISS acelera la unión del anticuerpo al glóbulo rojo. La solución LISS (Solución salina de baja fuerza iónica), tiene una fuerza iónica menor en comparación con la solución salina normal, y acelera la unión de los anticuerpos a los eritrocitos.

Muestra Suero o plasma

Reactivos

1. LISS
2. Reactivo antiglobulina human (AGH) poliespecífico o IgG
3. Células comerciales para detección de anticuerpos 2% a 5%
4. Glóbulos rojos recubiertos con IgG

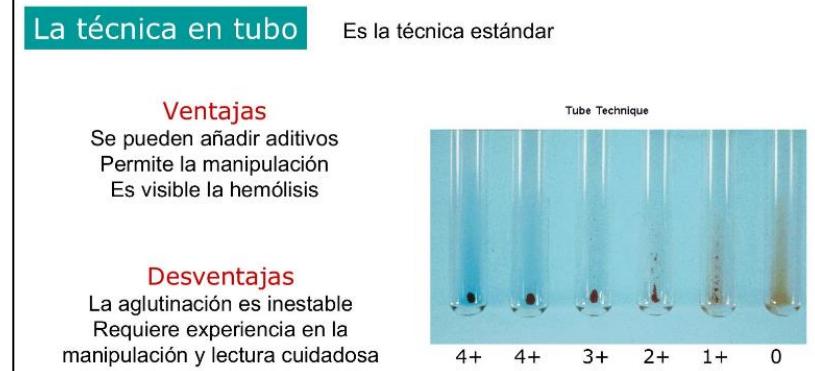
	Procedimiento
	Acción
1	Lavar el reactivo celular 3-4 veces en solución salina, y eliminar completamente el sobrenadante final.
2	Resuspender los glóbulos rojos 2% a 3% en solución LISS.
3	Agregar 2 gotas de suero a tubos previamente rotulados.
4	Añadir 2 gotas de glóbulos rojos suspendidos en LISS, mezclar e incubar a 37° C durante a 10 a 15 minutos (ver las instrucciones del fabricante).
5	Centrifugar y observar hemólisis y aglutinación resuspendiendo suavemente el botón eritrocitario. Graduar la intensidad de la reacción y registrar los resultados.
6	Lavar los glóbulos rojos 3 a 4 veces con salina, y eliminar completamente el sobrenadante final.
7	Agregar AGH a los glóbulos rojos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mezclar bien
8	Centrifugar y observar en busca de aglutinación. Graduar y registrar los resultados
9	Confirmar la validez de los resultados negativos añadiendo glóbulos rojos cubiertos con IgG.

- Interpretación**
1. La presencia de aglutinación/hemólisis después de la incubación a 37° C se considera un resultado positivo.
 2. La presencia de aglutinación después de la adición de AHG se considera un resultado positivo.
 3. Los resultados de la prueba de antiglobulina son negativos cuando no se observa aglutinación después de la centrifugación inicial seguida de aglutinación luego de la adición de glóbulos rojos cubiertos con IgG y centrifugación. Si los glóbulos rojos cubiertos con IgG no aglutinan, el resultado negativo se invalida y la prueba debe repetirse.

- Controles**
- Control**
1. El procedimiento usado para la detección de anticuerpos inesperados en las pruebas pretransfusionales debiera chequearse diariamente con muestras débiles de anticuerpos.
 2. Los sueros control pueden ser preparados a partir de antisueros diluidos con albúmina bovina al 6% q aglutinación de 2+ en PAI. También pueden usarse anticuerpos IgG de muestras humanas (suero/plasma (0,05 UI/ml) o Anti-Fya como control positivo y suero/plasma Inerte AB como control negativo)

Notas

1. El tiempo de incubación, el volumen y concentración de los glóbulos rojos, son aquellos que indica la literatura. Los laboratorios pueden estandarizar sus técnicas.
Cualquiera sea el caso, debieran consultarse las instrucciones del fabricante contenidas en el inserto antes de modificar algún procedimiento.
2. Desde el paso 6 al 9 no debe haber interrupciones



D) PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA INDIRECTA EN COLUMNAS (GEL)

(DG Gel Coombs) Grifols

Principio

Las tarjetas DG Gel constan de ocho microtubos. Cada microtubo se compone de una cámara de incubación, en la parte superior de un microtubo largo y estrecho, conocido como columna. Los microtubos de la tarjeta de plástico han sido predosificados con una solución de gel tamponada con una mezcla de antiglobulina humana policlonal (anti-IgG) con anticuerpos monoclonales anti-C3d. En los microtubos AHG, la aglutinación se produce cuando los hematíes sensibilizados in vivo o in vitro por IgG humana o fracción del complemento reaccionan con los anticuerpos presentes en la solución de gel.

La columna de gel actúa como un filtro que atrapa los hematíes aglutinados conforme atraviesan la columna de gel durante la centrifugación de la tarjeta. La columna de gel separa los hematíes aglutinados de los hematíes no aglutinados en base a su tamaño. Los hematíes aglutinados quedan atrapados en la parte superior o a lo largo de la columna de gel, mientras que los hematíes no aglutinados descienden hasta el fondo del microtubo y forman un sedimento.

- Muestra**
- Deben utilizarse las muestras de sangre recogidas en EDTA o citrato de sodio. El procedimiento de recogida, separación y manipulación de la sangre debe realizarse por personal técnico cualificado.
 - No utilizar muestras fuertemente hemolizadas, turbias o contaminadas.
 - Las muestras deberán analizarse lo antes posible.
 - Para el escrutinio y/o la identificación de anticuerpos irregulares, pruebas cruzadas y autocontrol, utilizar suero o plasma.
 - Las muestras congeladas que llevan hasta 5 años almacenadas a una temperatura de -20 °C o inferior pueden utilizarse después de la descongelación.
 - Si la paciente ha estado embarazada o ha recibido una transfusión en los tres meses anteriores, las muestras almacenadas a 2 - 8 °C se deben utilizar dentro de las 72 horas posteriores a la recogida.

- Reactivos**
1. Tarjetas DG Gel Coombs
 2. Células Panel para detección de anticuerpos irregulares: sets comerciales de 2 o 3 frascos (0,8-1%). Estas células deben tener certificación de fabricación ISO 13485 o estar aprobadas por organismos (FDA, CE), sobre su capacidad de detectar anticuerpos clínicamente significativos, debiendo expresar al menos los siguientes antígenos: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb y Dia. El laboratorio debiese disponer de reactivos con expresiones homocigotas para los antígenos D, C, E, S, s, Fya, Fyb, Jka y Jkb.
 3. En los sets de dos células, uno de los frascos debe ser R1/R1 y el otro R2/R2, en los sets de tres células, el tercero debe ser r/r

Procedimiento	
Paso	Acción
1	Dejar que las tarjetas DG Gel Coombs, los reactivos adicionales y las muestras alcancen la temperatura ambiente (18 - 25 °C).
2	Identificar las tarjetas a utilizar y las muestras a analizar
3	Retirar el precinto de toda la tarjeta DG Gel o de los microtubos individuales a utilizar. Nota: Utilizar los microtubos inmediatamente después de abrir el precinto.
4	Mezclar bien los viales de hematíes reactivo para el escrutinio y/o la identificación de anticuerpos irregulares con el fin de asegurar la suspensión homogénea de los hematíes antes de su uso.
5	Dispensar 50 µL de los Hematíes Reactivo en los microtubos.
6	Añadir 25 µL de suero o plasma en los mismos microtubos
7	Incubar 15 minutos a 37 °C en el incubador Grifols
8	Centrifugar la tarjeta de gel en la centrífuga Grifols
9	Tras la centrifugación, retirar la tarjeta de gel de la centrífuga y leer los resultados. También se puede utilizar el lector Grifols para la lectura e interpretación de los resultados.

Lectura de los resultados

La lectura se realiza en una etapa, permitiendo detectar principalmente los anticuerpos clínicamente significativos, pero no estableciendo la clase de inmunoglobulina y la temperatura óptima a la cual son activas. También es posible detectar anticuerpos de clase IgM que presentan amplio rango térmico (<https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2023/02/RECOMENDACIONES-PARA-LA-DETECCION-E-IDENTIFICACION-DE-ANTICUERPOS-IRREGULARES.pdf>)

Grados de reacción

Negativo:	0	Sedimento bien definido de hematíes no aglutinados en el fondo de la columna de gel y ausencia de células aglutinadas visibles en el resto de la columna de gel
Positivo:	+-	Pequeñas acumulaciones, apenas visibles, de células aglutinadas en la parte inferior de la columna de gel y un sedimento de células sin aglutinar en el fondo
	1+	Pequeñas acumulaciones de células aglutinadas, principalmente, en la mitad inferior de la columna de gel. También podría observarse un pequeño sedimento en el fondo de la columna de gel
	2+	Acumulaciones de tamaño mediano o pequeño de células aglutinadas a lo largo de la columna de gel. También podrían observarse algunas células no aglutinadas al fondo de la columna de gel
	3+	Acumulaciones de tamaño mediano de células aglutinadas en la mitad superior de la columna de gel
	4+	Una banda bien definida de hematíes aglutinados en la parte superior de la columna de gel. También podrían observarse algunas células aglutinadas por debajo de la banda
Doble Población	DP	Banda de hematíes en la parte superior del gel o dispersos a lo largo de la columna de gel, y un sedimento al fondo como resultado negativo
Hemólisis	H	Hemólisis en el microtubo con muy pocos o ningún hematíe en la columna de gel. Informar en caso de presencia de hemólisis en el microtubo pero no en la muestra

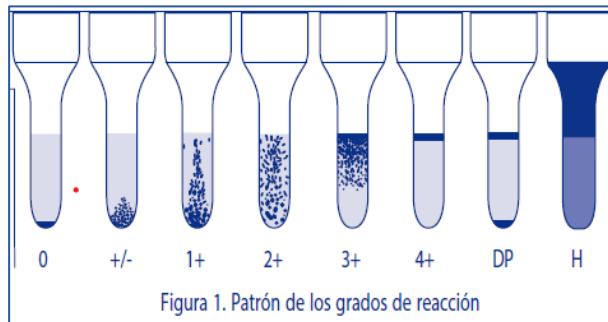
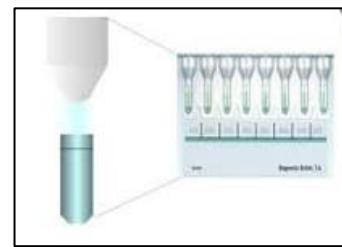


Figura 1. Patrón de los grados de reacción

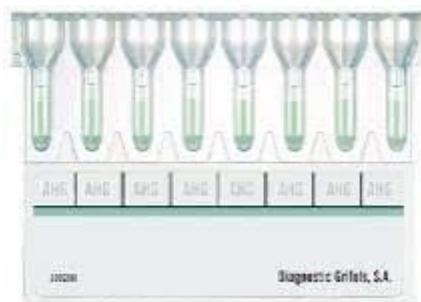


Interpretación Ejemplos de reacciones observadas en la detección de anticuerpos irregulares.

Reacción panel I	Reacción panel II	Reacción panel III	Resultado de detección de anticuerpos	Interpretación
+	0	0	Positivo	Aloanticuerpo
0	+	0	Positivo	Aloanticuerpo
+	+	0	Positivo	Aloanticuerpo
0	0	0	Negativo	Ausencia de Aloanticuerpo
+	+	+	Positivo	Aloanticuerpo y/o autoanticuerpo

0 = No hay reacción de aglutinación

+ = Aglutinación de cualquier intensidad (4+, 3+, 2+, 1+)



Estabilidad de los resultados

Se recomienda leer los resultados inmediatamente después de centrifugar las tarjetas. No dejar las tarjetas procesadas en posición horizontal. Si fuera necesario, puede realizarse una lectura retardada hasta 24 horas después de procesar las tarjetas, si se conservan en posición vertical, refrigeradas (2 - 8 °C) y selladas con parafilm o un material similar, para evitar la evaporación del sobrenadante.

