



ESTADO PLURINACIONAL DE BOLIVIA

# **“MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS DE TÉCNICAS INMUNOHEMATOLÓGICAS EFECTUADAS EN SERVICIOS DE SANGRE”**



PUBLICACIÓN  
**450**

**Serie: Documentos Técnico - Normativos**  
**La Paz - Bolivia**  
**2018**

R-BO  
WH460  
M665m  
No.450  
2018

Bolivia. Ministerio de Salud. Dirección General de Servicios de Salud. Programa Nacional de Sangre.  
Manual de procedimientos operativos de técnicas inmunohematológicas efectuadas en Servicios de Sangre./Ministerio de Salud. La Paz : D y G, 2018.

144p.: ilus. (Serie: Documentos Técnico - Normativos No.450)

Depósito legal: 4-1-84-18 P.O.

- I. TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA^anorma
- II. HEMATOLOGIA^agrupos sanguíneos
- III. GARANTIA DE LA CALIDAD DE ATENCIÓN DE SALUD
- IV. SERVICIOS DE SANGRE
- V. PERSONAL DE LABORATORIO HEMATOLÓGICO
- VI. PACIENTES
- VII. MANUAL
- VIII. BOLIVIA
1. t.
2. Serie.

**“MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS DE TÉCNICAS  
INMUNOHEMATOLÓGICAS EFECTUADAS EN SERVICIOS DE SANGRE”**

Programa Nacional de Sangre, Edificio de la Escuela de Salud, 4to. Piso, Calle Capitán Ravelo N°2199  
Teléfono/Fax N° 591-2-2126046, [www.minsalud.gob.bo](http://www.minsalud.gob.bo)

R.M.: 0174 de 17 de abril de 2018

Depósito Legal: 4-1-84-18 P.O.

**Elaboración:**

Programa Nacional de Sangre - Ministerio de Salud

**Revisión:**

Dra. Ericka Lucía Machicao Carrasco, Coordinadora General PROGRAMA NACIONAL DE SANGRE/ Ministerio de Salud

Dra. Lissette Bautista, Técnica Médica, PROGRAMA NACIONAL DE SANGRE/ Ministerio de Salud

**Validación:**

- Servicios Departamentales de Salud (Anexo Editorial)
- Sociedad Boliviana de Hematología y Hemoterapia (Anexo Editorial)
- Servicios de Sangre de la Red Nacional de Sangre (Anexo Editorial)

Comité Técnico de Revisión de Publicaciones- Dirección General de Promoción de la Salud/MS

Comité de Identidad Institucional y Publicaciones:

- |                              |                                |                                 |                               |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| - Dr. Alvaro Terrazas Peláez | - Dr. Miguel Villarreal Troche | - Dra. Miriam Nogales Rodríguez | - Dr. Amilcar Barriga Velarde |
| - Dr. Edisson Rodríguez      | - Dr. José Villamil Cuevas     | - Sr. Miguel Cárcamo Porcel     | - Dra. Diana Noya Pérez       |

La Paz: Programa Nacional de Sangre - Dirección General de Servicios de Salud - Comité de Identidad Institucional y Publicaciones  
- Viceministerio de Salud y Promoción - Ministerio de Salud. 2018.

© Ministerio de Salud- 2018

Esta publicación es propiedad del Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia; se autoriza su reproducción, total o parcial, siempre que no sea con fines de lucro, a condición de citar la fuente y la propiedad.

*Impreso en Bolivia*

# **MINISTERIO DE SALUD**

AUTORIDADES NACIONALES

Dra. Ariana Campero Nava

**MINISTRA DE SALUD**

Dr. Alvaro Terrazas Peláez

**VICEMINISTRO DE SALUD Y PROMOCIÓN**

Sr. Lucas Choque Apaza

**VICEMINISTRO DE MEDICINA**

**TRADICIONAL E INTERCULTURALIDAD**

Dr. Rodolfo Rocabado Benavides

**DIRECTOR GENERAL DE SERVICIOS DE SALUD**

Dra. Ericka Lucía Machicao Carrasco

**COORDINADORA GENERAL**

**PROGRAMA NACIONAL DE SANGRE**





# Resolución Ministerial

Nº 0174

17 ABR 2018

## VISTOS Y CONSIDERANDO:

Que, la Constitución Política del Estado en el Parágrafo I del Artículo 35, determina que el Estado, en todos sus niveles, protegerá el derecho a la salud, promoviendo políticas públicas orientadas a mejorar la calidad de vida, el bienestar colectivo y el acceso gratuito de la población a los servicios de salud.

Que, el Artículo 36, parágrafo II de la Constitución Política del Estado se establece que el Estado regulará, vigilará y controlará el ejercicio de los servicios públicos y privados de salud de acuerdo a norma.

Que, el Numeral 1 del Parágrafo I del Artículo 81 de la Ley Nº 031 de 19 de julio de 2010, Ley Marco de Autonomías y Descentralización "Andrés Ibáñez", dispone que de acuerdo a la competencia del Numeral 17 del Parágrafo II del Artículo 298 y la competencia concurrente del Numeral 2 del Parágrafo II del Artículo 299 de la Constitución Política del Estado, el nivel central del Estado tendrá la competencia de elaborar la política nacional de salud y las normas nacionales que regulen el funcionamiento de todos los sectores, ámbitos y prácticas relacionados con la salud.

Que, el Artículo 3 del Código de Salud, aprobado mediante Decreto Ley Nº 15629 de 18 de julio de 1978, señala que corresponde al Poder Ejecutivo, actual Órgano Ejecutivo, a través del Ministerio de Previsión Social y Salud Pública, actual Ministerio de Salud, al que este Código denominará Autoridad de Salud, la definición de la política nacional de salud, la normación, planificación, control y coordinación de todas las actividades en todo el territorio nacional, en instituciones públicas y privadas sin excepción alguna.

Que, el Numeral 22 del Parágrafo I del Artículo 14 del Decreto Supremo Nº 29894 de 07 de febrero de 2009, determina como atribución de las Ministras y los Ministros del Órgano Ejecutivo, en el marco de las competencias asignadas al nivel central en la Constitución Política del Estado, de emitir las resoluciones ministeriales.

Que, el Inciso b) del Artículo 90 del mencionado Decreto, señala como atribución de la Ministra(o) de Salud y Deporte, actual Ministra(o) de Salud en el marco de las competencias asignadas al nivel central por la Constitución Política del Estado, de regular, planificar, controlar y conducir el Sistema Nacional de Salud, conformado por los sectores de seguridad social a corto plazo, público y privado con o sin fines de lucro y medicina tradicional.

Que, el Artículo 90 en su inciso a), d) y e) de la norma precitada determina como atribución de la Ministra de Salud el de formular, promulgar y evaluar el cumplimiento de los programas de salud en el marco del desarrollo del país, así como el de garantizar la salud de la población a través de su promoción, prevención de las enfermedades, curación y rehabilitación, también el de ejercer la rectoría, regulación y conducción sanitaria sobre todo el sistema de salud.

Que, el Parágrafo IV del Artículo 10 del Decreto Supremo Nº 1868 de 22 de enero de 2014, dispone que en todo el texto del Decreto Supremo Nº 29894 de 7 de febrero de 2009, de Organización del Órgano Ejecutivo, se sustituye la denominación de "Ministra(o) de Salud y Deportes" por "Ministra(o) de Salud".

Que, el Informe Técnico MS/VMSyP/DGSS/PNS/IT/15/2018 de 5 de abril de 2018, emitido por el Dr. Milton Magne, Bioquímico del Programa Nacional de Sangre, vía la Lic. Nancy Vino, Coordinadora General del Programa Nacional de Sangre a.i., dirigido a la Dra. Ariana Campero Nava, Ministra de Salud, en su conclusión manifiesta que el documento Manual de Procedimientos Operativos de Técnicas Inmunohematológicas Efectuadas en Servicios de Sangre del Programa Nacional de Sangre ha sido validado y aprobado por todas las instancias del Ministerio de Salud (Comité de Coordinación Técnica, Comité de Imagen Institucional y Publicaciones, y Comité de Revisión Técnica de Publicaciones) por lo que ese Programa otorga la conformidad técnica y financiera para la elaboración y publicación del Manual de Procedimientos Operativos de Técnicas Inmunohematológicas Efectuadas en Servicios de Sangre, recomendando la elaboración de la Resolución Ministerial para la publicación del mencionado documento técnico.

Que, el Informe Legal MS/DGAJ/UAJ/IL/419/2017, de 5 de abril de 2018, manifiesta que es procedente la emisión de la Resolución Ministerial que apruebe el "Manual de Procedimientos Operativos de Técnicas Inmunohematológicas Efectuadas en Servicios de Sangre", toda vez que esta solicitud no contraviene la normativa legal vigente y recomienda a la Señora Ministra de Salud, emitir la Resolución Ministerial correspondiente.

COPIA LEGALIZADA

COPIA FIEL DEL ORIGINAL





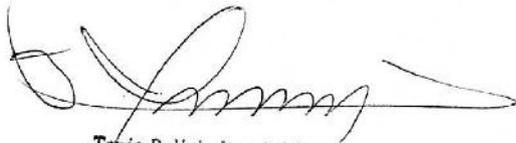
LA MINISTRA DE SALUD, en uso de las atribuciones que le confiere el Decreto Supremo N° 29894, de 07 de febrero de 2009, de Organización del Órgano Ejecutivo.

**RESUELVE:**

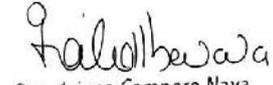
**ARTÍCULO PRIMERO.-** APROBAR el documento "MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS DE TÉCNICAS INMUNOHEMATOLÓGICAS EFECTUADAS EN SERVICIOS DE SANGRE", conforme al texto adjunto que forma parte integrante e indisoluble de la presente Resolución.

**ARTÍCULO SEGUNDO.-** El Programa Nacional de Sangre, queda a cargo de la ejecución y cumplimiento de la presente Resolución.

Regístrese, comuníquese y archívese.

  
Tonia Bolivia Iturrí Pérez  
DIRECTORA GENERAL DE ASUNTOS JURÍDICOS  
MINISTERIO DE SALUD

  
Dr. Alvaro Terrazus Peláez  
VICEMINISTRO DE SALUD  
Y PROMOCIÓN  
MINISTERIO DE SALUD

  
Dra. Ariana Campero Nava  
MINISTRA DE SALUD  
TERCERO PLURILINGÜE CIONAL DE BOLIVIA

COPIA LEGALIZADA

  
Betty Pazo Menecks  
RESPONSABLE DE ARCHIVO  
Y DOCUMENTACIÓN  
MINISTERIO DE SALUD

COPIA FIEL DEL ORIGINAL  
MINISTERIO DE SALUD

## PRESENTACIÓN

En cumplimiento al mandato dispuesto en la Constitución Política del Estado Plurinacional de Bolivia y en el Plan de Desarrollo Económico y Social 2016 2020, de garantizar a todas las bolivianas y bolivianos el acceso universal a los servicios de salud, el Ministerio de Salud, en el Plan Sectorial de Desarrollo Integral Para Vivir Bien, 2016 2020, establece la obligación de proveer y garantizar servicios de salud accesibles y oportunos en el marco de la política Salud Familiar Comunitaria e Intercultural, SAFCI.

Los principios de la Política SAFCI y su estrategia de implementación, la promoción de la salud, obligan al Sector Salud, a garantizar establecimientos de atención con recursos humanos preparados y capacitados para brindar salud con calidad y calidez.

La Medicina Transfusional se caracteriza por su gran avance tecnológico y científico. En Bolivia, el Programa Nacional de Sangre, del Ministerio de Salud, tiene como objetivo principal garantizar sangre segura, oportuna y accesible al menor costo, en beneficio de la población que así lo requiera. El Programa considera prioritaria la capacitación y actualización continua del personal de la Red Nacional de Sangre en los subsectores de la Salud Pública, en el Sistema Nacional de Salud.

Con esta prioridad se ha elaborado, consensado y estandarizado el "Manual de Procedimientos Operativos de Técnicas Inmunoematológicas efectuadas en Servicios de Sangre", que se convierte en una herramienta oficial que otorga lineamientos generales para que la Red Nacional de Sangre de todo el país desarrolle su trabajo de forma armonizada y correcta, permitiendo, de esta forma, mejorar la calidad de los procedimientos que se realizan de manera rutinaria en Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión.

La capacidad del servicio, la intervención coordinada de las y los actores en la gestión de salud y la reorientación de los servicios, trascienden la atención asistencial, para generar el abordaje y transformación de la determinación social de la salud en Bolivia.



Dra. Ariana Campero Nava  
MINISTRA DE SALUD



# INTRODUCCIÓN

El “Manual de Procedimientos Operativos de Técnicas Inmuno hematológicas efectuadas en Servicios de Sangre”, otorga los lineamientos generales para que los Servicios de Sangre (Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión) trabajen de manera uniforme, ordenada y correcta, permitiendo mejorar la calidad de las Técnicas Inmuno hematológicas que se realizan de manera rutinaria, aportando información científica actualizada con técnicas estandarizadas, cuya aplicación es a Nivel Nacional.

La obtención de resultados correctos en las técnicas inmuno hematológicas aplicadas de forma generalizada para constatar la perfecta hemoclasificación de las unidades de sangre, hemocomponentes y de los pacientes es fundamental para garantizar una buena asistencia transfusional.

Es importante que el lector conozca que la sangre que dona una persona nunca se transfunde directamente al paciente.

Al donante se le extraen, además de la unidad de sangre, muestras en tubos de ensayo para que se realice un conjunto de pruebas Inmuno hematológicas e Inmunoserológicas; a estos procedimientos, se los conoce como Calificación Biológica de la Sangre; las pruebas inmuno hematológicas también se realizan antes del acto transfusional compatibilizando la unidad de sangre con el paciente receptor.

En presente manual incluye un primer capítulo donde describe la correcta realización de la Clasificación Sanguínea Sistema ABO, Prueba Directa o Hemática y Prueba Inversa o Sérica mediante la Técnica en Tubo y en Placa donde fundamentalmente se hace énfasis en la obligatoriedad de su determinación en paralelo, a fin de otorgar resultados inequívocos.

El segundo capítulo está dedicado a la Determinación del Antígeno “D” del Sistema Rh, mediante la Técnica en Tubo y en Placa, señalando los procedimientos que se deben seguir cuando se tenga la presencia de grupos Rh D negativos para la verificación de los mismos.

La Realización de las Pruebas de Compatibilidad Pre Transfusional, es considerada dentro del capítulo tercero, en el que se aclara, cuándo se deben utilizar las Pruebas Cruzadas Lado Mayor y Lado Menor y cuáles son los componentes sanguíneos para los cuales son correctamente aplicables, resaltando la importancia de la utilización de los “potenciadores de reacción”: Albumina Sérica Bovina, Solución LISS y Bromelina.

El capítulo cuarto describe la Realización del Test de Coombs Directo y su importancia en cuanto a la investigación de reacciones post transfusionales inmediatas, así como en el diagnóstico de la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido.

La Detección e Identificación de Anticuerpos Irregulares Eritrocitarios mediante la Técnica en Tubo se aborda en el capítulo quinto en el cual se presentan ejemplos que favorecerán la comprensión del mismo.

El capítulo sexto describe los procedimientos para la Determinación de Fenotipos “C,c,E,e” del Sistema Rh.

El séptimo capítulo describe los procedimientos para la Determinación del Antígeno KELL (K), mediante la Técnica en Tubo, siendo trascendental la importancia de ser detectado.

El último capítulo sobre el Control de Calidad en Inmuno hematología en el que se abordan aspectos a considerar para el control de equipamientos, técnicas, personal operativo y reactivos.

A partir de la publicación del presente documento, se dispone de procedimientos de control de calidad documentados y claramente descritos para que el personal de los Servicios de Sangre efectúe la evaluación del desempeño a cada nuevo lote de reactivos hemoclasificadores y reactivo de Coombs, verificando la conformidad de criterios mínimos aceptables que, a partir de ahora, se encuentran definidos y consensuados

a nivel nacional en lo referente a la especificidad, aidez, título y potencia, siendo muy importante resaltar que se encuentra establecido que cualquier reactivo que no cumpla con las especificaciones requeridas no debe ser utilizado, siendo indispensable contar con Registro Sanitario actualizado por la AGEMED.

El contar con un Estándar Nacional constituido por el "Manual de Procedimientos Operativos de Técnicas Inmunoematológicas efectuadas en Servicios de Sangre", es fundamental para garantizar una asistencia transfusional de calidad, cuyo cumplimiento de manera metódica, dará lugar a la obtención de resultados correctos en las técnicas aplicadas de manera uniforme para constatar la perfecta clasificación inmunoematológica de las unidades de sangre o de sus componentes, así como de los pacientes que requieran de terapia transfusional, situación que tendrá el seguimiento correspondiente a través de supervisiones a los Servicios de Sangre reconocidos en el país, además de un monitoreo y evaluación del cumplimiento del presente documento en cuanto a su aplicación correcta por los operadores, logrando con ello elevar el nivel de confianza de la población en cuanto a la seguridad y calidad sanguínea como parte del Sistema de Salud de nuestro país.

# ÍNDICE

<b>MARCO INTRODUCTORIO .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>CLASIFICACIÓN SANGUÍNEA SISTEMA ABO, PRUEBA DIRECTA O HEMÁTICA E INVERSA O SÉRICA MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO Y EN PLACA .....</b>	
1. RESUMEN .....	18
2. ALCANCE .....	18
3. INTRODUCCIÓN .....	18
4. DEFINICIONES IMPORTANTES .....	20
5. DESARROLLO .....	21
6. TÉCNICAS .....	21
6.1. DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO SISTEMA ABO EN TUBO .....	22
6.1.1. ACCIONES PRELIMINARES .....	22
6.1.2. PROCEDIMIENTO .....	22
6.1.3. INTERPRETACIÓN .....	24
6.1.4. COMENTARIOS .....	25
6.2. DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO SISTEMA ABO EN PLACA DE VIDRIO O PLACAS PLÁSTICAS CON ORIFICIOS CÓNCAVOS .....	25
6.2.1. ACCIONES PRELIMINARES .....	25
6.2.2. PROCEDIMIENTO .....	25
6.2.3. COMENTARIOS .....	26
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO “D” DEL SISTEMA Rh MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO Y EN PLACA .....</b>	
1. RESUMEN .....	29
2. ALCANCE .....	29
3. INTRODUCCIÓN .....	29
4. DEFINICIONES IMPORTANTES .....	30
4.1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL ANTÍGENO D .....	30
4.2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS REACTIVOS ANTI D .....	31
4.3. SUERO RHESUS CONTROL .....	31
5. DESARROLLO .....	32
6. TÉCNICAS .....	32
7. ACCIONES PRELIMINARES .....	33
8. PROCEDIMIENTO .....	33
9. INTERPRETACIÓN .....	34
9.1. DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO “D” MEDIANTE TÉCNICA EN PLACA DE VIDRIO O PLACA PLÁSTICA CON ORIFICIOS CÓNCAVOS .....	35
9.1.1. ACCIONES PRELIMINARES .....	36
9.1.2. PROCEDIMIENTO .....	36
9.1.3. INTERPRETACIÓN .....	37
9.1.4. INFORME DE RESULTADOS .....	37
9.1.5. COMENTARIOS .....	37
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD PRE TRANSFUSIONAL: PRUEBAS CRUZADAS EN MEDICINA TRANSFUSIONAL .....</b>	
1. RESUMEN .....	38
2. ALCANCE .....	38
3. INTRODUCCIÓN .....	38
4. DEFINICIONES IMPORTANTES .....	41
4.1. CONCEPTO GENERAL DE PRUEBAS CRUZADAS .....	41
4.2. IMPORTANCIA DE LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS CRUZADAS .....	41
4.3. PRUEBA MAYOR, (M) o DEL DONADOR .....	42
4.4. PRUEBA MENOR (m) o DEL RECEPTOR .....	42
4.5. PRUEBA AUTOTESTIGO (AT) .....	42
4.6. TRANSFUSIÓN INMEDIATA .....	42

4.7. TRANSFUSIÓN URGENTE .....	42
4.8. TRANSFUSIÓN PROGRAMADA .....	43
4.9. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES EN EL RECEPTOR: .....	43
4.10. EJECUCIÓN DE LA PRUEBA CRUZADA .....	43
4.11. UTILIDAD DE CÉLULAS CONTROL DE COOMBS EN SERVICIOS DE SANGRE.....	44
5. DESARROLLO.....	44
6. TÉCNICAS.....	46
7. ACCIONES PRELIMINARES.....	46
8. PROCEDIMIENTO PRUEBA CRUZADA LADO MAYOR.....	47
9. INTERPRETACIÓN .....	48
10. PROCEDIMIENTO PRUEBA CRUZADA LADO MENOR.....	49
11. INTERPRETACIÓN.....	50
12. INFORME DE RESULTADOS.....	51
13. COMENTARIOS.....	51

#### **CAPÍTULO 4**

##### **REALIZACIÓN DEL TEST DE COOMBS DIRECTO O PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA DIRECTA (PAD) MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO .....**

1. RESUMEN .....	52
2. ALCANCE.....	52
3. INTRODUCCIÓN.....	52
4. DEFINICIONES IMPORTANTES .....	54
4.1. ANTICUERPO MONOCLONAL .....	54
4.2. CLONA .....	54
4.3. REACTIVO ANTI INMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI Ig G - ANTI C <sub>3d</sub> : REACTIVO DE COOMBS.....	54
4.4. CONTROL POSITIVO COOMBS.....	55
4.5. CONTROL NEGATIVO COOMBS.....	55
5. DESARROLLO.....	55
6. TÉCNICAS.....	55
7. ACCIONES PRELIMINARES.....	56
8. PROCEDIMIENTO.....	56
9. INTERPRETACIÓN .....	58
10. INFORME DE RESULTADOS.....	58
11. COMENTARIOS.....	58

#### **CAPÍTULO 5**

##### **DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES ERITROCITARIOS MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO .....**

1. RESUMEN .....	59
2. ALCANCE.....	59
3. INTRODUCCIÓN.....	60
4. DEFINICIONES IMPORTANTES .....	63
4.1. ALOANTICUERPO.....	63
4.2. AUTO ANTICUERPO.....	63
4.3. ANTICUERPOS REGULARES .....	64
4.4. ANTICUERPOS IRREGULARES .....	64
4.5. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES .....	64
4.6. IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES - PANEL CELULAR .....	64
5. DESARROLLO.....	65
6. TÉCNICAS .....	67
7. ACCIONES PRELIMINARES.....	67
7.1. PROCEDIMIENTO DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES.....	68
7.1.1. TÉCNICAS .....	71
7.1.2. ACCIONES PRELIMINARES .....	71
7.2. PROCEDIMIENTO IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES .....	71
8. EJEMPLO DE INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	74
9. INTERPRETACIÓN FINAL .....	74

## **CAPÍTULO 6**

<b>DETERMINACIÓN DE FENOTIPOS “C, c, E, e” DEL SISTEMA Rh MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO</b> .....	76
1. RESUMEN .....	76
2. ALCANCE .....	76
3. INTRODUCCIÓN .....	77
4. DEFINICIONES IMPORTANTES .....	78
4.1. DEFINICIÓN DE ANTÍGENO DESDE LA VISIÓN INMUNOHEMATOLÓGICA .....	78
4.2. FACTORES QUE AFECTAN LA REACCION ANTÍGENO ANTICUERPO “IN VITRO” .....	78
4.3. ANTICUERPOS .....	78
4.4. ANTÍGENOS DEL SISTEMA Rh .....	78
4.5. INMUNOGENICIDAD (CAPACIDAD ANTIGÉNICA) .....	78
5. DESARROLLO .....	79
6. TÉCNICAS .....	79
7. ACCIONES PRELIMINARES .....	79
8. PROCEDIMIENTO .....	79
9. INTERPRETACIÓN .....	80
10. INFORME DE RESULTADOS .....	81
11. COMENTARIOS .....	81

## **CAPÍTULO 7**

<b>DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO KELL (K) MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO</b> .....	82
1. RESUMEN .....	82
2. ALCANCE .....	83
3. INTRODUCCIÓN .....	83
4. DEFINICIONES IMPORTANTES .....	84
4.1. REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO .....	84
4.2. REACTIVOS DE TIPIFICACIÓN MONOCLONAL .....	84
4.3. POLIETILENGLICOL .....	84
5. DESARROLLO .....	85
6. TÉCNICAS .....	85
7. ACCIONES PRELIMINARES .....	85
8. PROCEDIMIENTO .....	85
9. INTERPRETACIÓN .....	86
10. INFORME DE RESULTADOS .....	86
11. COMENTARIOS .....	86

## **CAPÍTULO 8**

<b>CONTROL DE CALIDAD EN INMUNOHEMATOLOGÍA</b> .....	88
1. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL CONTROL DE EQUIPAMIENTO .....	88
2. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL CONTROL DE TÉCNICAS .....	88
3. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL CONTROL DEL PERSONAL OPERATIVO .....	89
4. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL CONTROL DE LOS REACTIVOS .....	89
5. PRINCIPALES REACTIVOS UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA .....	89
5.1. CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA .....	90
5.2. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE SUEROS HEMOCLASIFICADORES	
ANTI-A, ANTI-B, ANTI-AB, ANTI-D, RHESUS CONTROL .....	90
5.2.1. AVIDEZ .....	91
5.2.2. ESPECIFICIDAD .....	91
5.2.3. TITULACIÓN .....	92
5.2.4. POTENCIA .....	92
6. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL REACTIVO DE COOMBS .....	93
6.1. TÍTULO .....	93
6.2. ESPECIFICIDAD .....	93
7. CONTROL DE CALIDAD DIARIO DE LOS REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES, REACTIVO DE COOMBS Y CELULAS A, B, O .....	94
8. CONTROL DE CALIDAD DE LA SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA SSFE .....	95
9. CONTROL DE CALIDAD DE LA SOLUCIÓN DE BAJA FUERZA IÓNICA LISS .....	95
10. CONSIDERACIONES SOBRE EL DESCARTE DE LOS REACTIVOS .....	95

BIBLIOGRAFÍA .....	97
APÉNDICE 1	
PREPARACIÓN DE CÉLULAS TESTIGO A, B, O UTILIZADAS PARA LA CONFIRMACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO ABO MEDIANTE PRUEBA INVERSA O SÉRICA .....	101
APÉNDICE 2	
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MODIFICADA DE ALSEVER PARA CONSERVACION DE HEMATÍES .....	103
APÉNDICE 3	
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA TAMPONADA A pH 7,2 CON BUFFER FOSFATOS PBS .....	104
APÉNDICE 4	
PREPARACIÓN DE CÉLULAS CONTROL DE COOMBS (CCC).....	106
APÉNDICE 5	
PREPARACIÓN DE PANELES CELULARES ARTESANALES “MADE IN HOUSE” O “HECHOS EN CASA” .....	108
APÉNDICE 6	
CARACTERÍSTICAS DE ANTICUERPOS IRREGULARES DE SIGNIFICANCIA CLÍNICA .....	111
APÉNDICE 7	
EJEMPLO 1 DE INTERPRETACIÓN DE RESULTADO DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES .....	112
APÉNDICE 8 .....	
EJEMPLO 2 DE INTERPRETACIÓN DE RESULTADO DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES .....	113
APÉNDICE 9	
PRUEBA D <sup>U</sup> - D VARIANTE PARA CASOS EN LOS QUE SE TIENE UN RESULTADO Rh D NEGATIVO .....	114
APÉNDICE 10	
10.1 ANTICUERPOS QUE HABITUALMENTE PRODUCEN ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO (EHRN) .....	116
10.2 ANTICUERPOS QUE RARAMENTE PRODUCEN ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO (EHRN) .....	117
APÉNDICE 11	
PLANILLA DE REPORTE DE CONTROL DE CALIDAD DIARIO DE REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES, REACTIVO DE COOMBS Y CÉLULAS A,B,O .....	118
APÉNDICE 12 .....	
TÉCNICA DE LAVADO Y DESINFECCIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO CONTROL DE CALIDAD DEL PROCEDIMIENTO DE LAVADO DEL MATERIAL .....	119
APÉNDICE 13	
EJEMPLO DE PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE HEMATÍES AL 5% .....	121
APÉNDICE 14	
Tabla N° 4 INTERPRETACIÓN DE POSITIVIDAD O NEGATIVIDAD SEGÚN GRADOS DE INTENSIDAD DE LA REACCIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN.....	122
ANEXO 1 .....	123
LISTADO DE TABLAS.....	127
LISTADO DE APÉNDICES.....	128
LISTADO DE GRÁFICOS FOTOGRAFÍAS Y ANEXOS.....	130
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	132
DEFINICIONES ADICIONALES EN FORMATO BREVE .....	134
ANEXO EDITORIAL	

# MARCO INTRODUCTORIO

## 1. Sistema Nacional de Sangre

El Sistema Nacional de Sangre está constituido por el Programa Nacional de Sangre del Ministerio de Salud, las áreas de Medicina Transfusional de los Servicios Departamentales de Salud y la Red de Servicios de Sangre formada actualmente por 17 Bancos de Sangre y 95 Servicios de Transfusión.

## 2. Objetivo del Sistema Nacional de Sangre

Siendo que las transfusiones sanguíneas se han identificado como una de las ocho intervenciones clave capaces de salvar vidas en los centros asistenciales que ofrecen servicios de atención obstétrica y de emergencia. Constituyéndose en un servicio esencial para la cobertura universal de salud ya que contribuyen a salvar millones de vidas y a mejorar la salud de las personas que las necesitan. Así mismo, son necesarias para la atención de niños y pacientes con anemias graves, pacientes con hemoglobinopatías, personas que sufren lesiones por accidentes, enfermos de cáncer, personas que se someten a cirugías mayores y otras intervenciones quirúrgicas, como trasplantes, pacientes con enfermedades crónicas relacionadas con el envejecimiento, como son los sangrados resultantes de problemas vasculares y cirugías ortopédicas, entre otros.

El Sistema Nacional de Sangre tiene por objetivo lograr el acceso universal a las transfusiones de sangre y los hemocomponentes seguros.

## 3. Características del Sistema Nacional de Sangre

Son características especiales del Sistema Nacional de Sangre las mencionadas a continuación:

- **Control:** Las experiencias trágicas de algunos países han demostrado que el sector de la transfusión es delicado, por lo que no es razonable que este campo terapéutico tan importante, cuyos productos son capaces de provocar efectos secundarios a corto, mediano y largo plazo, pueda estar descentralizado y confiado a escalones intermedios de los Sistemas de Salud, con ausencias de directrices únicas y de normas homogéneas. La necesidad de una única autoridad a nivel nacional que planifique y dicte normas es incuestionable.
- **Seguridad:** La sangre, los hemocomponentes y también los hemoderivados son productos terapéuticos de origen humano, por ello que los Bancos de Sangre tienen la misma responsabilidad legal, ética y moral de operar con la rigurosidad que la industria farmacéutica, la cual garantiza las dosis y calidad terapéutica de los productos elaborados.
- **Economía:** Se debe procurar lograr el tratamiento más eficiente a un costo equilibrado y racional. Esto debido a que la evaluación es realizada desde el campo de la obtención y elaboración de componentes sanguíneos, semejante en muchos aspectos a los procesos industriales, con un análisis basado en economías de escala, derivadas de la concentración de recursos, donde los pequeños Bancos de Sangre son ineficientes desde el punto de vista económico y de la calidad. Por lo que los Bancos de Sangre tienen una gestión administrativa orientada a la autosostenibilidad, mediante la recuperación de costos.

#### 4. Programa Nacional de Sangre

El Programa Nacional de Sangre (PNS) fue creado por Resolución Ministerial N° 0345 el 26 de junio del 2002; inicialmente dependiente de la Dirección General de Control y Prevención de Enfermedades y actualmente de la Dirección General de Servicios de Salud, del Ministerio de Salud, como el ente rector y centralizador de la Medicina Transfusional, y como el encargado de elaborar políticas, estandarizar criterios, normar, monitorear y controlar las actividades de la especialidad en el país; habiéndose planteado el desarrollo de tres grandes componentes o líneas de trabajo:

- Desarrollo del Sistema Nacional de Sangre y la Red Nacional de Servicios de Sangre: Tiene como objetivo lograr que los Servicios de Sangre trabajen coordinadamente, desde el punto de vista técnico, administrativo y asistencial. Cumpliendo la normativa legal vigente con la supervisión y apoyo de los SEDES correspondientes.
- Garantía de la Calidad, Calificación biológica y Hemovigilancia: Tiene entre sus objetivos implantar y desarrollar un Sistema Nacional de la Calidad en toda la cadena transfusional, organizar y desarrollar un Programa de Inspección, así como implementar la Hemovigilancia que abarque a todos los Servicios de Sangre del país.
- Donación Voluntaria y Altruista de Sangre: Tiene el objetivo de fomentar la práctica de la Donación Voluntaria y Altruista de Sangre en la población boliviana.

Además comprende una actividad que es la de capacitación y educación continua en Medicina Transfusional estrechamente relacionada con cada una de estas líneas de trabajo.

#### 5. Servicios Departamentales de Salud

El Área de Medicina Transfusional de los SEDES tiene como principal tarea hacer cumplir la normativa legal vigente, articulando la Red de Servicios de Sangre del Departamento respectivo, garantizar el acceso a Sangre Segura y ejecutar sanciones en los casos que amerite.

#### 6. Bancos de Sangre

Los Bancos de Sangre son instituciones especializadas, con registro y licencia de funcionamiento del Servicio Departamental de Salud correspondiente y acreditación por el Ministerio de Salud, están encargados de la promoción de la donación voluntaria de sangre, reclutamiento, fidelización y registro de donantes; extracción, procesamiento, almacenamiento, conservación, control de calidad y distribución de sangre humana destinada a transfusiones o investigaciones en forma total o de sus componentes separados, sin fines de lucro; es la institución que abastece de Sangre Segura a Servicios de Transfusión, del ámbito Público, Seguridad Social y Privado. Además forma parte de la Hemovigilancia.