Nota: En la lectura retardada de 24 horas de tarjetas procesadas con muestras positivas débiles puede observarse una perdida en la intensidad de la aglutinación.

Interpretación de los resultados

Técnicas de Antiglobulina Directa e Indirecta. La interpretación está determinada por el resultado obtenido en el microtubo. La interpretación de los resultados depende de la muestra y de los reactivos añadidos al microtubo.

Notas:

1. Se recomienda revisar/investigar los resultados discrepantes que se obtengan.
2. La observación de hemólisis parcial o completa (columna de gel o sobrenadante rosado) en los microtubos debe interpretarse como un resultado positivo, tras verificar que no se debe a un problema en la recogida o manipulación de la muestra.
3. Ocasionalmente, puede existir una retención de hematíes en la cámara de incubación con muestras positivas 4+, sin que ello interfiera en la lectura de los resultados.

Limitaciones del procedimiento

1. Las muestras fuertemente hemolizadas, turbias o contaminadas o las muestras con presencia de un coágulo podrían dar resultados falsos positivos o falsos negativos.
2. Las muestras envejecidas o hemolizadas pueden dar lugar a reacciones más débiles que aquellas que se obtienen de una muestra fresca.
3. Las muestras con anticuerpos de elevada potencia pueden recubrir los hematíes completamente, lo que provoca una aglutinación Espontánea.
4. Las concentraciones anormales de proteínas séricas, la presencia de soluciones macromoleculares en el suero/plasma o la presencia de gelatina de Wharton en muestras de sangre de cordón podrían causar una aglutinación inespecífica de los hematíes. Se recomienda lavar los hematíes antes de efectuar la técnica.
5. La actividad de los anticuerpos puede disminuir en ancianos, niños o personas enfermas.
6. En caso de utilizar plasma, podrían no detectarse reacciones hemolíticas dependientes del complemento.
7. Si se utiliza plasma poco anticoagulado o suero parcialmente coagulado, los restos de fibrina pueden retener hematíes no aglutinados, apareciendo una capa rosada o rojiza en la parte superior del gel. Aunque los resultados podrían interpretarse correctamente, en una reacción negativa, la falsa aparición de una Doble población podría conducir a una mala interpretación. En el caso de muestras de suero parcialmente coagulado, se recomienda volver a coagular el suero y repetir la prueba.
8. Escrutinio e identificación de anticuerpos irregulares/pruebas cruzadas: la técnica es aceptable si se incrementan los volúmenes de suero o plasma de 25 µL a 50 µL. Esta variación en la concentración de anticuerpos hace descender el ratio antígeno/anticuerpo y puede favorecer

la detección de anticuerpos de muy baja concentración.

9. Ningún método es capaz de detectar todos los anticuerpos irregulares. Las condiciones de reacción óptimas (por ejemplo, el volumen de la muestra y los tiempos de incubación) pueden variar para diferentes especificidades de anticuerpos.

10. La detección de anticuerpos fríos debe realizarse mediante la incubación de tarjetas a 2 - 8 °C. Durante la centrifugación, la temperatura aumentará y puede provocar una reacción de aglutinación en frío debilitada.

11. Anticuerpos poco frecuentes, en particular algunos anti-Jka o anti-Jkb, solo pueden detectarse si se utiliza AHG polivalente y cuando el complemento activo está presente

PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA DIRECTA (PAD)

Principio

La prueba de antiglobulina directa (PAD) es una prueba simple utilizada para determinar si los glóbulos rojos han sido recubiertos *in vivo* con inmunoglobulina, complemento o ambos. Una PAD positiva puede o no estar asociada con hemólisis de origen inmune. Existen muchas causas de PAD positiva. La PAD se utiliza para la investigación de las reacciones hemolíticas postransfusionales, la enfermedad hemolítica fetoneonatal (EHN), la anemia hemolítica autoinmune (AHA) y la hemólisis inducida por drogas.

La PAD debe ser realizada en cada paciente en quien se haya diagnosticado la presencia de hemólisis para distinguir la anemia de origen inmune de la no inmune.

El valor predictivo de la PAD es de un 83% en un paciente con anemia hemolítica, pero sólo de un 1,4 % en aquellos sin anemia hemolítica. Pequeñas cantidades de IgG y complemento parecen estar presentes en todos los glóbulos rojos.

Los individuos sanos pueden tener de 5 a 90 moléculas de IgG por glóbulo rojo y de 5 a 40 moléculas de C3d por glóbulo rojo; estos niveles están por debajo del umbral de la detección en las pruebas de rutina. Dependiendo de la técnica y los reactivos utilizados, la PAD puede detectar de 100 a 500 moléculas de IgG por glóbulo rojo y de 400 a 1100 moléculas de C3d por eritrocito. Existen publicaciones sobre la incidencia de PAD positivas entre 1:1000 y 1:14.000 donantes de sangre y entre un 1 % y un 15% de los pacientes hospitalizados. Estas grandes diferencias en la incidencia probablemente se encuentren relacionadas con diferentes técnicas (por ejemplo, tubo o microplaca) utilizadas.

La mayoría de los donantes con PAD positiva parecen estar perfectamente sanos y la mayoría de los pacientes con PAD positiva parecen no presentar signos obvios de anemia hemolítica, aunque luego de una evaluación cuidadosa, algunos pueden presentar un incremento de la destrucción de glóbulos rojos.

Inicialmente la prueba de antiglobulina se utilizó para demostrar anticuerpos en el suero, pero se aplicó luego para demostrar la presencia de anticuerpos o componentes del complemento adheridos *in vivo* a la membrana de los glóbulos rojos.

Los dos sitios Fab en la molécula de antiglobulina se unen a la porción Fc del anticuerpo sensibilizan te (o al componente del complemento), disminuyendo así el espacio entre los glóbulos rojos para producir una aglutinación visible. La intensidad de la aglutinación observada habitualmente es proporcional a la cantidad de la proteína fijada.

La PAD se realiza enfrentando glóbulos rojos lavados con reactivos de antiglobulina que contienen anti-IgG y anti-C3d. Los hematíes necesitan ser lavados para remover las globulinas y el complemento que se encuentran presentes en el plasma circundante; de lo contrario se puede neutralizar el reactivo antiglobulina, resultando en una prueba falsa-negativa. Los hematíes deben ser estudiados inmediatamente después del lavado para prevenir resultados falsos negativos debido a la potencial elución de las IgG. Aunque todo glóbulo rojo puede ser sometido a esta prueba, se prefieren las muestras de sangre anticoagulada con EDTA; que previene la fijación *in vitro* del complemento al quelar el calcio que se necesita para la activación de Cl. Si los hematíes de una muestra de sangre coagulada tienen una PAD positiva debido al complemento, se deben confirmar los resultados en las células provenientes de sangre fresca conservada a 37 °C o una muestra con EDTA, si esos resultados se utilizan para fines diagnósticos.

La PAD se puede realizar inicialmente con un suero de antiglobulina humana (SAG) poliespecífico capaz de detectar la IgG y el C3d. Si el resultado fuese positivo, las pruebas con reactivos monoespecíficos (anti-IgG y anti-complemento) necesitan ser realizadas para caracterizar el proceso inmune involucrado apropiadamente y determinar el diagnóstico. Como los reactivos poliespecíficos habitualmente detectan una mezcla de proteínas y las condiciones de la prueba pueden modificarse para detectar de manera óptima las fracciones de IgG y C3d en los glóbulos rojos,

algunos laboratorios prefieren realizar la PAD desde el inicio con los reactivos anti-IgG y anti-C3d específicos por separado. Si el reactivo poliespecífico es policlonal, se pueden detectar proteínas diferentes a las IgG o al C3d (por ejemplo, IgM, IgA u otro componente del complemento); sin embargo, no es frecuente encontrar disponibles reactivos específicos para distinguir a estas otras proteínas mediante técnicas serológicas.

Si las pruebas se realizan en muestras de sangre del cordón umbilical, es apropiado utilizar sólo anti-IgG porque en la EHFN se produce la sensibilización de eritrocitos fetales por IgG maternos y raramente está activado el complemento.

Es importante seguir las instrucciones del fabricante del reactivo y reconocer todas las limitaciones del método. Se pueden obtener falsos negativos o resultados más débiles si se dejan sedimentar los glóbulos rojos antes de dispensar el suero anti-IgG o si se retrasa la lectura.

Algunos reactivos anti-complemento, por el contrario, demuestran una reactividad más fuerte si la centrifugación se retrasa durante un corto tiempo luego de que el reactivo ha sido dispensado.

Cuando la PAD es positiva con ambos, anti-IgG y anti-C3d, se deben estudiar los hematíes con un reactivo de control inerte (por ejemplo, albúmina al 6% o solución salina) La falta de aglutinación en el autocontrol valida la prueba.

Si el control es reactivo, el resultado de la PAD es inválido. Un autocontrol positivo puede indicar aglutinación espontánea causada por gran cantidad de aglutininas IgG calientes o crioaglutininas IgM que no se despegan durante el lavado de rutina.

Algunas causas de la PAD positiva:

- Anticuerpos contra antígenos intrínsecos de glóbulos rojos
- Reacciones hemolíticas postransfusionales
- Enfermedad hemolítica fetoneonatal
- Anticuerpos inducidos por drogas
- Aloanticuerpos adquiridos pasivamente (por ejemplo donante de plasma, hemoderivados, inmunoglobulina)
- Proteínas absorbidas no específicamente (por ejemplo, hipergammaglobulinemia, dosis alta gammaglobulina endovenosa, modificación de la membrana del glóbulo rojo por medicamentos)
- Activación de complemento debido a infección bacteriana, autoanticuerpos, o aloanticuerpos
- Anticuerpos producidos por linfocitos pasajeros (por ejemplo, en órganos trasplantados o componentes hematopoyéticos)

A) PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA DIRECTA TÉCNICA EN TUBO

Muestra	Glóbulos rojos obtenidos a partir de muestras con EDTA, aunque también se pueden utilizar muestras de sangre ve tomadas con citrato, heparina o a partir de bolsas de sangre con soluciones anticoagulantes-conservadoras o sangre de coagulante. También es posible utilizar muestras de sangre recogidas en tubos sin anticoagulante. Las muestras para estudio deben ser procesadas inmediatamente o ser almacenadas a 4°C y las pruebas deben ser realizadas en el menor tiempo posible, no excediendo las 72 horas desde su obtención.
Reactivos	<ol style="list-style-type: none">1. Reactivo antiglobulina Humana (AGH): antiglobulina poliespecífica, anti-IgG,y sueros anti- complemento.2. Control de reactivo (por ejemplo: solución salina o albúmina 6%) cuando los resultados son positivos con todos los sueros AGH.3. Glóbulos rojos recubiertos con IgG.4. Glóbulos rojos recubiertos con complemento, si es que lo indica el fabricante.