Los Bancos de Sangre de Referencia Departamental son considerados establecimientos de salud de tercer nivel.

#### 7. Servicios de Transfusión

Los Servicios de Transfusión son servicios intrahospitalarios con objetivos, recursos humanos insumos, etc. diferentes al laboratorio del hospital donde se encuentra instalado; su función principal es realizar estudios inmunohematológicos, pruebas pre transfusionales (compatibilidad entre el paciente y la unidad a transfundirse), entregar los hemocomponentes a transfundir o en casos específicos instalar la transfusión solo si cuentan con personal de enfermería; son los responsables de asesorar, aplicar y evaluar el impacto médico adecuado y racional de las transfusiones de sangre y componentes, son los encargados de impulsar el establecimiento de los Comités de Medicina Transfusional del hospital donde están instalados, además son parte activa en la investigación de los efectos adversos de la transfusión

y gestionan su stock en coordinación con un Banco de Sangre del cual se abastece, efectuando la trazabilidad de los mismos.

Los integrantes del Sistema Nacional de Sangre comparten fines comunes para lograr el acceso a Sangre Segura, por lo que la centralización de Bancos de Sangre y la incorporación de Servicios de Transfusión en los hospitales de 2do, 3er y 4to nivel son de vital importancia para Bolivia, para su consecución es trascendental el trabajo integral, fraternal, solidario y colaborado de las autoridades centrales, departamentales y municipales, la participación de la comunidad en general, de las empresas, industrias, asociaciones civiles y sobre todo del personal técnico y administrativo de los servicios de sangre que trabajan en Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión.

## **8. Expectativa**

De acuerdo a las experiencias internacionales en desarrollo de Medicina Transfusional, se encuentran diversas formas de organización de los Sistemas de Sangre y la tendencia actual es, hacia sistemas centralizados. Los sistemas nacionales de sangre que se han establecido en el mundo en los últimos años y que tienen logros trascendentes, procuran centralizar la colecta de sangre, la producción y el almacenamiento de hemocomponentes en Bancos de Sangre de mayor escala, con tecnología avanzada. Es así que para aprovechar los avances científicos y tecnológicos de la Medicina Transfusional es imprescindible basar el sistema en centros que procesen al menos 5000 donaciones de sangre anuales y que distribuyan la sangre y hemocomponentes a los Servicios de Transfusión.

# CAPÍTULO 1

## CLASIFICACIÓN SANGUÍNEA SISTEMA ABO, PRUEBA DIRECTA O HEMÁTICA E INVERSA O SÉRICA MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO Y EN PLACA

### 1. RESUMEN

El presente documento pretende aportar las directrices necesarias para realizar una adecuada clasificación de grupos sanguíneos del sistema ABO, contribuyendo a uniformar los procesos y procedimientos que se realizan en los diferentes Servicios de Sangre de nuestro país, tomando en cuenta que, no todas las instituciones, cuentan con la misma tecnología, infraestructura, personal, etc., sin embargo lo que no puede variar en ninguna de ellas, es la forma lógica, coherente y pertinente de realizar las técnicas.

### 2. ALCANCE

Las presentes directrices deben ser aplicadas en Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión donde se realiza la determinación del grupo sanguíneo Sistema ABO a: personas que tienen la intención de donar sangre, a quienes hacen efectiva la donación y se constituyen en donantes de sangre, así como también a pacientes/receptores de transfusiones sanguíneas.

### 3. INTRODUCCIÓN

El avance de la ciencia médica ha sido y es constante y firme. Hay descubrimientos que condicionaron un salto cualitativo en el “quehacer” de los Servicios de Sangre; tal es el caso del descubrimiento del sistema ABO por Landsteiner y Alfredo Von de Castello en colaboración con Adriano Sturli en 1900-1902.<sup>(1)</sup>

A más de un siglo de este evento, seguimos valorando su vigencia, ya que junto al sistema Rh son los más importantes para la transfusión sanguínea y el trasplante.

El sistema ABO es el más relevante, seguido del Rh por su potencia inmunogénica.

De manera general, los antígenos eritrocitarios se han clasificado en sistemas, colecciones y grupos.

El equipo de trabajo de la Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre (ISBT, en inglés *International Society of Blood Transfusion*) ha establecido un sistema estandarizado para clasificar los antígenos de los grupos sanguíneos.<sup>(2)</sup>

Expertos de todo el mundo se reúnen cada dos años para analizar si se mantienen terminologías, y para estandarizar una nomenclatura numérica para facilitar la automatización de los antígenos de los eritrocitos.<sup>(3)</sup>

Una denominación de seis dígitos indica la distinción de cada grupo sanguíneo. Los primeros tres números identifican el sistema del grupo sanguíneo y los últimos tres números identifican la especificidad individual.

Para la ISBT, cada sistema de grupo sanguíneo debe ser genéticamente distinto.

La asignación de antígenos a un sistema específico de grupo sanguíneo depende de relaciones genéticas, serológicas y bioquímicas entre los antígenos.

Las colecciones (llamadas series 200) son sistemas de antígenos relacionados para los cuales no existe aún información genética completa.

Otros antígenos aislados de alta incidencia (serie 901) o baja incidencia (serie 700) se describen juntos hasta que la información genética esté disponible.<sup>(4)</sup>

A continuación se citan los 36 sistemas de grupos sanguíneos que actualmente están descritos por la ISBT:

**Tabla N° 1.** Actualización de los Sistemas de Grupos Sanguíneos publicada por la Sociedad Internacional de la Transfusión Sanguínea en Febrero de 2017

NUMERACIÓN ISBT	NOMBRE DEL SISTEMA	SÍMBOLO DEL SISTEMA
001	ABO	ABO
002	MNS	MNS
003	P	P
004	Rh	RH
005	Lutheran	LU
006	Kell	KEL
007	Lewis	LE
008	Duffy	FY
009	Kidd	JK
010	Diego	DI
011	Yt	YT
012	XG	XG
013	Scianna	SC
014	Dombrock	DO
015	Colton	CO
016	Landsteiner-Wiener	LW
017	Chido	CH
018	Hh	H
019	XK	XK
020	Gerbich	GE
021	Cromer	CROM
022	Knops	KN
023	Indian	IN
024	Ok	OK
025	Raph	RAPH
026	JMH	JMH
027	Ii	I
028	Globoside	GLOB
029	GIL	GIL
030	Rh-associated glycoprotein	RHAg
031	Forssman	FORS
032	Langereis[7]	LAN
033	Junior	JR
034	Vel	VEL
035	CD59	CD59
036	AUG1 AUG2	

Fuente: "International Society for Blood Transfusion (ISBT) Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens, Terminology Home Page", Actualización: Febrero de 2017 en: <http://www.isbtweb.org><sup>8</sup>

La HGNC *Human Gene Nomenclature Committee*, en español: Comité de Nomenclatura de los Genes Humanos, tiene la misión de aprobar un nombre único para cada uno de los genes humanos conocidos, basándose en consultas a expertos, se encargan de aprobar símbolos y nombres para proteínas codificadoras de genes, a fin de estandarizar la nomenclatura a nivel mundial.<sup>(4)</sup>

Una adecuada clasificación sanguínea ABO tiene como objetivo determinar la presencia de antígenos y anticuerpos del Sistema ABO en sangre humana.

El sistema ABO posee 4 fenotipos que están determinados por la presencia o ausencia de antígenos A y B sobre los Glóbulos Rojos y por la presencia o ausencia de anticuerpos Anti-A y Anti-B en el suero.

Existe una relación recíproca entre antígenos en los hematíes y anticuerpos en suero, esta característica permite que al realizar la prueba directa o hemática así como la prueba sérica o inversa, se disponga de una contraprueba para la clasificación ABO, debiendo corresponder sin lugar a error el antígeno encontrado con los anticuerpos demostrados para poder determinar el grupo sanguíneo, caso contrario; estaríamos frente a una discrepancia y no podríamos dar un resultado mientras ésta no sea resuelta.

No debemos olvidar que en recién nacidos debido a que los anticuerpos tardan en desarrollarse entre los 3 a 6 meses de vida, la realización de la prueba inversa en ellos debe postergarse idealmente hasta después de este periodo. Según el Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre la prueba sérica debería realizarse a partir de los 4 meses de edad.<sup>(5)</sup>

#### 4. DEFINICIONES IMPORTANTES

##### FENOTIPOS DEL SISTEMA ABO

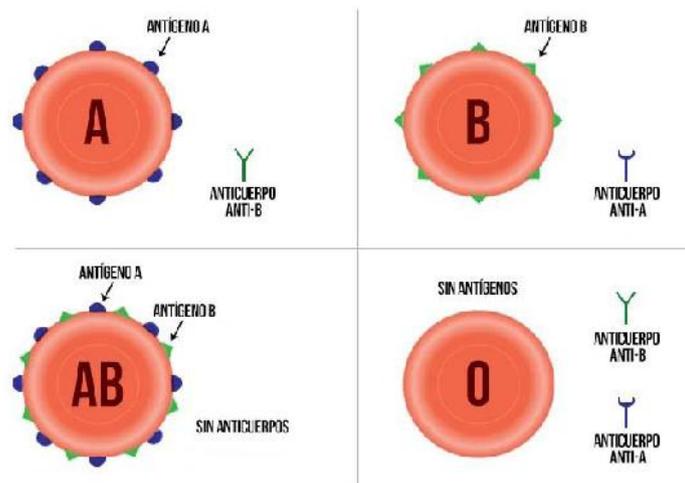
El sistema ABO consta de 4 fenotipos principales:

**Tabla N° 2.** Fenotipos del Sistema ABO: Antígenos y Anticuerpos

GRUPO SANGUÍNEO	ANTÍGENOS EN EL GLÓBULO ROJO	ANTICUERPOS EN EL SUERO O PLASMA
O	NINGUNO	ANTI-A y ANTI-B
A	A	ANTI-B
B	B	ANTI-A
AB	A y B	NINGUNO

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

**Gráfico N° 1.** Presencia de antígenos en la membrana del hematíe y las correspondientes isoaglutininas de grupo sanguíneo Anti-A y Anti-B



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

## 5. DESARROLLO

### A) MUESTRA

La muestra adecuada para la clasificación ABO, es sangre completa con anticoagulante EDTA<sub>K<sub>3</sub></sub>, para la prueba directa y sangre sin anticoagulante en tubo seco para la prueba inversa. De manera alternativa, el plasma también podría utilizarse para realizar la prueba inversa.

### B) REACTIVOS

Se necesitaran sueros hemoclasificadores que contengan anticuerpos monoclonales Anti-A, Anti-B, Anti-AB.

En cuanto a Glóbulos Rojos testigos para la prueba inversa se requieren glóbulos: A, B y O. Lo adecuado es preparar una suspensión al 5% en solución salina fisiológica estéril SSFE (Ver Apéndice 1), o en Solución Alsever (Ver Apéndice 2). Los glóbulos rojos también podrán ser adquiridos de manera comercial.

## 6. TÉCNICAS

La técnica realizada en tubo es una alternativa en la cual, siendo el soporte de la reacción un tubo de ensayo, tiene lugar la determinación de grupos sanguíneos del sistema ABO.

En el caso de las técnicas en placa de vidrio, placa plástica con orificios cóncavos, micro placa o micro aglutinación en columna con partículas de gel, lo único que cambia es el soporte donde tiene lugar la reacción antígeno-anticuerpo.

La prueba de laboratorio para la determinación de grupo sanguíneo en tubo está constituida por dos variantes: la prueba directa o hemática y la prueba inversa o sérica.

Se efectúa confrontando los hematíes del donante o receptor (en el Banco de Sangre o Servicio de Transfusión respectivamente) con anticuerpos monoclonales Anti-A, Anti-B y Anti-AB.

La aglutinación o no de los hematíes ensayados frente a cada uno de los reactivos indica la presencia o ausencia de los correspondientes antígenos, constituyendo la prueba directa o hemática.

Así también al confrontar los hematíes de fenotipo conocido A, B y O con el suero o plasma de los donantes o receptores, se determina la presencia de los anticuerpos de grupo sanguíneo llamados isoaglutininas Anti-A y Anti-B, constituyendo la prueba inversa o sérica.

Se debe mencionar que los Servicios de Sangre que dispongan de tarjetas para realizar la metodología de micro aglutinación en columna con partículas de gel, ésta constituye una alternativa al igual que la técnica en micro placa, siendo primordial que cada institución elabore sus Procedimientos Operativos Estandarizados.

Cada Servicio de Sangre, en función al volumen de muestras que procesa, a la posibilidad de adquisición de centrifugas para tubos de ensayo, centrifugas para micro placas, así como la adquisición del sistema de microaglutinación en columna con partículas de gel, deberá decidir cuál tecnología puede brindar resultados confiables con la calidad esperada dentro de la lógica de la economía y sustentabilidad del servicio.

## 6.1. DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO SISTEMA ABO EN TUBO

### 6.1.1. ACCIONES PRELIMINARES

- 🔥 Atemperar los reactivos hemoclasificadores Anti-A, Anti-B, Anti-AB y las Células ABO.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario de Reactivos Hemoclasificadores y Células Reactivas.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica.
- 🔥 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.

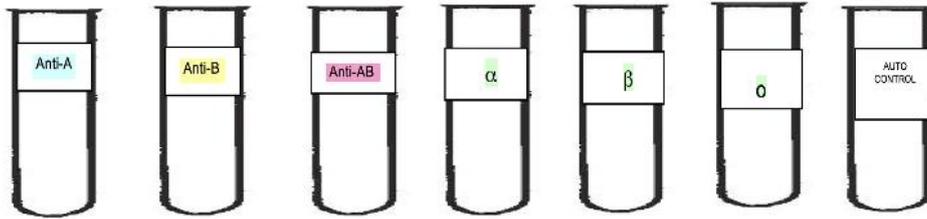
### 6.1.2. PROCEDIMIENTO

Si bien es cierto que existen diferentes marcas de reactivos hemoclasificadores, las técnicas fundamentalmente siguen los mismos pasos, por tanto se describe el siguiente procedimiento como una posibilidad que podría adaptarse a diferentes líneas comerciales:

- a) Separar el suero/plasma de los hematíes mediante la centrifugación de los tubos de ensayo que contienen la muestra, de acuerdo al tiempo y número de revoluciones que se hubieran estandarizado en el Servicio de Sangre, (Ej. 5-10 minutos a 2.500 - 3500 rpm).
- b) Lavar los hematíes mediante tres ciclos de lavado de 3 minutos a 2,500 rpm y preparar la suspensión de hematíes al 5%, ó a la concentración que indique el fabricante para la técnica en tubo, utilizando en caso de ser posible tubos de ensayo nuevos o lavados y esterilizados mediante calor seco de manera correcta (Ver Apéndice 12).

Los hematíes podrán estar suspendidos en Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE) a 0,9% o en SSFE tamponada a pH 7,2 +/- 0,2 con Tampón Buffer Fosfatos PBS, denominadas "SSFE" y "SSFE tamponada con PBS" de aquí en adelante. (Para su preparación ver el Apéndice 3).

- c) Una vez que se han preparado las suspensiones celulares correctas, según el ejemplo establecido en el Apéndice 13, se debe preparar para cada muestra la siguiente batería de tubos de ensayo rotulándolos como se observa en el siguiente gráfico:



**Gráfico N° 2.** Preparación de batería de tubos de ensayo y rotulación de los mismos para la realización de la prueba de grupo sanguíneo Sistemas ABO: técnicas directa e inversa

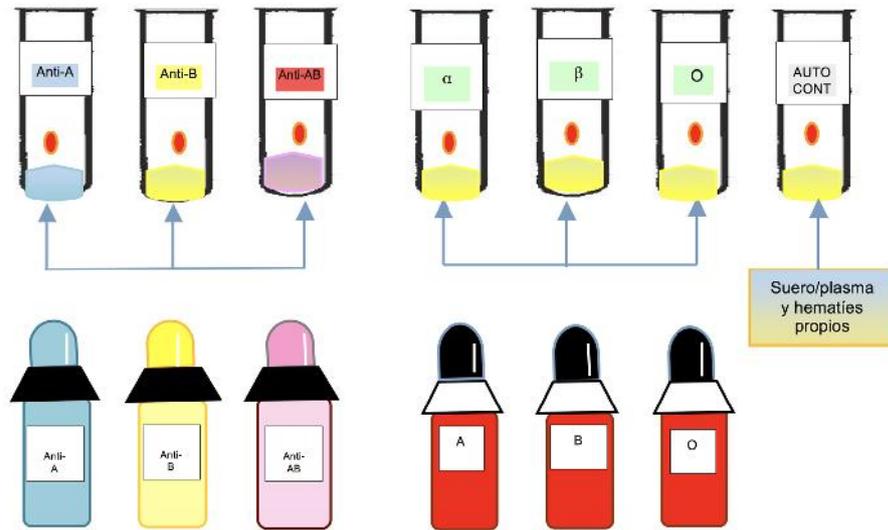
La siguiente tabla explica el manejo y la utilidad de cada uno de los tubos de ensayo y las reacciones que tienen lugar en cada caso:

**Tabla N° 3** Descripción de los tubos de ensayo utilizados en las Pruebas Directa e Inversa y los reactantes que contienen para que se originen las reacciones de Hemaglutinación

TUBO	REACTIVO, SUERO O PLASMA DE DONANTES O DE PACIENTES QUE SE COLOCA EN EL TUBO DE ENSAYO	HEMATÍES DE DONANTES O DE PACIENTES QUE SE COLOCA EN EL TUBO DE ENSAYO	UTILIDAD
A	ANTI-A	SUSPENSIÓN DE HEMATIES AL 5%	DETERMINACIÓN DEL ANTIGENO "A" EN EL HEMATIE
B	ANTI-B	SUSPENSIÓN DE HEMATIES AL 5%	DETERMINACIÓN DEL ANTIGENO "B" EN EL HEMATIE
AB	ANTI-AB	SUSPENSIÓN DE HEMATIES AL 5%	DETERMINACIÓN DEL ANTIGENO "A" Y "B" EN EL HEMATIE
CÉLULAS A	MUESTRA DE SUERO/PLASMA	HEMATÍES CONOCIDOS GRUPO A	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-A EN EL SUERO O PLASMA
CÉLULAS B	MUESTRA DE SUERO/PLASMA	HEMATÍES CONOCIDOS GRUPO B	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-B EN EL SUERO O PLASMA
CÉLULAS O	MUESTRA DE SUERO/PLASMA	HEMATÍES CONOCIDOS GRUPO O	DETERMINACIÓN DE POSIBLES ANTICUERPOS IRREGULARES
AUTO CONTROL	MUESTRA DE SUERO/ PLASMA DEL DONANTE O DEL PACIENTE	HEMATÍES DEL DONANTE O DEL PACIENTE	DETERMINACIÓN DE POSIBLES AUTO ANTICUERPOS

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

- d) Toda vez que se han transferido 50 microlitros de las suspensiones celulares preparadas a los tubos marcados Anti-A, Anti-B, Anti-AB y 50 microlitros (una gota dispensada con el gotero de cada reactivo comercial al tubo que corresponda), se debe mezclar los tubos ligeramente y proceder a colocarlos de manera equilibrada en la centrifuga incluyendo el tubo de auto control del donante o paciente, según sea el caso, incluyendo el suero y hematíes propios.
- e) En los tubos marcados como células alfa, células beta y células O, se deben dispensar 100 ul del suero del donante o del paciente en quien se está investigando el grupo sanguíneo y posteriormente dispensar una gota de células de fenotipo conocido A al tubo alfa, una gota de células de fenotipo conocido B al tubo beta y una gota de células O al tubo marcado con la letra O. Se debe mezclar los tubos ligeramente y proceder a colocarlos de manera equilibrada en la centrifuga.



**Gráfico N° 3.** Realización de la Técnica de grupo sanguíneo, Sistemas ABO: técnicas directa e inversa.

- f) Proceder a centrifugar según el tiempo y revoluciones por minuto establecidas por el fabricante y que deberán estar bien descritas en el inserto, una alternativa sería centrifugar a 1000 rpm durante un minuto.
- g) Observar siempre con ayuda de la luz de un aglutinoscopio la presencia de aglutinación o hemólisis, registrar los resultados obtenidos de acuerdo a la tabla de intensidad de reacción que se observa en el Apéndice 14.

### 6.1.3. INTERPRETACIÓN

La asignación del grupo sanguíneo deberá realizarse de acuerdo a los resultados de la siguiente tabla:

**Tabla N° 5** Interpretación del grupo sanguíneo en el Sistema ABO, según los resultados de la Prueba Directa y la Prueba Inversa

PRUEBA DIRECTA REACCIÓN DE HEMATÍES CON:			PRUEBA INVERSA REACCIÓN DE SUERO O PLASMA CON:				GRUPO SANGUÍNEO
REACTIVO ANTI-A	REACTIVO ANTI-B	REACTIVO ANTI-AB	GLÓBULOS ROJOS "A"	GLÓBULOS ROJOS "B"	GLÓBULOS ROJOS "O"	GLÓBULOS ROJOS PROPIOS (AUTO CONTROL)	INTERPRETACIÓN
NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	GRUPO SANGUÍNEO O
POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	GRUPO SANGUÍNEO A
NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	GRUPO SANGUÍNEO B
POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	GRUPO SANGUÍNEO AB
					POS	NEG	POSIBLE ANTICUERPO IRREGULAR
					NEG	POS	POSIBLE AUTO ANTICUERPO

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud.

**POS:** EXISTENCIA DE AGLUTINACIÓN DE 1+, 2+, 3+, 4+ ó hemólisis

**NEG:** NO EXISTE NINGÚN GRADO DE AGLUTINACIÓN

**NOTA.-** LOS TUBOS MARCADOS COMO "AUTO CONTROL" Y EL TUBO "O" PERMITEN DETERMINAR LA POSIBLE PRESENCIA DE AUTO Y ALO ANTICUERPOS; ANTE ESTE TIPO DE RESULTADOS, REALIZAR LAS TÉCNICAS DE COOMBS DIRECTO Y DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES.

#### 6.1.4. COMENTARIOS

Cualquier otra combinación de resultados constituye una discrepancia, que deberá ser estudiada y aclarada antes de reportar el grupo sanguíneo.

### 6.2. DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO SISTEMA ABO EN PLACA DE VIDRIO O PLACAS PLÁSTICAS CON ORIFICIOS CÓNCAVOS

Esta técnica únicamente deberá ser utilizada como “técnica preliminar” en los primeros pasos de la cadena transfusional, vale decir al momento de realizar Hematocrito/Hemoglobina a los posibles donantes de sangre, momento en el cual, simultáneamente el grupo sanguíneo se realiza, así como también en las situaciones siguientes:

a) En los Bancos de Sangre:

- ✓ Al momento de la reclasificación y verificación de grupos sanguíneo ABO y factor Rh inmediatamente después de que la unidad ha sido extraída.
- ✓ Antes de realizar el despacho del paquete globular o sangre total a los diferentes Servicios de Transfusión.

b) En los Servicios de Transfusión:

- ✓ Para confirmar el grupo sanguíneo que está referido en la etiqueta del paquete globular o sangre total.

c) En la cabecera de cama del receptor.

Por factores de tiempo en una urgencia podría ser conveniente realizar la hemoclasificación mediante técnica en placa, pero en definitiva, es preferible utilizar la técnica en tubo debido a que presenta mayor sensibilidad.

#### 6.2.1. ACCIONES PRELIMINARES

- 🔴 Atemperar los reactivos
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario de Reactivos Hemoclasificadores
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica (existen reactivos que requieren que se trabaje con suspensiones de hematíes y otros con sangre entera)
- 🔴 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada

#### 6.2.2. PROCEDIMIENTO

- a) Desengrasar con una torunda empapada con alcohol una placa de vidrio o de plástico limpia, esperar a que seque o secar con una torunda de algodón seco.
- b) Dispensar 50 ul de los hematíes en estudio (en suspensión según instrucciones del fabricante o directamente de la muestra; es decir sangre entera) en cada uno de los tres espacios destinados para Anti-A, Anti-B y Anti-AB de la placa de vidrio o de los orificios cóncavos de la placa plástica.

- c) Proceder a dispensar una gota de los reactivos Anti-A, Anti-B y Anti-AB en los lugares asignados utilizando los goteros.
- d) Homogeneizar utilizando un palillo descartable diferente para cada reactivo hemoclasificador y proceder a la mezcla del mismo con los hematíes, cubriendo un área circular de 2 cm de diámetro, luego mover de manera rotatoria la placa continuamente durante 2 minutos, observando si la aglutinación es visible macroscópicamente durante este tiempo.

Se debe mencionar que si el período de observación es mayor a 2 minutos, por efectos de evaporación del reactivo, se pueden producir resultados equivocados (débilmente positivos).

Igual sucede cuando no se observa aglutinación en los primeros 30 segundos y se presume negatividad, siendo un falso negativo que requeriría simplemente esperar el tiempo establecido por el fabricante para hacer evidente la aglutinación.

Si se utilizan las placas plásticas con orificios cóncavos se deben realizar movimientos suaves que logren homogeneizar las células y los reactivos, también se deben esperar 2 minutos antes de emitir el resultado final.

Estas placas permiten trabajar con comodidad y pulcritud, constituyendo una buena alternativa con relación a las placas de vidrio, ya que no se necesitan palillos homogenizadores para la mezcla de reactivos con los hematíes, además de que los espacios ya se encuentran delimitados físicamente, por tanto se evita que los reactivos se mezclen.

### 6.2.3. COMENTARIOS

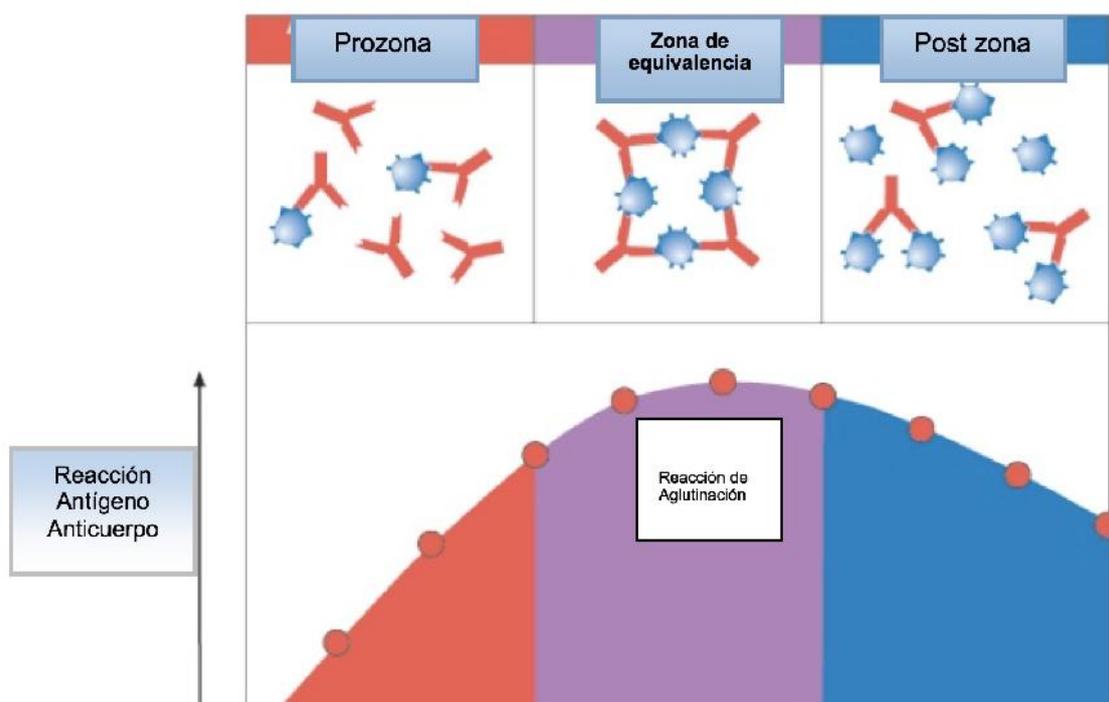
Los principales errores que pueden existir en la clasificación sanguínea, son los siguientes:

✓ **Con respecto a errores en la preparación de la suspensión de glóbulos rojos**

El rango de la suspensión de hematíes deben ir entre 3 a 5%, si hay exceso de glóbulos rojos al momento de la reacción antígeno-anticuerpo pueden absorber la aglutinina del suero hemoclasificador y no evidenciarse la aglutinación, el exceso de antígeno origina el fenómeno de **post zona dando lugar a falsos negativos**.

Si la suspensión es muy tenue (color rosado muy pálido) la escasez de glóbulos rojos dificultará la lectura macroscópicamente, existirá un exceso de anticuerpos, dando lugar a lo que se conoce como **fenómeno de prozona originando falsos negativos**.

La reacción de aglutinación caracterizada por la unión antígeno-anticuerpo tiene que tener lugar en el llamado **punto de equivalencia**, como se aprecia en la gráfica siguiente; donde la concentración de antígeno y anticuerpo están en proporción tal, que su unión se produce sin mayor dificultad así como tampoco existen problemas para su lectura en cuanto a la visualización macroscópica de la reacción.



**Gráfico N° 4.** Curva de Interacción Antígeno-Anticuerpo durante la reacción de Hemaglutinación

- ✓ **Con respecto a los sueros hemoclasificadores**
  - a) Reactivos vencidos, por tanto el título de anticuerpo podría haber disminuido así como también la potencia del reactivo.
  - b) Reactivos contaminados con bacterias u hongos, podrían dar resultados falsos positivos o falsos negativos.
- ✓ **Con respecto a las muestras**

Muestras contaminadas pueden dar lugar a resultados erróneos.
- ✓ **Con respecto al lavado de material**

Material lavado de manera incorrecta, trazas de los detergentes utilizados para limpieza, pueden generar reacciones químicas con los reactivos hemoclasificadores.
- ✓ **Con respecto a errores del operador**

Rotulación equivocada de los tubos, colocación errónea de los reactivos, equivocación en los reportes de resultados.

En la Tabla siguiente se describen algunas de las fuentes de errores técnicos comunes en discrepancias en los resultados de la clasificación de los grupos sanguíneos, mismas que deberán evitarse y ante su presencia se deberá obtener una nueva muestra del donante o del receptor y de manera consecuente, proceder a realizar nuevamente las Pruebas Hemática o Directa y la Prueba Sérica o Inversa.

**Tabla N°6** Fuentes de Errores Técnicos que pueden ser la causa de discrepancias en la Determinación de Grupos Sanguíneos

<b>FUENTES DE ERRORES TÉCNICOS</b>	
	Identificación inadecuada de la muestra de sangre, tubos de ensayo
	Mezcla de muestras
	Suspensión celular demasiado concentrada o demasiado diluida
	Falla en la adición de reactivos
	Falla al ignorar o al seguir estrictamente las instrucciones del fabricante (insertos)
	Uso de reactivos contaminados (mezcla de goteros, reactivos mal tapados contaminación bacteriana, fúngica, etc.)
	Falta de observación de hemólisis y no consideración de la misma como positividad, se debe recordar que la hemólisis es también evidencia de positividad
	Incorrecta selección del número de revoluciones por minuto de la centrifuga, recordemos que cada Servicio de Sangre debe estandarizar la velocidad y el tiempo que les permiten obtener “botones de aglutinación” bien definidos que se desprenden sin ejercer mucha rotación y movimientos en los tubos de ensayo
	Utilización de material de vidrio sucio/contaminado
	Errores administrativos

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

Para revisar las posibles causas de las discrepancias del Sistema ABO y las sugerencias para su resolución, referirse al Anexo 1.

## CAPÍTULO 2

# DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO “D” DEL SISTEMA Rh MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO Y EN PLACA

### 1. RESUMEN

Este capítulo presenta los lineamientos necesarios siguiendo estándares de calidad para el procedimiento de clasificación sanguínea Rh D también denominado Factor “Rh”.

Como parte de los procedimientos rutinarios dentro de las Pruebas Inmunohepatológicas, la tipificación del antígeno D (Factor Rh) debe seguir las buenas prácticas de laboratorio.

### 2. ALCANCE

Los lineamientos establecidos en el presente capítulo podrán ser aplicados en Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión donde se realiza la determinación del antígeno D a personas que tienen la intención de donar sangre, a quienes hacen efectiva la donación y se constituyen en donantes de sangre así como también a pacientes/receptores de transfusiones sanguíneas respectivamente.

### 3. INTRODUCCIÓN

Un grupo sanguíneo es una clasificación de la sangre basada en las características presentes en la superficie de los glóbulos rojos, así como también en los anticuerpos presente en el suero.<sup>(1)</sup>

Las dos clasificaciones más importantes para describir grupos sanguíneos en humanos son los antígenos (el sistema ABO) y el Rh.

Así como fueron descritas, las recomendaciones para la hemoclasificación del sistema ABO, la determinación del antígeno D, conocido como Factor Rh, no deja de ser muy importante, más aún, cuando debemos recordar que es el segundo sistema más antigénico que le sigue al ABO y precede al Sistema KELL en cuanto a la posibilidad de causar reacciones post transfusionales y Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN).

Como bien sabemos, Karl Landsteiner, en el siglo XX, demostró que había partículas antigénicas en la membrana del eritrocito, lo cual lo llevó a investigar la existencia de anticuerpos “naturales” en el suero con especificidad contraria a estos antígenos, desarrollándose así, el conocimiento del Sistema ABO, de donde surgen las bases que ahora tenemos para la investigación de este sistema conformado por antígenos y anticuerpos.

Los estudios de Landsteiner no pararon con el descubrimiento del funcionamiento del sistema ABO (1900-1902), sino también, décadas después con el descubrimiento del sistema Rh (1940), sin dejar de mencionar a Levine y Stetson quienes también formaron parte de este descubrimiento (1939), revolucionando de esta manera la Inmunohepatología.