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Lavar una gota de glóbulos rojos tomados de una suspensión (2-5%) en cada tubo para cada reactivo de AGH a utilizar o control a estudiar.
2	Lavar cada tubo 3-4 veces con solución salina. Eliminar por completo el sobrenadante final.
3	Añadir inmediatamente el reactivo AGH y mezclar. Para la cantidad de antisuero requerida revisar las instrucciones del fabricante.
4	Centrifugar de acuerdo con el programa de la centrifuga. Para la investigación con suero anticomplemento, el fabricante puede indicar esperar antes de centrifugar.
5	Examinar las células en busca de aglutinación. Graduar la intensidad de la reacción y registrar los resultados.
6	Si se usó AGH poliespecífico o anticomplemento, incubar las pruebas negativas a temperatura ambiente si así lo indica el fabricante; luego centrifugar y leer nuevamente.
7	Confirmar la validez de los resultados negativos añadiendo glóbulos rojos recubiertos con IgG a las pruebas que contengan anti -IgG.
8	Centrifugar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
9	Observar las células para detectar aglutinación y registrar los resultados.

- Interpretación**
1. La PAD es positiva cuando se observa aglutinación después de la centrifugación inmediata o posterior a la incubación a temperatura ambiente.
 2. Los glóbulos rojos recubiertos por IgG suelen revelar reacciones inmediatas, mientras que los recubiertos con complemento pueden demostrarse con más facilidad después de la incubación.
 3. Para confirmar qué globulinas están involucradas se requieren reactivos AGH monoespecíficos.
 4. La PAD negativa no siempre significa que los glóbulos rojos no tienen inmunoglobulinas fijadas. Los reactivos poliespecíficos y anti.IgG pueden detectarse 150 y 500 moléculas de IgG por célula, pero los pacientes podrían presentar anemia hemolítica autoinmune con valores de IgG más bajos.

Notas

1. Los pasos 2 a 5 deben efectuarse sin interrupciones.
2. Las pruebas iniciales se pueden realizar solamente con un reactivo poliespecífico. Si la PAD es negativa con el reactivo poliespecífico, no es necesario seguir la evaluación. Si la PAD es positiva con el reactivo poliespecífico, se debe repetir con reactivos monoespecíficos, antiIgG y anti-complemento, para determinar que globulinas están presentes.
3. Pueden ser necesarios lavados adicionales cuando las pruebas se realizan con muestras de cordón umbilical contaminadas con gelatina de Wharton

Controles

Tubo	Suero o plasma	Glóbulos rojos	Objetivo
PAD	SAGH	Muestra en concentración adecuada	Determinación de IgG o complemento unidos a la membrana de glóbulos rojos
Control Positivo	SAGH	Glóbulos rojos sensibilizados con IgG o complemento	Detectar falsos negativos
Control Negativo	SAGH	Glóbulos rojos no sensibilizados	Detectar falsos positivos

B) PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA DIRECTA EN COLUMNA (GEL)

(DG Gel /Coombs) Grifols)

Las tarjetas DG Gel constan de ocho microtubos. Cada microtubo se compone de una cámara, también conocida como cámara de incubación, en la parte superior de un microtubo largo y estrecho, conocido como columna. Los microtubos de la tarjeta de plástico han sido predosificados con una solución de gel tamponada o una solución de gel tamponada con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-IgG y anti-C3d. En los microtubos AHG, la aglutinación se produce cuando los hematíes sensibilizados in vivo o in vitro por IgG humana o fracción del complemento reaccionan con los anticuerpos presentes en la solución de gel.

La columna de gel actúa como un filtro que atrapa los hematíes aglutinados conforme atraviesan la columna de gel durante la centrifugación de la tarjeta.

La columna de gel separa los hematíes aglutinados de los hematíes no aglutinados en base a su tamaño. Los hematíes aglutinados quedan atrapados en la parte superior o a lo largo de la columna de gel, mientras que los hematíes no aglutinados descienden hasta el fondo del microtubo y forman un sedimento.

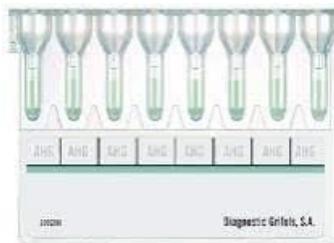
Muestra Deben utilizarse las muestras de sangre recogidas en EDTA o citrato de sodio
No utilizar muestras fuertemente hemolizadas, turbias o contaminadas.
Las muestras deberán analizarse lo antes posible.

Para la Técnica de Antiglobulina Directa, utilizar hematíes. Se recomienda que el almacenamiento no supere las 48 horas.

Reactivos

1. Tarjetas DG Gel Coombs
2. Solución diluyente DG Gel sol

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Dejar que las tarjetas DG Gel Coombs, los reactivos adicionales y las muestras alcancen la temperatura ambiente (18 - 25 °C)
2	Identificar las tarjetas a utilizar y las muestras a analizar
3	Preparar una suspensión de hematíes al 1% en DG Gel Sol (10 µL de concentrado de hematíes en 1 mL de DG Gel Sol)
4	Retirar el precinto de toda la tarjeta DG Gel o de los microtubos individuales a utilizar. Nota: Utilizar los microtubos inmediatamente después de abrir el precinto
5	Dispensar 50 µL de los Hematíes al 1% en cada uno de los microtubos correspondientes
6	Centrifugar la tarjeta de gel en la centrifuga Grifols
7	Incubar 15 minutos a 37 °C en el incubador Grifols
8	Centrifugar la tarjeta de gel en la centrífuga Grifols
9	Tras la centrifugación, retirar la tarjeta de gel de la centrífuga y leer los resultados. También se puede utilizar el lector Grifols para la lectura e interpretación de los resultados



Controles Se recomienda incluir diariamente controles positivos y negativos con los análisis. Si se obtiene un resultado de control inesperado, deberá realizarse una evaluación completa del instrumento, los reactivos y material utilizados.

Resultados negativos: No se observa aglutinación ni hemólisis de los hematíes en el microtubo. Cuando el resultado es negativo, los hematíes se encuentran en el fondo de la columna de gel.

Resultados positivos: Se observa aglutinación o hemólisis de los hematíes en el microtubo. Cuando el resultado es positivo, los hematíes aglutinados pueden localizarse a lo largo de la columna de gel y mostrar distintos grados de reacción, tal y como se describe a continuación. Algunas reacciones positivas también pueden formar un sedimento en el fondo del microtubo. Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos IgG en la muestra de suero o plasma o recubriendo los hematíes.

Grados de reacción		
Negativo:	0	Sedimento bien definido de hematíes no aglutinados en el fondo de la columna de gel y ausencia de células aglutinadas visibles en el resto de la columna de gel
Positivo:	+-	Pequeñas acumulaciones, apenas visibles, de células aglutinadas en la parte inferior de la columna de gel y un sedimento de células sin aglutinar en el fondo
	1+	Pequeñas acumulaciones de células aglutinadas, principalmente, en la mitad inferior de la columna de gel. También podría observarse un pequeño sedimento en el fondo de la columna de gel
	2+	Acumulaciones de tamaño mediano o pequeño de células aglutinadas a lo largo de la columna de gel. También podrían observarse algunas células no aglutinadas al fondo de la columna de gel
	3+	Acumulaciones de tamaño mediano de células aglutinadas en la mitad superior de la columna de gel
	4+	Una banda bien definida de hematíes aglutinados en la parte superior de la columna de gel. También podrían observarse algunas células aglutinadas por debajo de la banda
Doble Población	DP	Banda de hematíes en la parte superior del gel o dispersos a lo largo de la columna de gel, y un sedimento al fondo como resultado negativo
Hemólisis	H	Hemólisis en el microtubo con muy pocos o ningún hematíe en la columna de gel. Informar en caso de presencia de hemólisis en el microtubo pero no en la muestra

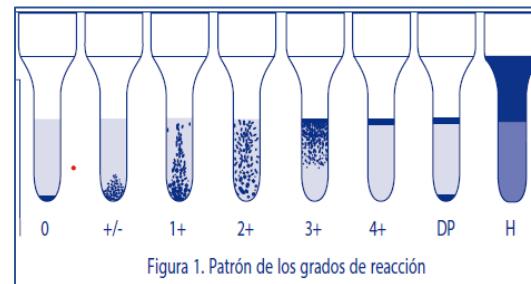


Figura 1. Patrón de los grados de reacción

Estabilidad de los resultados

Se recomienda leer los resultados inmediatamente después de centrifugar las tarjetas. No dejar las tarjetas procesadas en posición horizontal. Si fuera necesario, puede realizarse una lectura retardada hasta 24 horas después de procesar las tarjetas, si se conservan en posición vertical, refrigeradas (2 - 8 °C) y selladas con Parafilm o un material similar, para evitar la evaporación del sobrenadante.

Nota: En la lectura retardada de 24 horas de tarjetas procesadas con muestras positivas débiles puede observarse una perdida en la intensidad de la aglutinación.

Notas:

1. Se recomienda revisar/investigar los resultados discrepantes que se obtengan.
2. Una Técnica de Antiglobulina Directa con un resultado negativo no implica la ausencia de enfermedad hemolítica en el recién nacido, especialmente cuando se sospecha de incompatibilidad de ABO.
3. Los anticuerpos inducidos por fármacos pueden dar lugar a una técnica de Antiglobulina Directa positiva.
4. Ocasionalmente, puede existir una retención de hematíes en la cámara de incubación con muestras positivas 4+, sin que ello interfiera en la lectura de los resultados.

Limitaciones del procedimiento

1. Las muestras fuertemente hemolizadas, turbias o contaminadas o las muestras con presencia de un coágulo podrían dar resultados falsos positivos o falsos negativos.
2. Las muestras envejecidas o hemolizadas pueden dar lugar a reacciones más débiles que aquellas que se obtienen de una muestra fresca.
4. Las concentraciones anormales de proteínas séricas, la presencia de soluciones macromoleculares en el suero/plasma o la presencia de gelatina de Wharton en muestras de sangre de cordón podrían causar una aglutinación inespecífica de los hematíes.

Se recomienda lavar los hematíes antes de efectuar la técnica.

5. La presencia de algunos fármacos, soluciones de dextrano o restos de gel de silicona del tubo de extracción de la muestra puede inducir a un resultado positivo en la técnica de Antiglobulina Directa.

CLASIFICACIÓN ABO RHD EN RECIÉN NACIDOS

Principio

El sistema ABO fue el primer sistema de grupo sanguíneo humano descubierto por Landsteiner en 1900 y continúa siendo el más importante en la práctica transfusional. El sistema ABO se define por la presencia o ausencia de los antígenos A y/o B en los hematíes y por la presencia de anticuerpos en el plasma o suero, correspondientes al antígeno o antígenos ausentes en los hematíes.

La expresión de antígenos no está desarrollada completamente en recién nacidos y se pueden observar reacciones más débiles que en adultos. Los niveles adultos de expresión de antígenos ABO se presentan generalmente entre los 2 y los 4 años. Además, los anticuerpos correspondientes al antígeno o antígenos ausentes en los hematíes del recién nacido no aparecen en el suero hasta 4 - 6 meses después del nacimiento. **Por consiguiente, no se puede determinar el grupo ABO inverso en los recién nacidos.**

La determinación del Rh (D) se define por la presencia o ausencia del antígeno D (RH1) en los hematíes.

Los reactivos anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D se utilizan para realizar el tipaje de los grupos ABO y Rh, en conjunto con la técnica de Antiglobulina Directa, que determinara si los hematíes del recién nacido han resultado sensibilizados.

A) CLASIFICACIÓN ABO RHD EN RECIÉN NACIDOS TÉCNICA EN TUBO

Muestra Se pueden utilizar los hematíes procedentes de la sangre del cordón del recién nacido (debe evitarse la contaminación por la gelatina de Wharton)
No utilizar muestras fuertemente hemolizadas, turbias o contaminadas
Las muestras deberán analizarse lo antes posible. Si fuera necesario, se pueden utilizar las muestras almacenadas a 2-8°C 48 horas después de la extracción

Reactivos Sueros clasificadores: Anti-A, Anti-B, Anti-A, B (opcional), Anti-D
Suspensión 5% de glóbulos rojos lavados de la muestra con solución salina o PBS

	Procedimiento
Paso	Acción
PRUEBA DIRECTA y TAD	
1	De la muestra de cordón extraiga aprox. 1ml de sangre, evitando sacar coágulos y/o gelatina de Wharton
2	Lavar 6 veces con solución fisiológica o PBS, eliminando con fuerza el sobrenadante para que caigan las sustancias interferentes, continuar con los lavados si es necesario
3	Preparar una suspensión al 5% con solución salina o PBS
4	Colocar una gota de reactivo anti-A en un tubo limpio y rotulado
5	Colocar una gota de reactivo anti-B en un tubo limpio y rotulado.
6	Colocar una gota de reactivo anti-A, B en un tubo limpio y rotulado (opcional)
7	Colocar una gota de reactivo anti-D en un tubo limpio y rotulado
8	Colocar un quinto tubo Khan para realizar TAD
9	Con pipeta Pasteur a cada tubo agregar 1 gota de suspensión de glóbulos rojos lavados y suspendidos al 5%
10	Mezclar suavemente y centrifugar los 5 tubos Khan en programa de lectura
11	Elimine el exceso de PBS del tubo TAD con un movimiento fuerte, dejando el botón de glóbulos rojos secos, agregar 2 gotas del reactivo AGH, mezclar homogeneizando, centrifugar para lectura
12	Resuspender suavemente el botón celular y examinar en busca de aglutinación
13	Leer, interpretar y registrar los resultados
14	Agregar glóbulos rojos recubiertos con IgG (Células Control Coombs) a los tubos con lectura negativa, centrifugar y leer. Registrar los resultados

Los controles positivos y negativos deben ejecutarse en cada corrida analítica

Control Positivo: Glóbulos rojos sensibilizados con IgG o complemento, **Control Negativo:** Glóbulos rojos no sensibilizados

B) CLASIFICACIÓN ABO RHD EN RECIÉN NACIDOS TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL)

La tarjeta DG Gel Newborn se utiliza para determinar los antígenos del sistema ABO y Rh (D) y la técnica de Antiglobulina Directa en recién nacidos, en técnica de gel.

Principio

El principio del método se basa en la técnica en gel descrita por Yves Lapierre en 1985 para la detección de reacciones de aglutinación de hematíes. Las tarjetas DG Gel constan de ocho microtubos. Cada microtubo se compone de una cámara de incubación, en la parte superior de un microtubo largo y estrecho conocido como columna. Los microtubos de la tarjeta de plástico han sido predosificados con una solución de gel tamponada que contiene anticuerpos monoclonales específicos (anti-A, anti-B y anti-D), antiglobulina humana policlonal (anti-IgG) y una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-C3d.

La aglutinación se produce cuando los antígenos de los hematíes reaccionan con los correspondientes anticuerpos presentes en la solución de gel o cuando los hematíes sensibilizados in vivo o in vitro por anticuerpos humanos IgG o fracción del complemento reaccionan con la anticuerpos humana de los anticuerpos presente en la solución de gel. La columna de gel actúa como un filtro que atrapa los hematíes aglutinados conforme atraviesan la columna de gel durante la centrifugación de la tarjeta. La columna de gel separa los hematíes aglutinados de los hematíes no aglutinados basándose en el tamaño. Los hematíes aglutinados quedan atrapados en la parte superior o a lo largo de la columna de gel, mientras que los hematíes no aglutinados llegan al fondo del microtubo formando un sedimento.

Muestra Deben utilizarse muestras de sangre recogidas en EDTA, citrato sódico o heparina sódica.

Se pueden utilizar los hematíes procedentes de la sangre del cordón del recién nacido.

No utilizar muestras fuertemente hemolizadas, turbias o contaminadas.

Las muestras deberán analizarse lo antes posible. Si fuera necesario, se pueden utilizar las muestras almacenadas a 2 – 8°C hasta 48 horas después de la extracción.

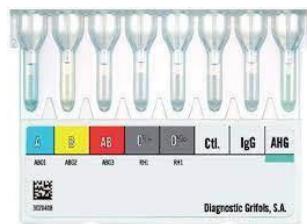
Nota: Si se utilizan hematíes del cordón, debe evitarse la contaminación por la gelatina de Wharton

Reactivos 1. Cada microtubo de la tarjeta DG Gel Newborn contiene gel en un medio tamponado con conservante.

Los distintos microtubos se identifican mediante la etiqueta frontal de la tarjeta

2. Diluyente DG Gel Sol

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Dejar que las tarjetas DG Gel Newborn, los reactivos adicionales y las muestras alcancen la temperatura ambiente (18 - 25 °C)
2	Identificar las tarjetas a utilizar y las muestras a analizar
3	Preparar una suspensión de hematíes al 1% en DG Gel Sol (10 µL de concentrado de hematíes en 1 mL de DG Gel Sol)
4	Despegar con precaución el precinto de aluminio para prevenir contaminaciones cruzadas del contenido de los microtubos. Nota: Utilizar los microtubos inmediatamente después de abrir el precinto
5	Asegurar la homogeneidad de la suspensión de los hematíes al 1% antes de utilizar.
6	Dispensar en cada uno de los microtubos correspondientes (A/B/AB/DVI/DVI+/Ctl./IgG/AHG) 50 µL de suspensión de hematíes al 1%. Nota: Dispensar con cuidado la suspensión de hematíes, evitando el contacto de la punta de la pipeta con las paredes o el contenido de los microtubos para evitar el arrastre
7	Centrifugar la tarjeta de gel en la centrifuga de Grifols
8	Tras la centrifugación, retirar la tarjeta de gel de la centrifuga y leer los resultados



Control de calidad

Se recomienda incluir diariamente controles positivos y negativos con los análisis. Si se obtiene un resultado de control inesperado, deberá realizarse una evaluación completa del instrumento, los reactivos y material utilizados.

Resultados

Grados de reacción

Negativo:	0	Sedimento bien definido de hematíes no aglutinados en el fondo de la columna de gel y ausencia células aglutinadas visibles en el resto de la columna de gel
Positivo:	+-	Pequeñas acumulaciones, apenas visibles, de células aglutinadas en la parte inferior de la columna de gel y un sedimento de células sin aglutinar en el fondo
	1+	Pequeñas acumulaciones de células aglutinadas principalmente en la mitad inferior de la columna de gel. También podría observarse un pequeño sedimento en el fondo de la columna de gel
	2+	Acumulaciones de tamaño mediano o pequeño de células aglutinadas a lo largo de la columna de gel. También podrían observarse algunas células no aglutinadas en el fondo de la columna de gel
	3+	Acumulaciones de tamaño mediano de células aglutinadas en la mitad superior de la columna de gel
	4+	Banda bien definida de hematíes aglutinados en la parte superior de la columna de gel. También podrían observarse algunas células aglutinadas por debajo de la banda
Doble Población	DP	Banda de hematíes en la parte superior del gel o dispersos a lo largo de la columna de gel, y un sedimento en el fondo como resultado negativo
Hemólisis	H	Hemólisis en el microtubo con muy pocos o ningún hematíe en la columna de gel. Informar en caso de presencia de hemólisis en el microtubo pero no en la muestra

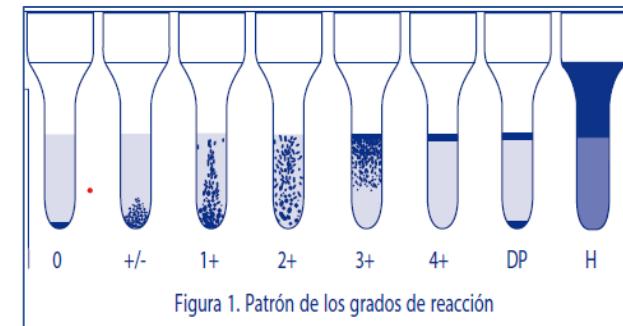


Figura 1. Patrón de los grados de reacción

Resultados negativos: No se observa aglutinación ni hemólisis de los hematíes en el microtubo. Cuando el resultado es negativo, los hematíes se encuentran en el fondo de la columna de gel.

Resultados positivos: Se observa aglutinación y/o hemólisis de los hematíes en el microtubo. Cuando el resultado es positivo, los hematíes aglutinados pueden localizarse a lo largo de toda la columna de gel y mostrar distintos grados de reacción. Algunas reacciones positivas también pueden formar un sedimento en el fondo del microtubo. Muestras con expresión normal de antígenos A, B y D dan lugar a grados de reacción fuertemente positivos. Reacciones más débiles pueden indicar una expresión débil o parcial de los antígenos A, B y D.

Estabilidad de los resultados

Se recomienda leer los resultados inmediatamente después de centrifugar las tarjetas. No dejar las tarjetas procesadas en posición horizontal. Si fuera necesario, puede realizarse una lectura retardada hasta 24 horas después de procesar las tarjetas, si se conservan en posición vertical, refrigeradas (2 – 8°C) y selladas con parafilm o un material similar, para evitar la evaporación del sobrenadante.

Interpretación de los resultados

Microtubo A	Microtubo B	Microtubo AB	Microtubo Ctl.	Interpretación
0	0	0	0	Grupo O
+	0	+	0	Grupo A
0	+	+	0	Grupo B
+	+	+	0	Grupo AB

Antígeno D. La reacción esperada con los microtubos D^{V-} y D^{V+/-} y su interpretación se muestran siguiente (+ = positivo y 0 = negativo).

Microtubo D ^{V-}	Microtubo D ^{V+/-}	Microtubo Ctl.	Interpretación
+	+	0	D positivo
0	0	0	D negativo
0	+	0	D débil o parcial
+	0	0	

Técnica de Antiglobulina Directa: Un resultado negativo indica ausencia de anticuerpos detectables en los hematíes del recién nacido. Un resultado positivo indica que los hematíes del recién nacido están sensibilizados (revestidos de anticuerpos intrauterinos). Los resultados en los microtubos IgG y AHG deben coincidir, ya sean positivos o negativos.

IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

- **TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL)**

Los aloanticuerpos dirigidos contra antígenos eritrocitarios pueden detectarse de manera temprana en pruebas que utilicen suero o plasma (Ej. Prueba inversa de grupo ABO, detección de anticuerpos irregulares, prueba de compatibilidad) o en un eluído preparado a partir de glóbulos rojos cubiertos con anticuerpos. Para la detección e identificación de anticuerpos es indistinto el uso de suero o plasma, a menos que se necesite la presencia del complemento. En dichos casos aislados, sólo se deberá utilizar suero, ya que éste aporta el complemento.

Luego de detectarse el anticuerpo, se debe determinar su especificidad y evaluar su importancia clínica. Se define como clínicamente significativo a aquel anticuerpo anti-eritrocitario que se asocia frecuentemente con la Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal (EHFN), reacción hemolítica post-transfusional, o con una disminución notable de la sobrevida de los glóbulos rojos transfundidos.

Principio

La identificación de un anticuerpo necesita el análisis del comportamiento del suero frente a un panel de muestras de glóbulos rojos seleccionados que posean una composición antigenica conocida para los grupos sanguíneos principales.

Usualmente estas muestras se obtienen de proveedores comerciales. Cada reactivo del panel pertenece a un donante diferente. Asimismo, se seleccionan de manera tal que, si se toman en cuenta todos los viales de glóbulos rojos, existirá un patrón característico de reacciones positivas y negativas para muchos antígenos.