La diferencia entre los anticuerpos regulares formados en el sistema ABO es que, como su nombre lo dice, se producen de manera natural, al contrario; para desarrollar anticuerpos anti D, se necesita un estímulo antigénico, (transfusiones previas, embarazos) por tanto; es muy importante clasificar de manera correcta este antígeno para prevenir errores en su determinación y así evitar que se formen anticuerpos inmunes, ya que si los anticuerpos han sido formados y se los confronta con

hematíes que portan el antígeno D en una posterior transfusión sanguínea (en un supuesto caso de que se cometiera un error en la determinación del antígeno D por ejemplo) el desenlace para el receptor podría ser fatal.

El Sistema Rh es uno de los sistemas de grupos sanguíneos de mayor polimorfismo, ya que está formado por 59 antígenos.<sup>(5)</sup>

En 1940, Landsteiner y Wiener inyectaron hematíes de *Macacus rhesus* (un simio cuya distribución a nivel mundial es muy amplia) a un conejo, observando que éste desarrolló un anticuerpo que al ser confrontado con eritrocitos de diferentes personas, los aglutinaba claramente.

Básicamente aglutinaba el 85% de la población caucásica de Nueva York, por tanto realizaron cierta correlación con lo publicado por Levine y Stetson quienes en 1939 relataron el caso clínico de una mujer que casi fallece durante el parto, dando a luz un mortinato luego de recibir sangre de su esposo, (recordemos que hasta ese momento se verificaba únicamente el sistema ABO como procedimiento previo antes de cualquier transfusión sanguínea).

Se supuso que se trataba del mismo anticuerpo y se propuso el nombre de “Sistema Rh” por analogía con el antisuero producido por el conejo luego de la sensibilización con los hematíes del simio *Macacus rhesus*.

Los observadores Fisher y Race postularon que en el cromosoma 1 existen 3 locus estrechamente relacionados “D”, “C” y “E” con dos pares de alelos. “C” “c” “E” “e”. Señalaron también la existencia del alelo “D” que no produce antígeno, por lo tanto aceptaron colocar “d” para significar la ausencia del mismo.

El grupo de alelos del complejo génico es denominado haplotipo.

Wiener en el mismo año, sugirió que hay múltiples alelos en un solo loci y que cada alelo codifica un antígeno distinto.<sup>(6)</sup>

Ya dentro de otro aspecto de la determinación del antígeno D, por si quedara alguna duda, se deja en claro que, no es posible realizar la prueba inversa o sérica para determinar el antígeno D, puesto que no se espera encontrar normalmente anticuerpos anti-D.

Esta situación responde al hecho de que los anticuerpos contra el antígeno D requieren un estímulo para su formación, no se producen de manera natural, por tanto; las personas no tendrán anticuerpos anti-D a no ser que perteneciendo al Sistema Rh D NEGATIVO hayan sido transfundidas con glóbulos rojos Rh D POSITIVO, o algunos casos de mujeres Rh D NEGATIVO que hayan sido sensibilizadas durante embarazos previos cuyos bebés hayan sido Rh D POSITIVO.

Por ello, los anticuerpos Anti-D, no son anticuerpos que se encuentran presentes de manera regular y su determinación no puede realizarse esperando encontrarlos en todas las personas (como ocurre con el anticuerpos Anti-A y el Anti-B) puesto que no se encuentran circulantes, a no ser en los casos mencionados anteriormente.

#### 4. DEFINICIONES IMPORTANTES

##### 4.1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL ANTÍGENO D

Los productos del gen (Haplotipos) son designados “R” (mayúscula) para los que codifican “D” y “r” (minúscula) para los que no lo codifican, a ellos, se les agregan sub-índices o supra

índices para indicar los distintos haplotipos que se desarrollan, sin embargo entrar en mayores definiciones, y mayores detalles no es el propósito de esta guía, por lo tanto, el saber que quienes poseen el antígeno D son denominados “Rh D POSITIVO” y quienes no lo poseen son denominados “Rh D NEGATIVO”, es suficiente por el momento.

Investigaciones realizadas con anticuerpos monoclonales demostraron que el antígeno D es un mosaico compuesto por varios epítopes diferentes, según algunos autores serían alrededor de 37<sup>(30)</sup>, lo que ocasiona variables antigénicas de tipo cuantitativas y cualitativas que dan origen respectivamente a los D débiles (D weak o D<sup>w</sup> conocido antes como D<sup>u</sup>) así como también dan origen a variables D parciales (variaciones cualitativas).

Para resumir:

**D débil:** Corresponde al fenotipo cuyos eritrocitos poseen una cantidad reducida del antígeno D y requieren por tanto, de la prueba de antiglobulina indirecta (Test de Coombs Indirecto) para su detección.

**D parcial:** Corresponde al fenotipo cuyos eritrocitos son catalogados como D positivos, pero carecen de una porción del antígeno D, pudiendo estos pacientes aloimmunizarse cuando reciben transfusiones de glóbulos rojos D positivos.

#### 4.2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS REACTIVOS ANTI D

La utilización de dos anti D diferentes es ideal y debería implementarse de manera paulatina, opcional, en los Servicios de Sangre, preferentemente podría utilizarse un Anti-D (Rho) de origen monoclonal y un segundo anti D que contenga una mezcla de anticuerpos monoclonales humanos IgM/IgG (**Conocidos como “Blend” del inglés “Mezcla”**), también podrían utilizarse dos reactivos Anti-D “blend” de diferentes líneas comerciales.

Se debe recordar que el tipo más común de los D parciales es D<sup>vi</sup>.

Para tipificar a los donantes y pacientes, se debe idealmente seleccionar que uno de los reactivos no reaccionen con las células D<sup>vi</sup> ya que es preferible que las personas que pertenecen al tipo D<sup>vi</sup> sean tipificadas como D NEGATIVAS, y en caso de requerir una Transfusión Sanguínea reciban sangre D NEGATIVA, caso contrario; si se tipificaran como D POSITIVO, estarían en serio riesgo de formar aloanticuerpos Anti-D con gran probabilidad de que ocurra una reacción hemolítica post transfusional en un futuro si nuevamente fuera necesaria una Transfusión Sanguínea y se les transfunde una unidad Rh D POSITIVO.

Por ello es muy importante realizar este análisis antes de realizar las especificaciones técnicas y considerar estos aspectos de redacción de parámetros mínimos requeridos para cada reactivo durante la adquisición de los mismos.

#### 4.3. SUERO RHESUS CONTROL

Es un control que ha sido fabricado para evaluar la especificidad del suero anti D, en realidad, es el mismo suero anti D (la misma formulación en cuanto al vehículo en el cual están suspendidos los anti D, con la diferencia de que en éste particular caso, los anticuerpos NO ESTAN PRESENTES), por lo tanto NUNCA DEBEN DAR UNA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN POSITIVA.

Si se visualiza aglutinación con el Rhesus Control, mismo que no debiendo aglutinar en nin-

gún caso, lo hizo; se debe dudar de que la “aglutinación” vista con el suero Anti-D sea realmente “aglutinación”.

En estos casos, se debe realizar un lavado de los hematíes en cuestión y se debe volver a realizar la determinación, lo más probable es que la reacción desaparezca en ambos casos.

## 5. DESARROLLO

### A) MUESTRA

La muestra adecuada para la clasificación ABO, es sangre completa con anticoagulante EDTA<sub>K<sub>3</sub></sub>, se utilizan los mismos tubos que se utilizaron para la determinación de los antígenos A y B del Sistema ABO para trabajar en la preparación de suspensiones de hematíes.

### B) REACTIVOS

Se requerirá SSFE o SSFE tamponada con PBS para la preparación de la suspensión de hematíes, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El reactivo anti D ideal es el que está constituido por una mezcla de anticuerpos Ig G e Ig M anti-D monoclonales humanos, una característica importante será que sea bajo en proteínas y que aglutine directamente hematíes Rh D positivos, incluyendo la mayoría de sus variantes (excepto D<sup>v</sup>) y una alta proporción de fenotipos D débiles (D<sup>w</sup> conocido anteriormente como D<sup>u</sup>).

Durante el desarrollo de la técnica para determinar el antígeno D, se debe utilizar **obligatoriamente** el reactivo conocido como Rhesus Control, ya que el recubrimiento de los eritrocitos por inmunoglobulinas, por algunos factores del suero causantes de agregación celular, los coágulos de fibrina en la suspensión de eritrocitos o los aditivos de alto contenido proteico de un reactivo, pueden provocar una falsa aglutinación durante la determinación de los grupos sanguíneos.

## 6. TÉCNICAS

Para lograr resultados confiables, seguros con la calidad esperada, se debe realizar una lectura cuidadosa del inserto del reactivo en el cual está descrita detalladamente la técnica. Se deben seguir rigurosamente todas las instrucciones que están claramente descritas en el inserto de cada set de reactivos, las mismas deben estar en idioma español.

A partir de la técnica descrita en el inserto, cada Servicio de Sangre elaborará el Procedimiento Operativo Estandarizado para cada Línea comercial.

Las técnicas que pueden utilizarse para determinar el antígeno D, son la técnica en placa, en tubo, en micro placa y técnica de Microaglutinación en Columna con partículas de gel.

Para los casos descritos en el capítulo 2 en el acápite 2.1, se podrá utilizar la técnica en placa.

Las placas deben ser de vidrio (de aproximadamente 22 cm de largo por 18 cm de ancho, con espacios delimitados mediante la utilización de líneas a manera de cuadrículas, al interior, deben incluir círculos de 2 cm de diámetro), éstas placas son realizadas a pedido en las vidrierías locales y son las ideales ya que establecen los límites pertinentes para que no existan mezclas entre los reactivos y hematíes de diferentes personas.

Es válido también utilizar placas plásticas con 5 ó 10 óvalos cóncavos, diseñadas específicamente para tipificación sanguínea, son funcionales ya que no hay posibilidad de mezcla de reactivos. El

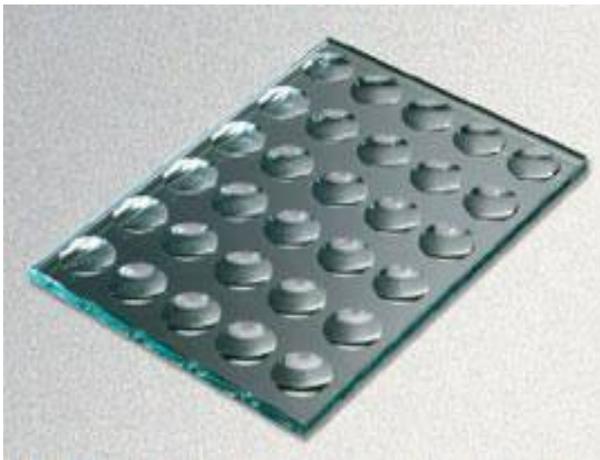
cuidado que se recomienda tener es que, los reactivos se dispensen siempre en el mismo orden, para ello hay que marcar en cada placa en que orificio se debe dispensar la gota del reactivo seleccionado para ese óvalo, así también, al momento del lavado se deben utilizar cepillos que lleguen a las partes curvas de la placa.

Queda totalmente prohibida la utilización de porta objetos para la determinación de grupos sanguíneos, por funcionalidad y por principios básicos de la técnica, es imposible dispensar en un porta objetos 5 gotas (anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D y Rhesus Control) y formar círculos de 2 cm de diámetro como establece la técnica.

Recordemos que en esta técnica se procesan simultáneamente tanto el Sistema ABO como el Rh y el tamaño de un porta objetos es insuficiente para este objetivo.

En la fotografía se puede observar una placa de vidrio delimitada de manera correcta por orificios de 2 cm de diámetro que ya se encuentran socavados, constituyendo ésta otra alternativa a la anteriormente propuesta cuando las placas son fabricadas por vidrieros.

A la derecha, se observa la imagen de una placa de plástico de 10 orificios que permite realizar simultáneamente la determinación de grupo sanguíneo a dos personas.



**Fotografías N° 1 y 2** Placa de vidrio y Placa de Plástico con orificios cóncavos para determinación de grupo sanguíneo

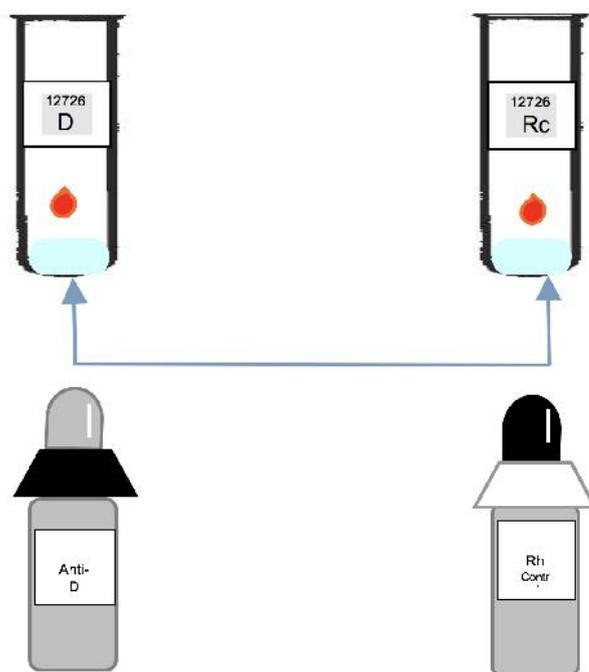
## 7. ACCIONES PRELIMINARES

- 🔥 Atemperar los reactivos Anti-D y Rhesus Control a temperatura ambiente, 20 minutos antes de empezar a procesar las muestras.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario del Reactivo Hemoclasificador Anti-D.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica.
- 🔥 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.

## 8. PROCEDIMIENTO

Si bien es cierto que existen diferentes marcas de reactivos hemoclasificadores, las técnicas fundamentalmente siguen los mismos pasos, por tanto se describe el siguiente procedimiento como una posibilidad que podría adaptarse a diferentes líneas comerciales:

- Separar el suero/plasma de los hematíes mediante la centrifugación de los tubos de ensayo que contienen la muestra, de acuerdo al tiempo y número de revoluciones que se hubieran estandarizado en el Servicio de Sangre, (Ej. 5-10 minutos a 2.500 - 3500 rpm).
- Lavar los hematíes mediante tres ciclos de lavado de 3 minutos a 2,500 rpm y preparar la suspensión de hematíes al 5%, ó a la concentración que indique el fabricante para la técnica en tubo, utilizando en caso de ser posible tubos de ensayo nuevos o lavados y esterilizados mediante calor seco de manera correcta (Ver Apéndice 12).  
Los hematíes podrán estar suspendidos en SSFE o en SSFE tamponada con PBS.
- Una vez que se han preparado las suspensiones celulares correctas, según el ejemplo establecido en el Apéndice 13, se debe preparar para cada muestra la siguiente batería de tubos de ensayo rotulándolos como se explica en el siguiente cuadro:



- Dispensar 50 microlitros de las suspensiones celulares preparadas a los tubos marcados Anti-D, y Rhesus control, siempre identificando el código de donante, o nombre/iniciales del paciente, según corresponda.
- Dispensar una gota de Anti-D al tubo marcado con la letra D y una gota del Rhesus Control al tubo marcado como Rc, mezclar los tubos ligeramente y proceder a colocarlos de manera equilibrada en la centrifuga .
- Proceder a centrifugar según el tiempo y revoluciones por minuto establecidas por el fabricante y que deberán estar bien descritas en el inserto, una alternativa sería centrifugar a 1000 rpm durante un minuto.
- Observar siempre con ayuda de la luz de un aglutinoscopio la presencia de aglutinación o hemólisis, registrar los resultados obtenidos de acuerdo a la tabla de intensidad de reacción que se observa en el Apéndice 14.

## 9. INTERPRETACIÓN

La asignación del grupo sanguíneo deberá realizarse de acuerdo a los resultados de la siguiente tabla:

**Tabla N°7** Interpretación de Resultado del Antígeno D en función a la reacción de aglutinación con los Reactivos Anti-D y Rhesus Control

RESULTADO CON ANTI-D	RESULTADO CON RHESUS CONTROL	RESULTADO FINAL
POS	NEG	D POSITIVO
NEG	NEG	D NEGATIVO (DESCARTAR QUE SE TRATE DE UN D <sup>o</sup> )
POS Ó NEG	<b>POS</b>	UN RESULTADO POSITIVO CON RHESUS CONTROL INVALIDA LA PRUEBA Y DEBE SER REPETIDA. SI EL RESULTADO SE REPITE, SOLICITAR NUEVA MUESTRA Y REALIZAR UN TEST DE COOMBS DIRECTO, YA QUE HEMATÍES SENSIBILIZADOS PODRIAN SER LA CAUSA DE ESTE RESULTADO

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

**POS** = INDICA LA EXISTENCIA DE AGLUTINACIÓN DE 1, 2, 3, 4 CRUCES (+)

**NEG**= INDICA QUE NO EXISTE NINGÚN GRADO DE AGLUTINACIÓN

### 9.1. DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO “D” MEDIANTE TÉCNICA EN PLACA DE VIDRIO O PLACA PLÁSTICA CON ORIFICIOS CÓNCAVOS

Esta técnica únicamente deberá ser utilizada como “técnica preliminar” en los primeros pasos de la cadena transfusional, vale decir al momento de realizar Hematocrito/Hemoglobina a los posibles donantes de sangre cuando simultáneamente el grupo sanguíneo puede realizarse de ésta manera, así como también en las situaciones siguientes:

a) En los Bancos de Sangre:

- ✓ Al momento de la reclasificación y verificación de grupos sanguíneo ABO y factor Rh inmediatamente después de que la unidad ha sido extraída.
- ✓ Antes de realizar el despacho del paquete globular o sangre total a los diferentes Servicios de Transfusión.

b) En los Servicios de Transfusión:

- ✓ Para confirmar el grupo sanguíneo que está referido en la etiqueta del paquete globular o sangre total.

c) En la cabecera de cama del receptor.