Para ser eficaz, el panel celular debe posibilitar la correcta identificación de aquellos aloanticuerpos clínicamente significativos más comunes, tales como anti-D, -E, -K, y-Fya. Los fenotipos de los reactivos de glóbulos rojos deben distribuirse de manera tal que las especificidades individuales de los aloanticuerpos comunes puedan identificarse de manera clara y que muchos otros puedan ser excluidos.

Idealmente, los patrones de reactividad de varias especificidades de determinados aloanticuerpos no deberían superponerse con otros (Ej. Todas las muestras K+ no deberían ser las únicas con E+). Del mismo modo, es importante incluir glóbulos rojos con expresión homocigota de los antígenos más comunes, a fin de detectar los anticuerpos que frecuentemente muestran efecto dosis.

Características básicas del panel de identificación:

- a) Presentar especificidades para los siguientes antígenos: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka y Jkb.
- b) Poseer al menos dos células panel que presenten y dos células panel que carezcan de los antígenos señalados en el punto anterior.
- c) Disponer de células con doble dosis (homocigotas) especialmente de los antígenos Jka, Jkb, S, s, Fya, y Fyb, ya que estos antígenos se expresan más débilmente cuando los genes involucrados están en forma heterocigota.
- d) Poseer células rr (cde/cde) en el panel y que entre ellas expresen los antígenos K, Fya, Fyb, Jka, Jkb, M, S, s, de preferencia al estado homocigoto, de manera de poder evidenciar la presencia de ellos junto al anti-D, dada la frecuencia de este anticuerpo.
- e) Verificar que el inserto de especificación del reactivo y la tabla de trabajo que vienen con el panel, coincidan con el número de lote del reactivo. Este punto es muy importante al momento de querer interpretar los resultados.

f) Los paneles de identificación deben presentar para los anticuerpos simples por lo menos dos tipos de células positivas y tres negativas, o una positiva y siete negativas para permitir identificar con un valor de p de 0,05.

Reactivos

1. Células Panel para identificación de anticuerpos irregulares (0,8-1%): El panel básico de identificación generalmente presenta entre 8 a 11 frascos de células con diferentes especificidades antigenicas. Existen estos paneles de células en presentaciones de hasta 16 tipos de glóbulos rojos de distintos donantes. La elección del tipo de panel debe ser realizada en base a las características del laboratorio, el tipo de pacientes que atiende.
2. Tarjetas DG gel Coombs



Muestras

Deben utilizarse las muestras de sangre recogidas en EDTA o citrato de sodio.

No utilizar muestras fuertemente hemolizadas, turbias o contaminadas.

Las muestras deberán analizarse lo antes posible.

Para el escrutinio y/o la identificación de anticuerpos irregulares, pruebas cruzadas y autocontrol, utilizar suero o plasma.

Las muestras congeladas que llevan hasta 5 años almacenadas a una temperatura de -20 °C o inferior pueden utilizarse después de la descongelación.

Si la paciente ha estado embarazada o ha recibido una transfusión en los tres meses anteriores, las muestras almacenadas a 2 - 8 °C se deben utilizar dentro de las 72 horas posteriores a la recogida

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Dejar que las tarjetas DG Gel Coombs, los reactivos adicionales y las muestras alcancen la temperatura ambiente (18 - 25 °C).
2	Identificar las tarjetas a utilizar y las muestras a analizar
3	Retirar el precinto de toda la tarjeta DG Gel o de los microtubos individuales a utilizar. Nota: Utilizar los microtubos inmediatamente después de abrir el precinto.
4	Mezclar bien los viales de hematíes reactivo para la identificación de anticuerpos irregulares con el fin de asegurar la suspensión homogénea de los hematíes antes de su uso.
5	Dispensar 50 µL de los Hematíes Reactivo en cada microtubo (frasco 1 al micropocillo 1, frasco 2 al micropocillo 2 , etc.)
6	Añadir 25 µL de suero o plasma en los mismos microtubos
7	Incubar 15 minutos a 37 °C en el incubador Grifols
8	Centrifugar la tarjeta de gel en la centrífuga Grifols
9	Tras la centrifugación, retirar la tarjeta de gel de la centrífuga.
10	Registrar los resultados, graduando las aglutinaciones, según el patrón de positividad de las células utilizadas se puede identificar el anticuerpo irregular



Resultados

Grados de reacción

Negativo:	0	Sedimento bien definido de hematies no aglutinados en el fondo de la columna de gel y ausencia de células aglutinadas visibles en el resto de la columna de gel
Positivo:	+-	Pequeñas acumulaciones, apenas visibles, de células aglutinadas en la parte inferior de la columna de gel y un sedimento de células sin aglutinar en el fondo
	1+	Pequeñas acumulaciones de células aglutinadas, principalmente, en la mitad inferior de la columna de gel. También podría observarse un pequeño sedimento en el fondo de la columna de gel
	2+	Acumulaciones de tamaño mediano o pequeño de células aglutinadas a lo largo de la columna de gel. También podrían observarse algunas células no aglutinadas al fondo de la columna de gel
	3+	Acumulaciones de tamaño mediano de células aglutinadas en la mitad superior de la columna de gel
	4+	Una banda bien definida de hematies aglutinados en la parte superior de la columna de gel. También podrían observarse algunas células aglutinadas por debajo de la banda
Doble Población	DP	Banda de hematies en la parte superior del gel o dispersos a lo largo de la columna de gel, y un sedimento al fondo como resultado negativo
Hemólisis	H	Hemólisis en el microtubo con muy pocos o ningún hematie en la columna de gel. Informar en caso de presencia de hemólisis en el microtubo pero no en la muestra

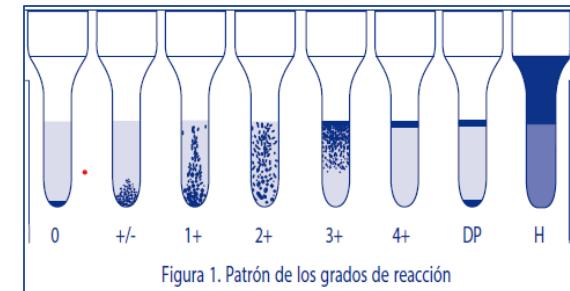
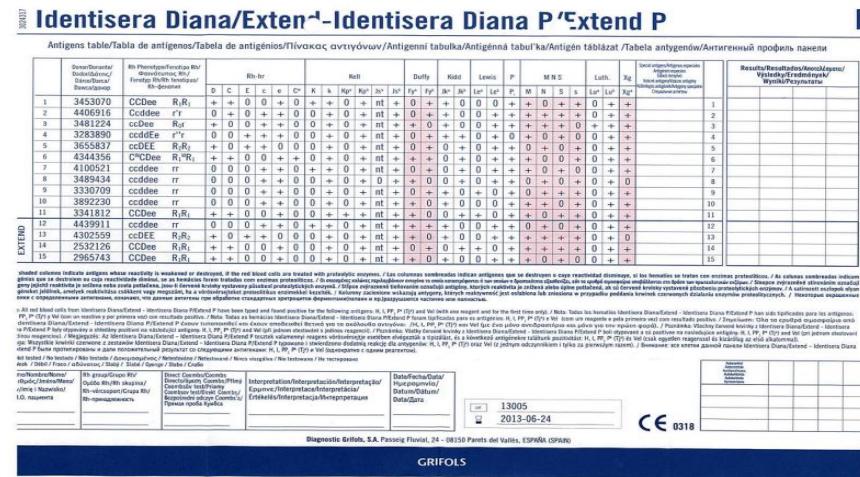


Figura 1. Patrón de los grados de reacción

En la técnica de aglutinación en columna la lectura se puede realizar en una etapa, permitiendo detectar los anticuerpos clínicamente significativos, pero no permite establecer la clase y la temperatura a la cual ellos son activos. El análisis de las intensidades en cruces puede orientar a la especificidad de un solo anticuerpo o a una mezcla de ellos.

Carta Panel (Antigrama)



Interpretación

1. Identificar y registrar adecuadamente la intensidad de cruces para cada célula panel, lo cual puede orientar a la especificidad del o los anticuerpos en la muestra.
 2. Descartar aquellas especificidades de anticuerpos para las cuales el estudio muestra un resultado negativo (descarte por reacciones negativas) con células de expresión homocigota.
 3. Comparar el patrón de reacciones (positivas y negativas) de la columna de resultados con las columnas para la especificidad.
 4. La especificidad probable del anticuerpo se debe demostrar por la ausencia del antígeno de los glóbulos rojos.
 5. Cuando no es posible identificar los anticuerpos en una muestra a través del panel básico, se deben utilizar técnicas adicionales (fenotipo eritrocitario, panel enzimático, elución-adsorción) o derivar a laboratorio de Referencia para completar estudio
 6. La especificidad del anticuerpo sólo se debe asignar cuando es reactivo con al menos dos células panel que tienen el antígeno y no reactivo con al menos dos células panel que carecen del antígeno. Siempre que sea posible, la presencia de anti-Jka, -Jkb, -S, -s, -Fya, y -Fyb debe excluirse usando células que tengan expresiones homocigotas del antígeno relevante.
 7. En casos de panaglutinación, revise el resultado del autocontrol, si éste es positivo se interpreta como presencia de autoanticuerpos y habrá que recurrir a técnicas de adsorción para eliminar el autoanticuerpo y evaluar la presencia de algún aloanticuerpo

FENOTIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ERITROCITARIOS

- TÉCNICA EN TUBO

Principio

El estudio de fenotipo de antígenos eritrocitarios es empleado principalmente para la selección de sangre antígeno-negativo para transfusión cuando el paciente presenta anticuerpos irregulares eritrocitarios con especificidad definida. Cuando este análisis se hace de forma sistemática sobre parte o el total de la población atendida, permite conocer la prevalencia por cada antígeno sanguíneo estudiado y estimar la probabilidad de encontrar una unidad de sangre con una determinada característica antigénica, establecer presencia de “donantes raros” o pacientes con alto riesgo de aloinmunización, entre otras.

Se deben incorporar controles con características antigénicas conocidas, al menos uno positivo y otro negativo para el antígeno o grupo de antígenos en cuestión, heterocigotas siempre que estén disponibles para el caso de las positivas.

La conformación del control de calidad se hace por lote (controles positivo y negativo en la técnica en tubo).

Se deben leer las instrucciones del fabricante de cada antisuero, pues hay algunos anticuerpos de clase IgM y otros de clase IgG, los que sería necesario realizar TAI para su detección.

Muestra

Sangre obtenida con anticoagulantes (EDTA, CPD-A1, heparina) o sin anticoagulante, recién extraída

Las muestras de sangre que no se usen inmediatamente pueden conservarse a 2-8°C

No debe utilizarse muestras con hemólisis masiva

Ejemplo

Paso	Procedimiento
	Acción
1	Poner 1 gota del antisuero en un tubo rotulado
2	Añadir a cada tubo una gota de una suspensión fresca de hematíes al 3-5% en solución salina fisiológica (se puede lavar la muestra 1-3 veces con solución salina fisiológica)
3	Mezclar los reactivos e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente
4	Centrifugar para leer
5	Resuspender los hematíes completamente y comprobar de inmediato y macroscópicamente la presencia de aglutinación
6	Evaluuar y registrar los resultados

Control de calidad

Se deben realizar controles positivos (expresión antigenica heterocigota) y negativos en paralelo cada día que se utilice el reactivo

FENOTIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ERITROCITARIOS

- TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL) DG Gel Rh Pheno+Kell

La importancia clínica del grupo Rh reside en el hecho de que el antígeno D (RH1) es altamente inmunogénico. Los antígenos D(RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4) y e (RH5) son los más importantes del grupo de antígenos que forman este sistema.

El antígeno K (KEL1) es de gran importancia clínica, dado que se encuentra presente en casos de enfermedad hemolítica.

La determinación de los fenotipos Rh y antígeno K, se define por la presencia o ausencia de los antígenos D(RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5), C^w (RH8) y K (KEL1) en los hematíes.

Muestra Sangre de extracción reciente, recogida con los anticoagulantes habituales (EDTA, citrato, heparina), si es necesario pueden utilizarse muestras conservadas a 2-8°C hasta 48 horas después de su extracción.

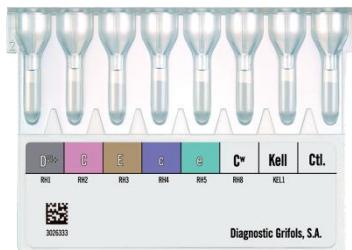
Hematíes procedentes de bolsa recogidos con CPD, CPD-A o SAG-manitol hasta la fecha de caducidad indicada en la fecha de la bolsa si se conservan a 2-8°C.

Si se trabaja con hematíes del segmento de las bolsas, se recomienda lavar los hematíes con solución fisiológica antes de preparar la suspensión.

No utilizar si se observan coágulos o hemólisis.

Reactivos 1. Tarjetas DG Gel Rh Pheno+Kell
2. Dg gel Sol

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Dejar que las tarjetas DG Gel Pheno+Kell, los reactivos adicionales y las muestras alcancen la temperatura ambiente (18 - 25 °C).
2	Identificar las tarjetas a utilizar y las muestras a analizar
3	Despegar con precaución la lámina de metal que cubre los microtubos para prevenir contaminaciones cruzadas entre ellos
4	Preparar una suspensión de hematíes al 5% en DG gel Sol
5	Dispensar con precaución 10 µL de los Hematíes al 5%, evitando que la punta de la pipeta entre en contacto con la pared o contenido de los microtubos
6	Centrifugar la tarjeta de gel en la centrífuga Grifols
7	Registrar los resultados



Interpretación de los resultados

Sistema Rh (antígeno D)

Microtubo DVI+	Microtubo Ctrl	Interpretación
+	0	D Positivo
0	0	D Negativo

Controles

1. En cada serie de pruebas, es recomendable incluir controles conocidos positivos y negativos

Fisher-Race Haplotype	Wiener Haplotype	Prevalence (%)		
		White	Black	Asian
Dce	R ₀	4	44	3
DCe	R ₁	42	17	70
DcE	R ₂	14	11	21
DCE	R _z	<0.01	<0.01	1
ce	r	37	26	3
Ce	r'	2	2	2
cE	r''	1	<0.01	<0.01
CE	r ^y	<0.01	<0.01	<0.01

Antisera						Predicted Genotype*	Alternative Genotype
Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Phenotype		
Rh positive[†]							
+	+	0	+	+	D, C, c, e	<i>R1 r</i>	<i>R1 R0</i>
						<i>DCe/ce</i>	<i>DCe/DCe</i>
						<i>R0 r'</i>	
						<i>Dce/Ce</i>	
+	+	0	0	+	D, C, e	<i>R1 R1</i>	<i>R1 r'</i>
						<i>DCe/DCe</i>	<i>DCe/Ce</i>
+	+	+	+	+	D, C, c, E, e	<i>R1 R2</i>	<i>R1 r''</i>
						<i>DCe/DcE</i>	<i>DCe/cE</i>
						<i>R2 r'</i>	
						<i>DcE/Ce</i>	
						<i>Rz r</i>	
						<i>DCE/ce</i>	
						<i>R0 Rz</i>	
						<i>Dce/DCE</i>	
+	0	0	+	+	D, c, e	<i>R0 r</i>	<i>R0 R0</i>
						<i>Dce/ce</i>	<i>Dce/Dce</i>
+	0	+	+	+	D, c, E, e	<i>R2 r</i>	<i>R2 R0</i>
						<i>DcE/ce</i>	<i>DcE/Dce</i>
						<i>R0 r''</i>	
						<i>Dce/cE</i>	
+	0	+	+	0	D, c, E	<i>R2 R2</i>	<i>R2 r''</i>
						<i>DcE/DcE</i>	<i>DcE/cE</i>
+	+	+	0	+	D, C, E, e	<i>R1 Rz</i>	<i>Rz r'</i>
						<i>DCe/DCE</i>	<i>DCE/Ce</i>
+	+	+	+	0	D, C, c, E	<i>R2 Rz</i>	<i>Rz r''</i>
						<i>DcE/DCE</i>	<i>DCE/cE</i>
+	+	+	0	0	D, C, E	<i>Rz Rz</i>	<i>Rz r''</i>
						<i>DCE/DCE</i>	<i>DCE/CE</i>

PRUEBAS CRUZADAS

La terapia transfusional involucra el estudio y selección de componentes sanguíneos, y la posterior administración en pacientes que lo necesiten en forma vital, lo cual resulta en un producto transfundido con sobrevida aceptable, sin destrucción clínicamente significativa y no afecten los glóbulos rojos (GR) propios del paciente.

Para asegurar esta premisa, se realizan, por tanto, las llamadas pruebas de compatibilidad sanguínea, que son todos aquellos procedimientos y pruebas de laboratorio cuyo objetivo final es asegurar principalmente la compatibilidad entre el donante y el receptor de una transfusión sanguínea.

Las pruebas cruzadas (PC), como una parte de las pruebas de compatibilidad, se definen como un procedimiento que se utiliza para excluir la incompatibilidad entre donante y receptor. Utiliza suero o plasma del paciente y GR de las unidades de sangre a transfundir a un paciente.

Se realiza para asegurar que:

- No hay incompatibilidad ABO entre el paciente y los GR a transfundir.
- No hay otros anticuerpos irregulares que puedan causar una reacción transfusional hemolítica o un acortamiento de la vida media de las células transfundidas.

El procedimiento de PC se debe aplicar según las Reglas de Compatibilidad Transfusional, es decir, en primera instancia deben compatibilizarse unidades “isogrupo” y en caso de no ser posible se debe recurrir a compatibilizar unidades ABO y RhD compatibles.

-Prueba Cruzada Completa: es aquella prueba que asegura la compatibilidad de todos los sistemas sanguíneos clínicamente significativos entre la unidad de GR del donante y el suero o plasma del receptor, a través de la ejecución obligada de la fase de SAGH.

-Prueba Cruzada Incompleta: es aquella prueba que asegura la compatibilidad ABO entre la unidad de GR del donante y el suero o plasma del receptor, a través de la ejecución obligada de la fase de centrifugación inmediata o temperatura ambiente.

Muestra

1. Muestra tomada desde la tubuladura de la unidad a probar.
2. Paciente: Muestra de sangre total sin o con anticoagulante (EDTA, ACD) para la obtención de suero o plasma. Las muestras de receptores de transfusión deben cruzarse con los GR del donante en el menor tiempo posible, no excediendo las 72 horas desde su obtención.
3. PBS o solución salina para lavar.

A) TÉCNICA EN TUBO CON SUSPENSIÓN EN LISS

Reactivos

1. Suero AGH: De preferencia utilizar el tipo poliespecífico (anti IgG/anti C3d)
2. Suero fisiológico tamponado, PBS o solución diluyente recomendada para la técnica utilizada.
3. Controles positivos y negativos

Paso	Procedimiento
	Acción
1	Lavar los glóbulos rojos de la tubuladura con PBS o solución salina, 2-3 veces, elimine el último sobrenadante
2	Resuspender los glóbulos rojos 2% a 3% en solución LISS.
3	Agregar 2 gotas de suero a tubos previamente rotulados con la identificación de la bolsa a transfundir
4	Añadir 2 gotas de glóbulos rojos suspendidos en LISS, mezclar e incube a 37° C durante a 10 a 15 minutos (ver las instrucciones del fabricante).
5	Centrifugar y observar hemólisis y aglutinación resuspendiendo suavemente el botón eritrocitario. Graduar la intensidad de la reacción y registrar los resultados.
6	Lavar los glóbulos rojos 3 a 4 veces con salina, y eliminar completamente el sobrenadante final.
7	Agregar AGH a los glóbulos rojos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mezclar bien
8	Centrifugar y observar en busca de aglutinación. Graduar y registrar los resultados
9	Confirmar la validez de los resultados negativos añadiendo glóbulos rojos cubiertos con IgG.

Interpretación

La interpretación de las PC debe realizarse de acuerdo con los resultados de la siguiente tabla:

Reacción de suero o plasma paciente (receptor)		Interpretación
GR Donante	GR paciente	
+	+	Incompatible
0	+	Compatible
+	0	Incompatible
0	0	Compatible

B) PRUEBA CRUZADA EN TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL)

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Identificar las tarjetas a utilizar y las muestras a analizar
2	Retirar el precinto de toda la tarjeta DG Gel o de los microtubos individuales a utilizar. Nota: Utilizar los microtubos inmediatamente después de abrir el precinto.
3	Lavar los glóbulos rojos de la tubuladura con PBS o solución salina, 2-3 veces, elimine el último sobrenadante
4	Preparar con diluyente DG Gel Sol, una suspensión al 1%
5	Dispensar 50 µL de los Hematíes al 1% en los microtubos
6	Añadir 25 µL de suero o plasma en los mismos microtubos
7	Incubar 15 minutos a 37 °C en el incubador Grifols
8	Centrifugar la tarjeta de gel en la centrífuga Grifols, retirar la tarjeta de gel de la centrífuga y leer los resultados

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG

La titulación es un método semicuantitativo que se emplea para determinar la concentración de anticuerpos en muestras de suero o comparar la intensidad de la expresión antigénica en distintas muestras de glóbulos rojos. La dilución del plasma/suero se realiza mediante diluciones seriadas utilizando solución salina isotónica y, a continuación, se realiza un análisis frente a los hematíes apropiados.

La titulación suele describirse como un “procedimiento inherentemente impreciso”.

Como en el caso de cualquier otro método de laboratorio la estandarización es, pues, imperativa para reducir al mínimo las variables que puedan interferir con un resultado preciso y significativo.

Los resultados también dependen de la constante de equilibrio del propio anticuerpo además de su concentración, por lo que el control de los parámetros de la prueba es muy importante.

Las aplicaciones habituales de los estudios de titulación son:

- 1) Estimar la actividad de los anticuerpos en las embarazadas aloinmunizadas, para establecer si corresponde y cuándo efectuar investigaciones invasivas más complejas del estado del feto, para que los resultados sean significativos es importante titular en paralelo y bajo las mismas condiciones, las muestras tomadas en las distintas etapas de la gestación
- 2) Definir la especificidad de los autoanticuerpos
- 3) Caracterizar los anticuerpos con títulos altos y baja avidez, rasgos comunes de aquellos anticuerpos dirigidos contra antígenos de los sistemas Knops, Chido/ Rodgers, Cs^a y JMH
- 4) Observar el efecto de los reactivos sulfhidrilo sobre el comportamiento de los anticuerpos, para reconocer la clase de inmunoglobulina involucrada
- 5) Titulación de anticuerpos ABO para permitir evaluación clínica de la viabilidad de trasplante ABO incompatible y seguimiento del tratamiento para reducir título de anticuerpos en preparación para el mismo.