Por factores de tiempo en una urgencia podría ser conveniente realizar la hemoclasificación mediante técnica en placa, pero en definitiva, es preferible utilizar la técnica en tubo debido a que presenta mayor sensibilidad.

#### 9.1.1. ACCIONES PRELIMINARES

- 🔥 Atemperar los reactivos Anti-D y Rhesus Control.

- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario del Reactivo Hemoclasificador Anti-D.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica (algunos reactivos establecen que se trabaje con suspensiones de hematíes y otros con sangre entera).
- 🔥 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.

### 9.1.2. PROCEDIMIENTO

- a) Desengrasar con una torunda empapada con alcohol una placa de vidrio o de plástico limpia, esperar a que seque o secar la misma con una torunda de algodón seco.
- b) Dispensar 50 ul de los hematíes en estudio (en suspensión según instrucciones del fabricante o directamente de la muestra) en cada uno de los dos espacios destinados para Anti-D y Rhesus Control de la placa de vidrio o de los orificios cóncavos de la placa plástica.
- c) Proceder a dispensar una gota del reactivo Anti-D y una gota del Rhesus Control en los lugares asignados utilizando los goteros.
- d) Homogeneizar utilizando un palillo descartable diferente y proceder a la mezcla del reactivo y control con los hematíes, cubriendo un área circular de 2 cm de diámetro, luego mover de manera rotatoria la placa continuamente durante 2 minutos, observando si la aglutinación es visible macroscópicamente durante este tiempo.

Se debe mencionar que si el período de observación es mayor a 2 minutos, por efectos de evaporación del reactivo, se pueden producir resultados equivocados (débilmente positivos).

Igual sucede cuando no se observa aglutinación en los primeros 30 segundos y se presume negatividad, siendo un falso negativo que requería simplemente esperar el tiempo establecido por el fabricante para hacer evidente la aglutinación.

Si se utilizan las placas plásticas con orificios cóncavos se deben realizar movimientos suaves que logren homogeneizar las células y los reactivos, también se deben esperar 2 minutos antes de emitir el resultado final.

### 9.1.3. INTERPRETACIÓN

Los resultados indeterminados o negativos deben confirmarse utilizando la técnica en tubo. Las técnicas en placa no están aconsejadas para la detección de muestras D débil ya que se requieren de técnicas de mayor sensibilidad para su determinación.

En los casos en los cuales nos encontremos frente a un grupo aparentemente Rh D negativo, se debe realizar la prueba conocida como D<sup>u</sup>-D variante, mediante la técnica en tubo, misma que nos permite confirmar que se trata de un D Rh positivo débil o por el contrario si se trata de un D francamente Rh NEGATIVO, sólo entonces; la duda será resuelta.

En el caso de D parciales para su confirmación se requieren técnicas de mayor sensibilidad y especificidad tal es el caso de tarjetas específicas para la técnica de micro aglutinación en columna con partículas de gel o aún más precisas: las técnicas de Biología Molecular.

#### 9.1.4. INFORME DE RESULTADOS

La denominación que se recomienda es la que sigue: la clasificación ABO en primera instancia seguida del Rh D, por tanto ejemplos serían: O Rh D POSITIVO, AB Rh D NEGATIVO, B Rh D POSITIVO, etc., cada Servicio de Sangre deberá establecer la metodología a seguir para diferenciar los grupos Rh D negativos de los grupos Rh D positivos en cuanto a su registro, misma que deberá estar claramente establecida en sus Procedimientos Operativos Estandarizados.

#### 9.1.5. COMENTARIOS

Los principales errores que pueden existir en la determinación del antígeno D, son los siguientes:

✓ **Error en la preparación de la suspensión de hematíes**

El rango de la suspensión de hematíes debe ser el que establece el fabricante de cada reactivo, (el rango puede ser desde hematíes suspendidos en el propio plasma de la muestra sin que se realice ninguna suspensión, así como hay reactivos que indican suspensiones de 5% para la técnica en tubo e incluso 40 a 50% para la técnica en placa), lo importante es seguir las instrucciones del fabricante, por ello es muy importante leer los insertos de los reactivos.

✓ **Con respecto a los sueros hemoclasificadores Anti-D**

a) pueden estar vencidos, por tanto el título de anticuerpo ANTI-D podría haber disminuido así como también la potencia del reactivo.

b) pueden estar contaminados con bacterias u hongos, por tanto podrían dar resultados falsos positivos o falsos negativos.

✓ **Con respecto a las muestras**

Pueden estar contaminadas por tanto dar resultados erróneos.

✓ **Con respecto al lavado del material**

Utilización de material lavado de manera incorrecta, trazas de los detergentes utilizados para limpieza, pueden generar reacciones químicas con los reactivos hemoclasificadores y dar resultados erróneos.

✓ **Con respecto a la manipulación**

Pueden existir rotulación equivocada de los tubos, colocación errónea de los reactivos, así como también equivocación en los reportes.

## CAPÍTULO 3

# REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD PRE TRANSFUSIONAL: PRUEBAS CRUZADAS EN MEDICINA TRANSFUSIONAL

### 1. RESUMEN

En este capítulo se presentan las recomendaciones para el correcto procedimiento de las pruebas de compatibilidad pre transfusional, mismas que incluyen: determinación de grupo sanguíneo mediante pruebas directa e inversa al receptor, grupo sanguíneo a la unidad de sangre o componente sanguíneo que se vaya a transfundir; así mismo realización de Pruebas Cruzadas tanto Lado Mayor (en el caso de Sangre Total y Paquete Globular) como Lado Menor (en caso de Plasma Fresco Congelado, Plasma Congelado, Concentrado de Plaquetas, y Crioprecipitados) sin dejar de considerar que a la unidad de Sangre Total se le realizan tanto la Prueba Cruzada Lado Mayor como Lado menor, e idealmente también se debe incluir la detección e identificación de anticuerpos irregulares en el receptor.

Por tanto, se entregan las directrices para la realización de una adecuada prueba de compatibilidad pre transfusional con el objetivo de contribuir a garantizar la calidad de estas pruebas contribuyendo a evitar al máximo posible cualquier posible reacción post transfusional o casos de aloinmunización al receptor por fallos durante el proceso analítico previo a toda Transfusión Sanguínea.

### 2. ALCANCE

Está dirigido fundamentalmente a Servicios de Transfusión y de manera excepcional a Bancos de Sangre que realicen alguna prueba de compatibilidad pre transfusional caracterizada por la complejidad de la situación clínica del receptor.

### 3. INTRODUCCIÓN

Ottenberg (1908) fue el primero en aplicar el descubrimiento de Landsteiner de los grupos sanguíneos a la práctica transfusional, al comprobar como prueba previa a la transfusión, si el suero del receptor causaba lisis y aglutinación de los hematíes del donante.<sup>(7)</sup>

El avance científico y tecnológico de la Inmunohematología ha conducido al desarrollo de técnicas de biología molecular que permiten identificar la presencia o ausencia de una secuencia genética que codifica para una proteína específica, así como técnicas de citometría de flujo y Western Blot para evaluar la expresión de un antígeno en la membrana eritrocitaria <sup>(8)</sup>; sin embargo, dentro de la búsqueda y con el propósito de “ser prácticos” en lo que se refiere a la selección de técnicas de laboratorio, debemos eliminar pruebas que no son esenciales, disminuir costos, utilizar protocolos simples y seleccionar adecuadamente los métodos, la temperatura, período de incubación y la elección de diferentes sustancias conocidas como potenciadores de reacción, que aceleran y modifican la reacción antígeno-anticuerpo, tal es el caso de Albúmina Sérica Bovina al 22 %, la solución de baja fuerza iónica LISS y enzimas como la Bromelina.

El propósito de las pruebas cruzadas es determinar si existe ***incompatibilidad serológica entre el donante y el receptor*** mediante procedimientos o pruebas de laboratorio efectuados previamente a

la transfusión sanguínea, con el objetivo de prevenir una reacción hemolítica transfusional, sin dejar de considerar posibles e innecesarias aloinmunizaciones pasivas, más aún si la receptora es una mujer en edad fértil que tiene posibilidad de quedar embarazada, sin dejar de lado la consideración de pacientes poli transfundidos, recién nacidos o mujeres gestantes.

Desde el punto de vista clínico, se consideran en los anticuerpos anti eritrocitos dos características serológicas importantes: la especificidad y su habilidad de reaccionar a 37°C, ya que es a ésta temperatura, a la cual, tienen lugar la mayoría de las reacciones transfusionales.

Las pruebas cruzadas y la búsqueda de anticuerpos irregulares son de suma importancia, ya que permiten que los antígenos y anticuerpos puedan ser detectados y estudiados en el laboratorio; coadyuvando a prevenir la transfusión de sangre incompatible, y otorgando al paciente el mayor porcentaje de seguridad y beneficio.

Antes de realizar cada procedimiento es muy importante contar con un excelente control de calidad, el cual nos permitirá verificar todos los procesos y etapas que influirán en la detección de los anticuerpos.

Las pruebas cruzadas se llevan a cabo en tres fases obligatorias: una Fase I que implica la centrifugación salina inmediata, una Fase II Térmica que implica la incubación a 37°C (en la que se incluyen potenciadores de reacción, tal es el caso de Albumina y LISS) y una Fase III Antiglobulínica 37° Coombs.

Las pruebas cruzadas se validan mediante el uso de eritrocitos sensibilizados (Ver Apéndice 4 PREPARACIÓN DE HEMATÍES SENSIBILIZADOS-CÉLULAS CONTROL DE COOMBS (CCC) y en cada prueba se incluye un AUTOTESTIGO que implica confrontar los hematíes con el propio suero/plasma del receptor.

Debido a que la acción de la Bromelina puede presentar falsos positivos, se sugiere reservar su utilización para la técnica de micro aglutinación en columna con partículas de gel, y para la técnica en tubo considerar a la Albumina Sérica Bovina 22% y LISS como los potenciadores a seleccionar para uso rutinario.

La siguiente tabla presenta los elementos clave que deben ser considerados en las pruebas de compatibilidad pre transfusional:

**Tabla N° 8** Requisitos que se necesitan para la realización de las Pruebas de Compatibilidad Pre Transfusional

**REQUISITOS IMPORTANTES QUE DEBEN SER CONSIDERADOS**

**1.- En cuanto a la orden de transfusión:**

Recepción de una correcta orden de transfusión de Establecimientos de Salud de los Sub Sectores Público, Privado y de Seguro Social a Corto Plazo, que incluya los siguientes datos:

- ✓ Fecha de Solicitud de Transfusión Sanguínea
- ✓ Fecha y Hora en que se necesita la sangre o componente sanguíneo solicitado
- ✓ Nombres y Apellidos del Receptor
- ✓ Edad
- ✓ Servicio solicitante
- ✓ Ubicación del Receptor (Pabellón, Sala, Cama, etc.)
- ✓ Número de embarazos
- ✓ Diagnóstico Presuntivo
- ✓ Motivo de la indicación transfusional
- ✓ Componente Sanguíneo Requerido
- ✓ Cantidad Solicitada de componentes sanguíneos
- ✓ Volumen requerido en caso de pacientes pediátricos
- ✓ Grupo Sanguíneo y factor Rh solicitado
- ✓ Tipo de Transfusión: Programada, Urgente, Inmediata
- ✓ En caso de tener conocimiento, referir si el paciente tuvo alguna reacción transfusional previa
- ✓ Nombre del Médico Solicitante, sello personal que lleve incluido el número de Matrícula Profesional
- ✓ Firma del médico Solicitante

**2.- En cuanto a la Identificación del Receptor:**

- ✓ Colectar correctamente la muestra del receptor
- ✓ Clara identificación en la muestra del receptor
- ✓ Clara identificación en la solicitud de Transfusión Sanguínea

**3.- En cuanto a la realización de las Pruebas de Compatibilidad propiamente dichas:**

A la **muestra del Receptor** en el Servicio de Transfusión o en Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre:

- ✓ Determinación de grupo sanguíneo ABO y Rh (Pruebas Directa e Inversa)
- ✓ Determinación de Anticuerpos Irregulares (con un panel celular preparado artesanalmente conocido también como “Hecho en Casa” o “Made in House” a partir de 10 muestras de células O (8 Rh positivo y/o 2 Rh negativo en caso de estar disponibles, caso contrario 10 O Rh positivo). El panel será preparado cada 48-72 horas, o según las posibilidades o también puede ser adquirido comercialmente.
- ✓ En casos particulares por solicitud médica, realizar fenotipaje Rh (C, c, E, e), si se cuenta con los antisueros correspondientes en el Servicio de Transfusión, o caso contrario remitir la muestra al Banco de Sangre de Referencia Departamental que corresponda. Esta determinación dependerá del criterio médico de acuerdo a las características clínicas del receptor, tal es el caso de mujeres gestantes, exanguinotransfusiones, neonatos, pacientes poli transfundidos, así como pacientes que recientemente presentaron una reacción transfusional. Si el médico tratante no solicitara estas pruebas en estos casos, el personal del Servicio de Transfusión podrá sugerir al médico tratante que solicite unidad con compatibilidad fenotípica Rh (C, c, E, e).
- ✓ La realización del Test de Coombs Directo a los receptores previo a cada Transfusión Sanguínea, permite evidenciar si los hematíes del receptor se encuentran sensibilizados y por tanto habría que tomar el recaudo pertinente ya que esta situación dificultaría la interpretación de las pruebas cruzadas.

#### **4.- En cuanto a la Prueba cruzada propiamente dicha:**

- ✓ Se debe realizar el Lado Mayor o Lado Menor según la situación lo requiera en función al componente sanguíneo a transfundir o ambas en casos de transfusiones de Sangre Total.

#### **5.- En cuanto al etiquetado del componente sanguíneo a transfundir:**

- ✓ Toda vez que la unidad fue compatible, situación evidenciable según los resultados de las pruebas cruzadas, proceder a registrar el nombre del receptor en la unidad a transfundir previo a su despacho mediante la utilización de una tarjeta que identifica al receptor y se coloca de manera segura junto con la unidad.

#### **6.- En cuanto al despacho de la unidad:**

- ✓ Debe realizarse en las condiciones óptimas de transporte según el componente sanguíneo.

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

## **4. DEFINICIONES IMPORTANTES**

### **4.1. CONCEPTO GENERAL DE PRUEBAS CRUZADAS**

Las pruebas cruzadas son parte de las pruebas de compatibilidad, se definen como un procedimiento que permite excluir la incompatibilidad entre donante y receptor.

Se utiliza suero del paciente y una suspensión de los hematíes de las unidades a transfundir (fragmentos de tubuladura).

También puede darse el caso que se utilice el plasma de la unidad a transfundir (fragmento de tubuladura: Plasma Fresco Congelado, Plasma Congelado, Concentrado de Plaquetas, Crioprecipitados) y los hematíes del receptor preparados en suspensión.

En aquellas situaciones en las cuales la administración de Concentrado de Plaquetas y Crioprecipitados sea masiva y que por tanto la realización de la prueba cruzada lado menor se dificulte, hay que recordar que a dichos componentes sanguíneos ya se les realizó la detección de anticuerpos irregulares por tanto habrá que valorar en función al tiempo disponible entre transfusiones la realización de la prueba cruzada lado menor en estos dos casos.

### **4.2. IMPORTANCIA DE LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS CRUZADAS**

Las pruebas cruzadas se realizan para asegurar que:

- ✓ No exista incompatibilidad ABO y Rh D entre el receptor (paciente) y la sangre o componente sanguíneo a transfundir. Las unidades son pre seleccionadas isogrupo en los sistemas ABO y Rh antígeno D.
- ✓ No existan otros anticuerpos irregulares que puedan causar una reacción transfusional hemolítica o un acortamiento de la vida media de las células transfundidas en el caso de transfusiones de Paquetes Globulares y Sangre total.
- ✓ Se pretende detectar posibles anticuerpos irregulares que se unirían a los antígenos de la membrana de los hematíes causando su sensibilización y correspondiente hemólisis o destrucción.

**4.3. PRUEBA MAYOR, (M) o DEL DONADOR:** Sirve para confirmar si existe compatibilidad ABO entre el receptor y el donador. Detecta anticuerpos en el suero del paciente que podrían sensibilizar y luego hemolizar los hematíes transfundidos. Se utilizan 2 volúmenes de suero del receptor más 1 volumen de hematíes lavados del donador.

Con la Prueba Lado Mayor se pueden demostrar la ausencia de anticuerpos regulares e irregulares de importancia clínica en el suero del receptor dirigidos contra los hematíes del donador.

**4.4. PRUEBA MENOR (m) o DEL RECEPTOR:** Ratifica la clasificación ABO pero fundamentalmente detecta anticuerpos irregulares en el plasma del componente sanguíneo a transfundir (que no pudieron haber sido identificados mediante el panel celular disponible cuando realizaron la identificación de anticuerpos irregulares en el Banco de Sangre).

Se realiza con 2 volúmenes de plasma del donador más 1 volumen de eritrocitos del receptor.

**4.5. PRUEBA AUTOTESTIGO (AT):** Permite detectar la presencia de “rouleaux” (hematíes dispuestos en pilas de monedas) así como otras anomalías auto inmunes, tal es el caso de Anemias Hemolíticas Auto Inmunes (AHAI).

Se realiza con 1 volumen de eritrocitos del receptor más 2 volúmenes de suero del receptor.

#### **4.6. TRANSFUSIÓN INMEDIATA**

Implica preferencia absoluta en la realización de las pruebas de compatibilidad, respetando siempre el tiempo de realización de las mismas (máximo 20 minutos en caso de usar LISS y reduciendo el tiempo de incubación en vez de 10 a 5 minutos). Este tipo de acciones debe reservarse estrictamente para los casos necesarios (ya que el exceso de peticiones urgentes causa un retraso en la realización de aquellas que verdaderamente lo son).

Algunos profesionales médicos solicitan las transfusiones inmediatas utilizando la denominación STAT como sinónimo de Inmediata.

#### **4.7. TRANSFUSIÓN URGENTE**

Significa que la sangre o componente sanguíneo es requerida (o) para ser administrada (o) al paciente a partir de los 21 minutos hasta las 4 horas siguientes de haber sido recibida la orden de transfusión, radicando en este punto la premura y adecuada selección del potenciador de reacción por parte del operador para responder de manera efectiva ante la situación, manteniendo en todo momento como premisa, mantener la calidad para cumplir el compromiso de otorgar sangre segura a la población.

Los decesos de pacientes dentro del ámbito de la medicina transfusional que refiere la literatura internacional en el área inmunohematológica son atribuidos a errores en la identificación de grupo sanguíneo ABO Rh o fallos al momento de realizar las pruebas de compatibilidad (causando reacciones hemolíticas post transfusionales) así como la administración de hemocomponentes a receptores de manera equivocada, son una de las causas más importantes de mortalidad por Transfusión Sanguínea,<sup>(8), (9)</sup> por ello, es muy importante que los profesionales del país tomen conciencia de la responsabilidad que conlleva la correcta realización de las pruebas Inmunohematológicas.

#### 4.8. TRANSFUSIÓN PROGRAMADA

Tiene lugar cuando se solicita la reserva de sangre o componentes sanguíneos previa realización de una intervención quirúrgica o cuando pasadas las 4 horas de recibida la orden de transfusión se programa llevar a cabo la transfusión sanguínea.

Las muestras sanguíneas del paciente deben llegar al Servicio de Transfusión con la suficiente antelación como para permitir la realización del grupo ABO, Rh, Determinación de Anticuerpos Irregulares, siendo que en caso de que se detectaran los mismos, se reservarán con los nombres y apellidos del receptor las unidades compatibles.

Será importante mencionar que si en los Servicios de Transfusión se detectara positividad para la detección de Anticuerpos Irregulares, corresponderá derivar la muestra a los Bancos de Sangre para verificación del resultado obtenido y la identificación del anticuerpo irregular para que posteriormente se proceda con el envío de unidades compatibles seleccionadas del stock o reserva del Banco de Sangre al Servicio de Transfusión, y a la brevedad posible se proceda a la transfusión.

En caso de que no se encontraran unidades compatibles habrá que realizar el reporte de resultados e informar al médico tratante sobre la situación, para que sea quien tome la decisión del riesgo/beneficio de la transfusión.

#### 4.9. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES EN EL RECEPTOR:

Se realiza confrontando el suero del paciente-receptor con eritrocitos de fenotipo conocido (PANEL COMERCIAL DE CELULAS I-II ó I-II-III así como también una alternativa sería realizar la prueba en base a un PANEL PREPARADO ARTESANALMENTE “HECHO EN CASA”, ver Apéndice 5). La investigación de anticuerpos irregulares libres en suero se debe realizar por lo menos con dos técnicas: la primera siempre será la salina llevada hasta la fase de Coombs, ya que en la mayoría de los casos permite diferenciar la Ig M en su fase rápida a 22°C y 37 °C de la Ig G en la fase de Coombs; y la segunda, puede ser un medio hiperproteico como Albúmina, o LISS.

En este punto se deja claramente establecido que la realización de esta prueba es parte de las pruebas de compatibilidad pre transfusional y que idealmente todos los Servicios de Transfusión del país deberán ir incluyéndola dentro de sus Procedimientos Operativos Estandarizados como técnicas realizadas de manera rutinaria.

#### 4.10. EJECUCIÓN DE LA PRUEBA CRUZADA

Incluye tres fases y la ejecución de todas, forma parte de un conjunto de pasos que no pueden ser separados. **Es inapropiado** considerar la parte inicial donde se testan los glóbulos rojos con suero/plasma como prueba cruzada y la adición del reactivo de Coombs como otra prueba.

El no llegar hasta la Fase Antiglobulínica, que implica la adición del reactivo de Coombs, tiene el mismo sentido que el no haber realizado la prueba cruzada, y no debería ser considerada efectuada si es que no culmina con la adición del mismo, a no ser que en la primera fase ya hubiera incompatibilidad evidente, momento en el cual ya se toma la decisión de seleccionar una unidad diferente, para comenzar otra prueba cruzada.

El procedimiento que se desarrolla en tres fases:

- **FASE I SALINA INMEDIATA**
- **FASE II POTENCIADOR DE REACCIÓN/TÉRMICA**
- **FASE III FASE ANTIGLOBULÍNICA**

#### **4.11. UTILIDAD DE CÉLULAS CONTROL DE COOMBS EN SERVICIOS DE SANGRE**

Las células rojas reactivas CCC, se emplean en Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión como control analítico ante un resultado negativo de la fase Antiglobulínica, el resultado, debe ser positivo después de la adición de las células control de Coombs.

Estas células “control” permiten asegurar que el procedimiento se ha realizado correctamente ya que si las células control de Coombs no tornan la reacción positiva, la prueba no es válida, pues significaría que cuando se realizó la fase Antiglobulínica y se añadió el reactivo de Coombs, había reactivo fijado a las células lo que sería indicio de aglutinación e incompatibilidad.

Así también dentro de las posibles causas de este resultado, podrían citarse el no haber añadido el suero AHG a los tubos, el lavado inadecuado de las células o el deterioro del reactivo de AHG, entre otras.

Es por ello que la utilización de estas células en las Pruebas Inmunohepatológicas que emplean el suero de Coombs como reactivo principal, son requeridas en los Estándares para Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB)<sup>(17)</sup>, por constituir un sistema de control analítico ante un resultado negativo de la prueba de Antiglobulina Humana.

Por tanto; si existiera aglutinación al final de la adición de las CCC cuando el resultado en la Fase Antiglobulínica fue negativo, se concluye que, la unidad es **COMPATIBLE** con el receptor.

En caso de que al final de la Fase Antiglobulínica, ésta fue positiva, se concluye que: la unidad es **INCOMPATIBLE** con el receptor y se debe proceder a seleccionar otra unidad y comenzar nuevamente la prueba cruzada. Aunque pudiera sobre entenderse, se aclara que, cuando el resultado evidencia aglutinación, ya no es necesario añadir las CCC.

## **5. DESARROLLO**

### **A) MUESTRAS**

Para la obtención de las muestras de los componentes sanguíneos, se procederá separando un fragmento de la tubuladura conocido también como “piloto”.

Los Bancos de Sangre utilizando el sellador automático de tubuladuras deberán dejar ya listos los fragmentos para que en los Servicios de Transfusión puedan separarlos sin inconvenientes y proceder a realizar las pruebas de compatibilidad pre transfusional.

Mediante la utilización de tijeras desinfectadas e idealmente esterilizadas específicamente destinadas para este fin, se procederá a realizar un corte y verter el contenido de la tubuladura en un tubo de ensayo.

En el caso de receptores de los componentes sanguíneos, se requiere tomar 4 ml de sangre venosa recogida en un tubo de ensayo con EDTAK<sub>3</sub>, así como también 4 ml de sangre recogida en un tubo sin anticoagulante para realizar la prueba sérica, detección de anticuerpos irregulares y pruebas cruzadas.

Para pacientes pediátricos neonatos, especialmente prematuros, se requieren tomar 2 ml de sangre venosa recogida en un tubo con anticoagulante EDTAK<sub>3</sub> y para las pruebas de detección de anticuerpos irregulares y pruebas cruzadas, se deberá trabajar con el suero de la madre.

Las muestras de los receptores y un fragmento de la tubuladura del componente sanguíneo transfundido deberán ser almacenados a 4 °C durante los 7 días posteriores a la Transfusión Sanguínea, posteriormente, deberán ser descartados.

En aquellos casos que el paciente requiera de una nueva transfusión pasadas 48 horas, será pertinente tomar una nueva muestra.

## **B) REACTIVOS**

### **PARA DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO SISTEMAS ABO Y Rh**

Se requieren sueros hemoclasificadores que contengan anticuerpos monoclonales Anti-A, Anti-B, Anti-AB y para el Anti-D, es ideal contar con un reactivo que contenga una mezcla de anticuerpos monoclonales y policlonales humanos IgM/IgG, conocidos como “Blend” que significa en inglés “Mezcla”.

Para la preparación de suspensiones celulares así como para el lavado de células se utilizará SSFE o SSFE tamponada con PBS.

### **PARA PRUEBA INVERSA O SÉRICA**

Se utilizarán en la prueba inversa HEMATÍES DE FENOTIPO CONOCIDO A, B y O suspendidos al 5% en SSFE, SSFE tamponada con PBS o Solución Alsever.

Los hematíes pueden ser de procedencia comercial o preparados en el Servicio de Sangre y deben ser controlados cada día para evidenciar que no existan signos de hemólisis, presencia coágulos, signos de contaminación y además deben dar reacciones claras e inequívocas (control de especificidad) en los controles de calidad que se realizan diariamente.

Es importante incluir en la batería de tubos un auto control del donante o paciente según sea el caso, que incluya el suero o plasma con sus propios glóbulos rojos en suspensión al 5% a fin de poder descartar la presencia auto anticuerpos.

### **PARA LA PRUEBA CRUZADA**

#### **■ REACTIVOS POTENCIADORES DE REACCIÓN**

- ✓ Albumina Sérica Bovina al 22%
- ✓ Solución de Baja Fuerza Iónica LISS
- ✓ Solución de Bromelina (opcional)

#### **■ REACTIVO DE COOMBS POLIESPECÍFICO**

Anti Inmunoglobulina Humana Anti-Ig G, Anti-C<sub>3</sub>d (verde)

#### **■ CÉLULAS CONTROL DE COOMBS**

Las células control de Coombs son hematíes humanos Grupo O Rhesus D-positivo que han sido sensibilizados “*in vitro*” con diferentes cantidades de anticuerpos anti-D (IgG) (Ver Apéndice 4).

## 6. TÉCNICAS

Se podrán realizar técnicas en tubo, así como también el Sistema de Micro aglutinación en columna con partículas de gel.

## 7. ACCIONES PRELIMINARES

Atemperar los reactivos hemoclasificadores Anti-A, Anti-B, Anti-AB y las Células ABO.

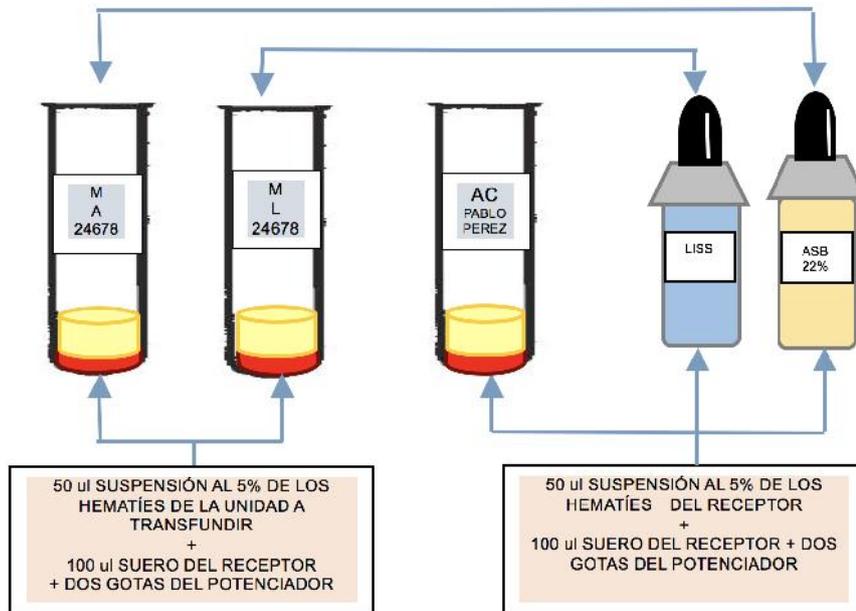
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario de Reactivos Hemoclasificadores y Células Reactivas.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario del Reactivo de Coombs.
- 🔥 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.
- 🔥 Verificar que el fragmento de la tubuladura corresponda al componente sanguíneo seleccionado para la prueba cruzada.
- 🔥 Identificar cuidadosamente los tubos de ensayo conteniendo las muestras del receptor y la muestra (fragmento de tubuladura) de la unidad de sangre o componente sanguíneo a transfundir.
- 🔥 Centrifugar a 3,500 rpm durante 10 minutos para separar el paquete de células del suero/plasma, los tubos de ensayo que contienen la muestra del receptor y que fue recogida idealmente en dos tubos con y sin anticoagulante. En casos de transfusiones Inmediatas, el procedimiento puede ser reducido a 5 minutos de centrifugación a 3,500 rpm.
- 🔥 Cortar la tubuladura en uno de sus extremos con tijeras de acero inoxidable desinfectadas únicamente destinadas para esta finalidad, colocar el extremo cortado sujetándolo para que quede al interior de la parte superior del tubo procediendo luego a cortar el extremo aún intacto y el contenido se vaciará en el tubo de ensayo.
- 🔥 En caso de sangre total o paquete globular, se aconseja realizar al menos dos lavados de los hematíes obtenidos de la tubuladura mediante centrifugación a 2,500 rpm por 3 minutos, esto para eliminar restos de anticoagulante y preparar una suspensión al 5% en SSFE o SSFE tamponada con PBS.
- 🔥 En el caso de transfusión de Plasma Fresco Congelado, Plasma Congelado y Crioprecipitados, se debe obtener un fragmento de la tubuladura de la unidad y descongelar únicamente este fragmento dentro de un tubo de ensayo ya sea mediante calor seco (estufa de incubación destinada para pruebas Inmunoematológicas) o en Baño María a 37°C para realizar las pruebas cruzadas, si la unidad es compatible con el receptor, entonces recién se debe proceder a descongelar toda la unidad preparando la misma para su despacho.
- 🔥 Lavar los hematíes del receptor tres veces a 2.500 rpm durante 3 minutos y se procede a preparar una suspensión al 5% en SSFE o SSFE tamponada con PBS para realizar las determinaciones de grupo sanguíneo sistema ABO y Rh mediante prueba directa así como el Test de Coombs Directo según el procedimiento descrito en el capítulo 5.
- 🔥 Con el suero realizar la prueba inversa y la Detección de Anticuerpos Irregulares según la técnica descrita en el capítulo 6.

- Confirmar los grupos sanguíneos de los fragmentos de las tubuladuras mediante prueba directa Sistemas ABO y Rh en caso de transfusión de paquetes globulares y sangre total.
- Confirmar mediante Prueba Inversa el grupo (sistema ABO) de los fragmentos de tubuladuras de Concentrados Plaquetarios, Plasma Fresco Congelado, Plasma Congelado y Crioprecipitados idealmente.

## 8. PROCEDIMIENTO PRUEBA CRUZADA LADO MAYOR

- Rotular dos tubos de ensayo, uno con la denominación "M" además del número de la unidad que está siendo testada y el segundo con la denominación AC (Auto Control) y las iniciales o nombre del receptor.
- Dispensar en ambos tubos 100 ul del suero del receptor, en el tubo marcado M: 50 ul de la suspensión al 5% de los hematíes preparados a partir de la tubuladura de la unidad a transfundir y en el tubo AC 50 ul de la suspensión al 5% de los hematíes del receptor.

En el caso de trabajar con dos potenciadores de reacción se tendría un tercer tubo identificado como M, el número de la unidad y la inicial del potenciador utilizado, como se puede apreciar en el ejemplo expuesto en el gráfico N° 6 a continuación:



**Gráfico N° 6.** Explicación de la realización de la Técnica para la determinación de la Prueba Cruzada Lado Mayor.

- Centrifugar inmediatamente a 1000 rpm durante un minuto y proceder a la lectura con ayuda de la fuente de luz del rhesuscopio, en caso de presentarse aglutinación, implicaría incompatibilidad del sistema ABO, o la presencia de anticuerpos de tipo Ig M, en el suero del receptor que no hubieran sido demostrados en la prueba de detección de anticuerpos irregulares realizada en la etapa preliminar de las pruebas de compatibilidad pre transfusional.