Muestras	Plasma o suero con anticuerpos a titular
Reactivos	<ol style="list-style-type: none">1. Glóbulos rojos que expresan los antígenos correspondientes a los anticuerpos en cuestión, en suspensión al 2%-5% en solución salina La uniformidad de las suspensiones celulares es muy importante para garantizar la comparación de los resultados.2. Solución salina.

El método recomendado por la aabb es el salino-antiglobulina con una incubación de 60 minutos a una temperatura de 37°C, otros prefieren utilizar la prueba salina estándar seguido de una incubación a 37°C y finalizando en medio antiglobulínico con anti-IgG.

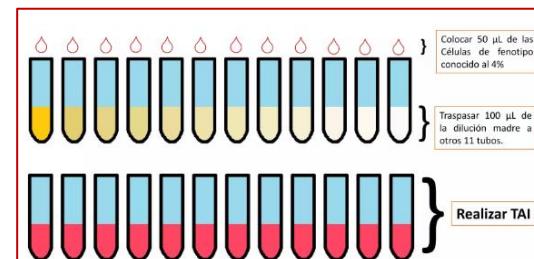
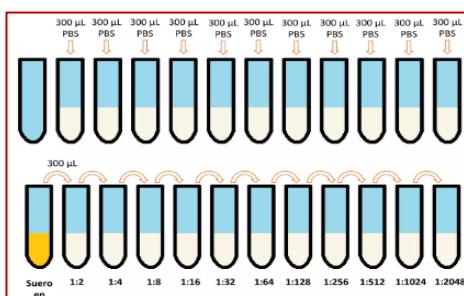
El método en gel es controversial debido que los títulos son 2 veces más elevados y conduce a correlaciones dudosas o invasivas para madre y feto.

A pesar de estas limitaciones, un título realizado utilizando la misma técnica y las mismas células, en paralelo, puede identificar si ha habido un aumento/disminución de anticuerpos

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG TÉCNICA EN TUBO

	Procedimiento
Paso	Acción
	<i>Dilución madre</i>
1	Rotular 10 tubos Khan de acuerdo con la dilución del suero (Ej. 1en1, 1en 2, etc.). La dilución 1en 1 significa un volumen de suero no diluido; la dilución 1 en 2 significa un volumen de suero en un volumen final de dos o una solución al 50 % de suero en el diluyente
2	Colocar 1 volumen constante (ej.: 0.5ml) de solución salina en todos los tubos, excepto el primero (no diluido, 1 en 1)
3	Agregar un volumen igual de suero a estudiar a los dos primeros tubos (no diluido y 1 en 2)
4	Con una pipeta limpia, mezclar varias veces el contenido de la dilución 1 en 2 y transferir 1 volumen al tubo siguiente (dilución 1en 4) evitando la formación de burbujas
5	Repetir el procedimiento para todas las diluciones, usando una pipeta limpia para mezclar y transferir cada alícuota. Retirar 1 volumen de suero diluido del tubo final y guardarlo para eventuales diluciones ulteriores.
	<i>Tubos de reacción</i>
6	Rotular 10 tubos para las diluciones apropiadas
7	Usando pipetas individuales para cada dilución, transferir 100 ul de cada suero diluido en los tubos rotulados y agregar 50 ul de la suspensión de glóbulos rojos al 2%-5 %.
8	Mezclar bien y evaluar con la técnica serológica apropiada para los anticuerpos en estudio ((ej.: salino, 37°C, AGH)
9	Examinar macroscópicamente los resultados, graduar y registrar las reacciones.
10	Valide los resultados sin aglutinación con células control Coombs

El fenómeno de prozona puede causar reacciones más débiles en las preparaciones más concentradas que en las más diluidas; para evitar la interpretación errónea de los resultados, es preferible examinar primero el tubo con el suero más diluido y luego continuar con las muestras más concentradas



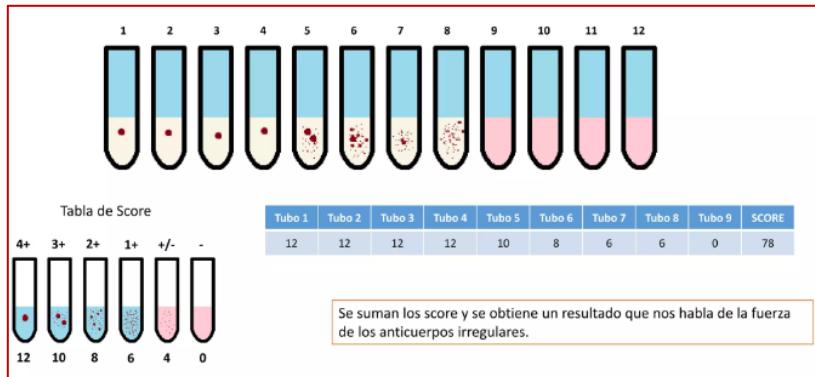
TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG EN AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL)

	Procedimiento
Paso	Acción
<i>Dilución madre</i>	
1	Rotular 10 tubos Khan de acuerdo con la dilución del suero (Ej. 1en1, 1en 2, etc.). La dilución 1en 1 significa un volumen de suero no diluido; la dilución 1 en 2 significa un volumen de suero en un volumen final de dos o una solución al 50% de suero en el diluyente
2	Colocar 1 volumen constante (ej.: 0.5ml) de solución salina en todos los tubos, excepto el primero (no diluido, 1 en 1)
3	Agregar un volumen igual de suero a estudiar a los dos primeros tubos (no diluido y 1 en 2)
4	Con una pipeta limpia, mezclar varias veces el contenido de la dilución 1 en 2 y transferir 1 volumen al tubo siguiente (dilución 1en 4) evitando la formación de burbujas
5	Repetir el procedimiento para todas las diluciones, usando una pipeta limpia para mezclar y transferir cada alícuota. Retirar 1 volumen de suero diluido del tubo final y guardarlo para eventuales diluciones ulteriores.
<i>Tarjeta DG gel Coombs</i>	
6	Dejar que las tarjetas DG Gel Coombs, los reactivos adicionales y las muestras alcancen la temperatura ambiente (18 - 25 °C)
7	Identificar las tarjetas a utilizar, escriba el número de la dilución en cada microtubo
8	Retirar el precinto de toda la tarjeta DG Gel o de los microtubos individuales a utilizar
9	Mezclar bien los viales de hematíes reactivo a usar con el fin de asegurar la suspensión homogénea de los hematíes antes de su uso.
10	Dispensar 50 µL de los Hematíes Reactivo 1% en los microtubos.
11	Añadir 25 µL de cada dilución madre a los microtubos
12	Incubar 15 minutos a 37 °C en el incubador Grifols y centrifugar. Leer, graduar y registrar los resultados

Interpretación

1. Observar la mayor dilución con una aglutinación macroscópica de 1+. El título es la inversa de la dilución y se informa como, por ejemplo, 32 y no 1en 32 o 1:32. Si se advierte aglutinación en el tubo que contiene el suero más diluido, no se alcanzó el punto final; preparar y evaluar diluciones adicionales.
2. En los estudios comparativos, la diferencia significativa en los títulos es de tres o más diluciones. Por las divergencias en la técnica y la variabilidad biológica, las pruebas por duplicado podrían revelar resultados que difieren en una dilución, en cualquier dirección. Es decir, el suero con títulos de anticuerpos de 32 puede mostrar reactividad hasta el tubo 1:32, el 1:64 o el 1:16.
3. Los anticuerpos con alto título y baja avidez generalmente tienen títulos más altos que 64, con reactividad débil en la mayoría de los tubos.
4. Los títulos solos, sin la evaluación adicional de la intensidad de la aglutinación, pueden ser engañosos. En los estudios de titulación es factible asignar un valor numérico a la intensidad de la aglutinación y la suma correspondiente a todos los tubos representa el puntaje (score), otro parámetro semicuantitativo de la reactividad de los anticuerpos. El umbral con significado arbitrario para comparar los puntajes es una diferencia de 10 o más entre las muestras.

Características de la aglutinación de acuerdo a la técnica utilizada			
Tubo/Microplaca	Microcolumna	Intensidad de reacción	Score o puntaje
Botón único. Fondo claro. Sin células libres.	Banda homogénea de aglutinados en la parte superior de la columna.	4+	12
Varios aglutinados de gran tamaño. Fondo claro. Sin células libres.	Banda superior de aglutinado y desplazamiento en la parte superior de la columna.	3+	10
Muchos aglutinados de mediano tamaño. Fondo claro. Sin células libres.	Aglutinados pequeños en la columna y a lo largo de la columna.	2+	8
Numerosos aglutinados pequeños. Fondo turbio por GR libres.	Algunos aglutinados pequeños en la columna.	1+	5
Aglutinación escasamente visible. Fondo turbio por GR libres.	Escaros aglutinados de pequeño tamaño en la columna.	+/-	2
Ausencia de aglutinación	Banda de GR al fondo de la columna, resto de la columna sin aglutinados.	0	0



Por ejemplo, cuando se comparan dos sueros de la misma especificidad:

Suero/Plasma	DILUCIÓN									Score
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
X	4+	4+	3+	2+	1+	1+	1+	0	0	55
Y	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0	0	71

Ambos sueros tienen el mismo título de 64; el suero Y contiene el anticuerpo más potente con un score de 71, comparado con el suero X que muestra un score de 55. Una diferencia mayor de 10 en el score es significativa. Para mejor interpretación del clínico, es conveniente informar título y score

Tabla 3-7-1. Ejemplos de títulos de anticuerpos, puntos finales y scores											
Inversa de la dilución sérica											
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Título*
Muestra 1	Intensidad	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	±	±	0 64 (256)
	Puntaje	10	10	10	8	8	8	5	3	2	0 64
Muestra 2	Intensidad	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1	±	0 128 (256)
	Puntaje	12	12	12	10	10	8	8	5	3	0 80
Muestra 3	Intensidad	1+	1+	1+	1+	±	±	±	±	±	0 8 (256)
	Puntaje	5	5	5	5	3	3	3	2	2	0 33

*El título suele determinarse a partir de la mayor dilución que muestra una reacción de 1+ (puntaje 5). Este valor puede diferir mucho del punto final de la titulación (entre paréntesis), como en el caso de las reacciones de los anticuerpos con alto título y baja avidad de la muestra 3.

Notas

La titulación es un procedimiento semicuantitativo. Las variables técnicas afectan mucho los resultados, con lo cual se requiere gran cuidado para lograr la mayor uniformidad posible.

1. Las mediciones son más exactas en los volúmenes grandes que en los pequeños; la técnica de dilución madre ofrece resultados más confiables que las diluciones individuales. Es preciso calcular el volumen necesario para todas las pruebas planeadas y preparar una cantidad adecuada de cada dilución.
2. Es esencial pipetear con cuidado. Se aconseja usar pipetas con extremos descartables (tips) que se cambian después de cada dilución.
3. La antigüedad, el fenotipo y la concentración de los glóbulos rojos de prueba influyen en los resultados.
4. Es importante respetar el período y temperatura de incubación, así como la duración y potencia de centrifugación óptimas.
5. Cuando se desea comparar los títulos de varios sueros con anticuerpos, todos deben evaluarse con glóbulos rojos (en lo posible frescos) del mismo donante. Si no es posible, se debe utilizar un pool de glóbulos rojos con el mismo fenotipo. Las comparaciones son válidas sólo cuando las muestras se estudian simultáneamente.
6. Cuando se investiga un suero con distintas muestras de glóbulos rojos, todas deben extraerse y conservarse de la misma manera y diluirse a la misma concentración antes de su utilización. El material de la dilución madre debe ser utilizado para todas las pruebas

Controles

Se recomienda titular un anticuerpo de concentración conocida o un título “esperado” para validar la titulación. Esto ayudará a minimizar la variabilidad que afecta la realización de esta técnica.

Durante el embarazo, la titulación de anticuerpos se realiza para identificar mujeres con niveles significativos de anticuerpos que pueden causar EHFN y establecer un título base para comparar con títulos futuros. La titulación de anticuerpos no Rh debiera discutirse con el médico obstetra respecto al manejo clínico del embarazo.

Dependiendo de la especificidad del anticuerpo, un título de ≥ 16 se considera significativo y puede justificar realizar un seguimiento para EHFN. Algunos laboratorios consideran significativo cualquier título de anticuerpo anti-K.

La selección del fenotipo de los eritrocitos apropiados para la realización de títulos en el contexto de EHFN es controversial. Algunos seleccionan glóbulos rojos que tengan una expresión fuerte del antígeno, tales como R₂R₂ para anti-D. Otros seleccionan glóbulos rojos con fenotipo que debiera expresarse en el feto (p.ej.: glóbulos rojos que expresen una dosis simple del antígeno como R₁r para probar anti-D). Cualquiera sea la opción escogida, es importante que el laboratorio sea consistente y use glóbulos rojos del mismo fenotipo para las futuras titulaciones del mismo paciente.

Cuando el título (p.ej, ≥ 16) y la especificidad del anticuerpo se ha asociado a con EHFN, se recomienda que los títulos se repitan cada 2 - 4 semanas , comenzando en la semana 18 de gestación.

No se recomienda el uso de potenciadores (albúmina, PEG, LISS o glóbulos rojos tratados con enzimas porque pueden obtenerse títulos falsamente elevados.

Cuando la titulación se realiza en el contexto de un seguimiento de embarazo (aprox. a las 12-18 semanas), se determina el primer título. Las siguientes titulaciones debieran realizarse en paralelo con la muestra previa para minimizar la variabilidad inherente de la técnica y proveer una aproximación más precisa del nivel de anticuerpos. Los plasmas o sueros deben almacenarse congelados (a -20°C o menos). Al descongelar las muestras se producen gradientes de concentración, y es necesario invertir el tubo varias veces. Si existe material no disuelto se puede llevar la muestra a 37°C para disolver el material.

INVESTIGACIÓN DE PAD POSITIVO

Elución

La elución separa los anticuerpos de los glóbulos rojos sensibilizados. Estos anticuerpos ligados pueden liberarse mediante un cambio en la termodinámica de las reacciones antígeno-anticuerpo, a través de la neutralización o inversión de las fuerzas de atracción que mantienen unidos los complejos antígeno-anticuerpo o a través de la rotura de la estructura en el sitio de unión antígeno-anticuerpo. El objetivo es recuperar el anticuerpo unido en una forma utilizable.

Ningún método por si solo es ideal para todas las situaciones. Las técnicas de elución por calor o congelamiento-descongelamiento usualmente se restringen a la investigación de EHFN causada por incompatibilidad ABO, debido a que dichos procedimientos de elución raramente funcionan de forma correcta para otros anticuerpos.

Los métodos de solvente orgánico o ácido se utilizan para eluir auto y aloanticuerpos reactivos en caliente.

Asimismo, se encuentran disponibles equipos comerciales para la realización de eluciones.

Después de obtenido el eluado, debiera probarse con técnicas apropiadas según el tipo de anticuerpo que se investiga.

Los eluidos que se preparan para la detección de anticuerpos IgG deben incubarse a 37° C y evaluarse con la prueba antiglobulínica.

Las eluciones por calor preparadas para la detección de anticuerpos IgM pueden incubarse primero a temperatura ambiente durante 15-30 minutos y, si no son reactivos, se incuban a 37° C, se centrifugan, se leen para investigar si hay aglutinación, y luego se realiza la prueba antiglobulínica. Las aglutininas IgM pueden no detectarse en la fase de antiglobulina.

Métodos de elución de anticuerpos		
Método	Uso	Comentarios
Congelación-descongelación de Lui	EHFN ABO	Rápida, se necesita un pequeño volumen de glóbulos rojos; poca recuperación de otros anticuerpos
Calor (56 °C)	EHFN ABO; anticuerpos aglutinantes IgM	Fácil; poca recuperación de aloanticuerpos y autoanticuerpos IgG
Elución ácida (comercial)	Autoanticuerpos y aloanticuerpos calientes	Fácil; posibles eluidos falsos positivos en presencia de un anticuerpo de alto título
Solvente químico	Autoanticuerpos y aloanticuerpos calientes	Peligros químicos (Ej.:inflamable,toxicidad, carcinogenicidad)

ELUCIÓN POR CALOR

Principio

Utiliza un aumento de la temperatura para disociar anticuerpos de los eritrocitos. Este método es más adecuado para la investigación de la EHFN por incompatibilidad ABO y para la elución de anticuerpos IgM de los eritrocitos.

No debe emplearse rutinariamente para investigar auto o aloanticuerpos IgG.

- Muestra**
1. Eritrocitos con PAD positiva, lavados 4-6 veces con solución salina
 2. Sobrenadante salino del último lavado de los eritrocitos en estudio

- Reactivos** Albúmina bovina al 6%

Procedimiento	
Paso	Acción
1	Mezclar volúmenes iguales de glóbulos rojos concentrados lavados y albúmina bovina al 6%, en un tubo Khan
2	Incubar durante 10 minutos a 56 °C. Agitar en forma periódica
3	Centrifugar durante 2 a 3 minutos a 900-1000 x g
4	Transferir de inmediato el eluido sobrenadante a un tubo limpio y evaluar en paralelo con el sobrenadante salino del lavado final

- Nota** Para la óptima recuperación de los anticuerpos reactivos en frío, los glóbulos rojos deben lavarse con solución salina helada a fin de evitar la disociación del anticuerpo adherido antes de realizar la elución

ELUCIÓN POR CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE LUI

Principio

Cuando los eritrocitos se congelan se forman cristales de hielo extracelulares que atraen el agua de sus alrededores. Esto aumenta la osmolaridad del líquido extracelular provocando entonces la salida de agua de los glóbulos rojos. Estos glóbulos rojos se retraen, causando lisis. A medida que se alteran las membranas, el anticuerpo se disocia. Este método se usa principalmente para la investigación de la enfermedad hemolítica fetoneonatal por incompatibilidad ABO.

Muestra

1. Eritrocitos concentrados lavados entre cuatro y seis veces con grandes volúmenes de solución salina
2. Sobrenadante salino del último lavado de los glóbulos rojos en estudio

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Mezclar 0,5 ml de glóbulos rojos con 3 gotas de solución salina en un tubo Khan
2	Tapar el tubo y rotarlo para recubrir las paredes con las células
3	Colocar el tubo en posición horizontal en el congelador durante 10 minutos de -6 °C a -70 °C
4	Retirar el tubo del congelador y calentar con agua corriente caliente
5	Centrifugar durante 2 minutos a 900-1000 x g.
6	Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y evaluar en paralelo con el sobrenadante salino del último lavado.

TÉCNICA DE ADSORCIÓN DE ANTICUERPOS

Es el proceso de fijar un anticuerpo a su antígeno específico en la superficie del eritrocito. Los autoanticuerpos calientes pueden enmascarar la presencia concomitante de aloanticuerpos en un suero. La adsorción del suero con eritrocitos autólogos puede eliminar los autoanticuerpos.

• ADSORCIÓN CON POLIETILENGLICOL (PEG)

Principio

El Polietilenglicol (PEG) aumenta la adsorción de anticuerpos mediante glóbulos rojos no tratados. Evaluar la alícuota adsorbida contra un panel de glóbulos rojos puede identificar la especificidad de anticuerpos remanentes posteriores a la adsorción.

Este método puede utilizarse tanto para adsorción autóloga como alogeneica.

Muestras Suero o plasma a estudiar

Reactivos

1. PEG al 20% (20 g PEG, 3350 Mw, en 100 ml de PBS pH 7.3) o reactivo PEG de origen comercial.
2. Glóbulos rojos autólogos o alogeneicos ABO-compatibles de fenotipo conocido. Reservar una muestra de estos glóbulos rojos para comprobar que el proceso de adsorción fue completo (paso 5)

	Procedimiento
Paso	Acción
1	Lavar las alícuotas de glóbulos rojos con grandes volúmenes de solución salina por lo menos tres veces y centrifugar durante 5-10 minutos a 1000 x g. Remover toda la solución salina residual
2	Agregar a 1 volumen (por ej. 1 mL) de glóbulos rojos, 1 volumen igual de suero y 1 volumen igual de PEG. Mezclar bien e incubar durante 15 minutos a 37 °C
3	Centrifugar la mezcla de suero/ PEG/célula durante 5 minutos y recoger la mezcla adsorbida de suero/PEG
4	Para evaluar el suero adsorbido, agregar 4 gotas de la mezcla de suero/PEG a 1 gota de glóbulos rojos en estudio, incubar durante 15 minutos a 37 °C, y proceder a la prueba de antiglobulina utilizando antiIgG. Se requiere un volumen mayor de suero evaluado (4 gotas) por la dilución del suero por el PEG. Véase Notas 3 y 4.
5	Para corroborar que el proceso de adsorción fue completo, estudiar el suero adsorbido contra los glóbulos rojos utilizados para la adsorción. En caso de ser positivo, repetir la adsorción agregando el suero adsorbido a una alícuota fresca de glóbulos rojos, pero no agregar PEG extra. En caso de ser negativo, evaluar el suero adsorbido con un panel de células para la identificación de anticuerpos

PLANTILLA CONTROL DE CALIDAD ANTISUEROS

Tecnólogo Médico: _____ Fecha: _____

INSPECCIÓN VISUAL

	Turbidez	Precipitado	Partículas
Anti- A			
Anti- B			
Anti- AB			
Anti-D			

ESPECIFICIDAD

					Controles		Avidez (segundos)
Fecha	Tipo de reactivo	Marca	Lote	Vencimiento	Negativo	Positivo	

POTENCIA

TITULACIÓN DEL ANTISUERO ANTI _____

(Células utilizadas: _____)

Dilución	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	Título
Intensidad													

OBSERVACIONES

PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD ADULTO TÉCNICA EN TUBO

PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD ADULTO TÉCNICA AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL)

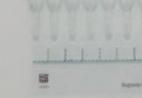
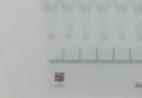
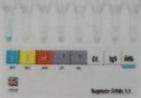
PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD RECIÉN NACIDO TÉCNICA EN TUBO

PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD RECIÉN NACIDO TÉCNICA AGLUTINACIÓN EN COLUMNA (GEL)

PLANTILLA CLASIFICACIÓN GRUPO ABO RhD ADULTO Y PAI

GENOTIPO PROBABLE Rh EN BASE A FENOTIPO

Fecha	Id. Muestra	Anti-D (RH1)	Anti-C (RH2)	Anti-E (RH3)	Anti-c (RH4)	Anti-e (RH5)	Genotipo probable

Grupo sanguíneo ABO y Rh (D)  	Comprobación del grupo ABO  	Fenotipo Rh  	Escrutinio de anticuerpos irregulares  	Identificación de anticuerpos irregulares  
Coombs directo  	Pruebas pretransfusionales neonatos  	Fenotipo eritrocitario en Coombs  	Fenotipo eritrocitario en medio salino  	Fenotipo eritrocitario con bromelina  

BIBLIOGRAFIA

Manual Técnico aabb 18°Edición

Manual Técnico aabb 20°Edición

<https://www.ispch.gob.cl/biomedico/documentos-tecnicos-de-referencia/documentos-inmunohematologia/>