En este caso, se procede de inmediato a seleccionar otra unidad para empezar nuevamente el procedimiento de la prueba cruzada.

d) En caso de que no exista ninguna evidencia de aglutinación y la unidad presumiblemente sea compatible hasta este momento, se continúa con la fase térmica en la que se requiere incorporar un potenciador de reacción de acuerdo a las siguientes posibilidades:

- Si se contara con ASB 22%, dispensar dos gotas del reactivo directamente del frasco que cuenta con gotero tanto al tubo de ensayo marcado como "M ALBÚMINA" como al tubo AUTO-CONTROL y proceder a incubar en Estufa de Incubación a 37°C (cubriendo la parte superior del tubo con papel parafinado) o en Baño María a 37°C durante 15-20 minutos (a no ser que el fabricante del reactivo indicara alguna variación a este tiempo).
- Si se contara con LISS, dispensar dos gotas (100 uL) del reactivo tanto al tubo de ensayo marcado como "M LISS" como al tubo AUTOCONTROL y proceder a incubar en Estufa de Incubación a 37°C (cubriendo la parte superior del tubo con papel parafinado) o en Baño María a 37°C durante 10 minutos (a no ser que el fabricante del reactivo indicara alguna variación a este tiempo). En casos de requerirse transfusiones inmediatas, el tiempo de incubación puede reducirse a 5 minutos.
  - › También es válido, preparar una suspensión de los hematíes procedentes de la tubuladura del componente sanguíneo a transfundir al 5% directamente en LISS, en un tubo rotulado como M, el número de la unidad y la letra "L" de LISS, se dispensan 50 uL de dicha suspensión de hematíes y 100 uL del suero del receptor y se procede a la incubación respetando los tiempos establecidos por el fabricante del reactivo.

e) Culminado el tiempo de incubación, centrifugar inmediatamente a 1000 rpm durante un minuto y proceder a la lectura con ayuda de la fuente de luz del rhesuscopio, en caso de ser evidente la reacción de aglutinación, implicaría incompatibilidad, y habría que seleccionar otra unidad y empezar el procedimiento nuevamente.

Siendo negativa la presencia de aglutinación, y presumiblemente compatible la unidad hasta este momento, se procede con la siguiente fase de la prueba.

- f) Realizar tres lavados de 3 minutos a 2.500 rpm, con SSFE o SSFE tamponada con PBS, después del último lavado, en el que se debe eliminar al máximo la solución salina realizando la maniobra de volcar los tubos sobre papel absorbente, dispensar 2 gotas del reactivo de Coombs a los tubos de ensayo que podrán ser uno o dos según se utilizó uno o dos potenciadores de reacción y al tubo AUTOCONTROL para luego centrifugar un minuto a 1000 rpm.
- g) Proceder a la lectura con ayuda de la fuente luz del rhesuscopio; no debiendo existir aglutinación en ninguno de los tubos, para que la unidad sea COMPATIBLE, sin embargo, para realizar la aseveración se debe continuar con el siguiente paso.
- h) Finalmente, para corroborar que el procedimiento se realizó de manera correcta, se deben dispensar 50 uL de las Células Control de Coombs que se preparan regularmente en cada Servicio de Sangre, siguiendo las recomendaciones del Apéndice 4 y centrifugar inmediatamente a 1000 r.p.m. durante un minuto y proceder a la lectura con ayuda de la fuente luz del rhesuscopio.

Únicamente si las reacciones negativas se tornan positivas se confirma la compatibilidad de la unidad testada.

## 9. INTERPRETACIÓN

La existencia de aglutinación es indicativo de que la unidad es incompatible, caso contrario, de no existir aglutinación es indicativo de que la unidad es compatible.

Los resultados positivos se interpretan de 1 a 4 cruces de aglutinación, sin dejar de considerar que la presencia de hemólisis implica también incompatibilidad.

Para tener una relación entre la presencia de aglutinados y la correspondiente asignación de las cruces de aglutinación, referirse al Apéndice 14.

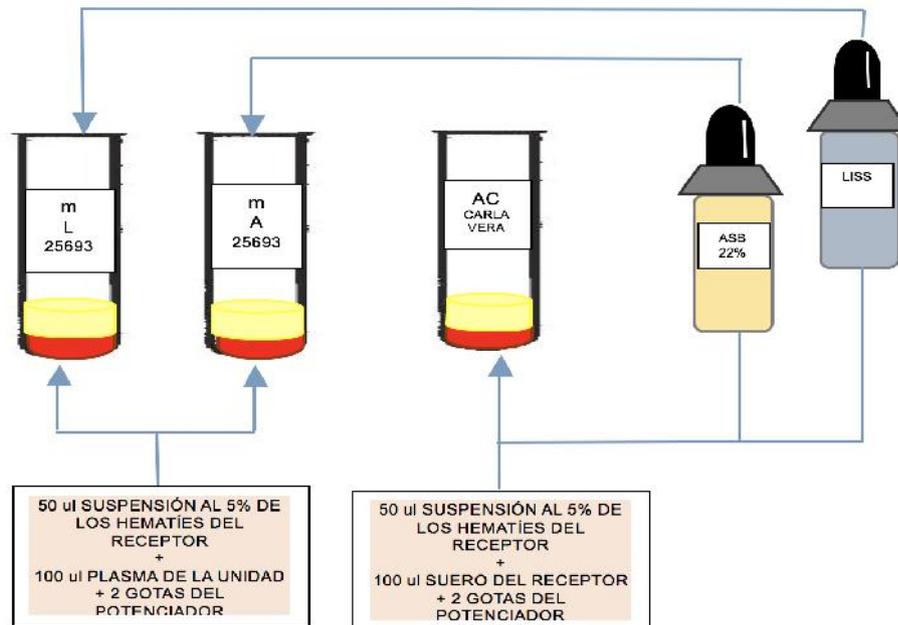
## 10. PROCEDIMIENTO PRUEBA CRUZADA LADO MENOR

- a) Rotular dos tubos de ensayo, uno con la denominación “m” además del número de la unidad que está siendo testada y el segundo con la denominación AC (Auto Control) y las iniciales o nombre del receptor.

En el caso de trabajar con dos potenciadores de reacción se tendría un tercer tubo identificado como m, el número de la unidad y la inicial del potenciador utilizado.

- b) Dispensar 100 uL del plasma de la unidad a transfundir, en el tubo marcado m además de 50 uL de la suspensión al 5% de los hematíes del receptor.
- c) Dispensar 100 ul del suero del receptor y 50 ul de sus hematíes en suspensión al 5% en el tubo marcado AC.
- d) Centrifugar inmediatamente a 1000 rpm durante un minuto y proceder a la lectura con ayuda de la fuente luz del rhesuscopio, en caso de ser positiva la reacción de aglutinación, implicaría incompatibilidad del sistema ABO, o la presencia de anticuerpos irregulares en plasma del componente a transfundir contra antígenos presentes en la membrana de los hematíes del receptor. En este caso, se procede de inmediato a seleccionar otra unidad para empezar nuevamente el procedimiento de la prueba cruzada.
- e) En caso de que no exista evidencia de aglutinación y la unidad presumiblemente sea compatible hasta este momento, se continúa con la fase térmica en la que se requiere incorporar un potenciador de reacción de acuerdo a las siguientes posibilidades:
- Si se contara con ASB 22%, dispensar dos gotas del reactivo directamente del frasco que cuenta con gotero tanto al tubo de ensayo marcado como “m ALBUMINA” como al tubo AUTO-CONTROL y proceder a incubar en Estufa de Incubación a 37°C (cubriendo la parte superior del tubo con papel parafinado) o en Baño María a 37°C durante 15-20 minutos, a no ser que el fabricante del reactivo indicara alguna variación a este tiempo.
  - Si se contara con LISS, dispensar dos gotas (100 uL) del reactivo tanto al tubo de ensayo marcado como “m LISS” como al tubo AUTOCONTROL y proceder a incubar en Estufa de Incubación a 37°C (cubriendo la parte superior del tubo con papel parafinado) o en Baño María a 37°C durante 10 minutos, a no ser que el fabricante del reactivo indicara alguna variación a este tiempo. En casos de requerirse transfusiones inmediatas, el tiempo de incubación puede reducirse a 5 minutos.
  - › También es válido, preparar una suspensión de los hematíes del receptor al 5% directamente en LISS, en un tubo rotulado como m con el número de la unidad y la letra “L” de LISS, se dispensan 50 uL de dicha suspensión de hematíes y 100 uL del componente sanguíneo que contiene plasma a transfundir y se procede a la incubación respetando los tiempos establecidos por el fabricante del reactivo.

**Gráfico N° 7.** Explicación de la realización de la Técnica para la determinación de la Prueba Cruzada Lado Menor.



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

- f) Culminado el tiempo de incubación, centrifugar inmediatamente a 1000 rpm durante un minuto y proceder a la lectura con ayuda de la fuente de luz del rhesuscopio, en caso de existir aglutinación implicaría incompatibilidad, habría que seleccionar otra unidad y empezar el procedimiento nuevamente.

Siendo negativa la presencia de aglutinación, y presumiblemente compatible la unidad hasta este momento, se procede con la siguiente fase de la prueba.

- g) Realizar tres lavados de 3 minutos a 2.500 rpm, con SSFE o SSFE tamponada con PBS, después del último lavado, en el que se debe eliminar al máximo la solución salina realizando la maniobra de volcar los tubos sobre papel absorbente, dispensar 2 gotas del reactivo de Coombs a los tubos de ensayo que podrán ser uno o dos según se utilizó uno o dos potenciadores de reacción y al tubo AUTOCONTROL para luego centrifugar un minuto a 1000 rpm.
- h) Proceder a la lectura con ayuda de la fuente luz del rhesuscopio; no debiendo existir aglutinación en ninguno de los tubos, para que la unidad sea COMPATIBLE, sin embargo, para realizar la aseveración se debe continuar con el siguiente paso.
- i) Dispensar 50 ul de las Células Control de Coombs a todos los tubos de ensayo y centrifugar inmediatamente a 1000 rpm durante un minuto procediendo a realizar la lectura con ayuda de la fuente luz del rhesuscopio.

El resultado debe ser positivo después de la adición de las células control de Coombs para validar los resultados de la prueba.

## 11. INTERPRETACIÓN

La existencia de aglutinación es indicativo de que la unidad es incompatible, caso contrario, de no existir aglutinación es indicativo de que la unidad es compatible.

Los resultados positivos se interpretan de 1 a 4 cruces de aglutinación, sin dejar de considerar que la presencia de hemólisis implica también incompatibilidad.

Para tener una relación entre la presencia de aglutinados y la correspondiente asignación de las cruces de aglutinación, referirse al Apéndice 14.

En el caso de haberse utilizado dos potenciadores de reacción basta que una unidad sea incompatible en uno de los medios, no se debe transfundir dicha unidad y se deberá testar otra.

## 12. INFORME DE RESULTADOS

El informe de resultados deberá referir el resultado como se detalla en los siguientes ejemplos:

**PRUEBA CRUZADA LADO MENOR: RESULTADO COMPATIBLE** DE LA UNIDAD 25693 DE PFC PARA LA PACIENTE CARLA VERA.

**PRUEBA CRUZADA LADO MAYOR: RESULTADO INCOMPATIBLE** DE LA UNIDAD 24678 DE PG PARA EL RECEPTOR PABLO PEREZ.

## 13. COMENTARIOS

El hecho de que se presenten casos de incompatibilidad en pruebas cruzadas Lado menor no necesariamente implica que no se realizaron o que se realizaron de manera inadecuada las pruebas de Detección de Anticuerpos Irregulares en los Bancos de Sangre, sino; que el panel de células utilizado comercialmente si bien contiene los hematíes que poseen los principales antígenos que son capaces de desencadenar una respuesta de producción de anticuerpos irregulares y posteriormente reacciones post transfusionales y Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido EHRN, puede ser que no contengan los antígenos de la población de nuestro país.

Por citar un ejemplo, los paneles extranjeros carecen de células con antígeno Diego a (Di<sup>a</sup>), presente en un 4% de la población de uno de nuestros países vecinos<sup>(13)</sup>, dando lugar a que se obvie la inclusión de este antígeno en los paneles celulares se hace evidente la posibilidad de no estar identificando los anticuerpos irregulares que existen en esa población.

Debe mencionarse que aunque la Detección de Anticuerpos Irregulares fuese negativa tanto en la unidad a transfundir como en el receptor, pueden darse casos de Prueba cruzada INCOMPATIBLE, asociándose las siguientes causas:

- ✓ Incompatibilidad en centrifugación en la Fase Salina Inmediata por incompatibilidad ABO, fenómenos de poliaglutinación, presencia de Anti A1 en personas grupo A2 o A2B, también por la presencia de aloanticuerpos y auto anticuerpos fríos, formación de Roleaux, o presencia de anti-A y anti-B pasivos.
- ✓ El título del anticuerpo es muy bajo para ser detectado, por ello los paneles celulares deberán incluir células homocigotas para los antígenos anti Duffy anti Kidd especialmente.

Lo importante es que la confirmación de la presencia de anticuerpos irregulares en el receptor así como resultados de pruebas incompatibles deben ser identificados y resueltos antes de entregar la unidad de sangre o componente sanguíneo para transfusión.

Idealmente, los Bancos de Sangre deberán contar con los antiseros correspondientes que permitan identificar unidades que sean negativas para el antígeno que corresponde al anticuerpo irregular que se detecta en el receptor.

## CAPÍTULO 4

# REALIZACIÓN DEL TEST DE COOMBS DIRECTO O PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA DIRECTA (PAD) MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO

### 1. RESUMEN

El presente capítulo aporta las directrices para la realización adecuada de la Técnica conocida como Test de Coombs Directo o Prueba de Antiglobulina Humana Directa (PAD), con el objetivo de contribuir a uniformar los procedimientos que se realizan en cada institución.

Tomando en cuenta que no todos los Servicios de Sangre cuentan con la misma tecnología, se consideraron las necesidades primordiales del personal operativo, infraestructura, equipamiento y disponibilidad de reactivos que actualmente existen en los diferentes Servicios de Sangre del país.

Es comprensible que condiciones técnicas, operativas, de infraestructura, etc., varían de un Servicio de Sangre a otro, sin embargo, no puede variar en ninguno de ellos la forma coherente y pertinente de realizar las técnicas, sean éstas básicas como la técnica en tubo o una técnica más moderna como la Técnica de Microaglutinación en columna con partículas de gel.

### 2. ALCANCE

Estas recomendaciones deberán ser aplicadas en Servicios de Transfusión antes de realizar cualquier Transfusión Sanguínea con el objetivo de averiguar si el receptor no se encuentra “sensibilizado”, vale decir si sus hematíes no se han recubierto “*in vivo*” con anti Ig-G, anti-C3d o ambos.

Así también, cuando los Bancos de Sangre reciban órdenes médicas que soliciten la prueba, la misma, podrá ser efectuada.

Es pertinente su realización dentro de la investigación de una reacción post transfusional inmediata o en el Diagnóstico de Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN), en Anemias Hemolíticas de tipo auto inmune o de otra etiología como aquellas inducidas por fármacos, Lupus eritematoso sistémico (LES), etc.

### 3. INTRODUCCIÓN

En 1908 Moreschi realizó el descubrimiento de que al juntar bacterias y glóbulos rojos, estos no aglutinaban si se ponían en contacto con el suero inmune específico, pero que cambiaba totalmente la situación, es decir que la aglutinación era evidente, si se incluía dentro del sistema, un suero elaborado inmunizando animales y que en consecuencia estaba dirigido contra los primeros anticuerpos estudiados.

A este hecho, no se le dio la importancia que correspondía hasta que otro investigador se interesó por los hallazgos descritos y retomó las investigaciones muchos años después.

Es de esta manera que la prueba de Coombs fue descrita en el año 1945 por primera vez por los

científicos Rob Race, Arthur Morant, y Robin Coombs (por quien la prueba fue llamada así, llevando el apellido de este investigador).

Entre 1947 y 1969 otro investigador apellidado Dacie aplicó el test desarrollado por Race, Morant y Coombs para el estudio de anemias hemolíticas y demostró que la prueba también tiene gran utilidad en estos casos, demostrando la sensibilización de hematíes, por factores del complemento, específicamente por la fracción  $C_{3d}$ .<sup>(8)</sup>

La **prueba de Coombs Directa o test de Coombs Directo** (también conocida como Prueba de Antiglobulina Humana PAD), es ampliamente utilizada en Inmunohematología y como se puede evidenciar en los párrafos previos, data del siglo precedente y aún en nuestros días tiene importante valor diagnóstico para diferentes patologías.

Para afianzar conceptos, es necesario establecer de manera general, que hay dos tipos distintos de Pruebas de Coombs: el test o prueba directa y el test o prueba indirecta.

La **prueba de Coombs directa** (o Prueba de Antiglobulina humana Directa PAD) detecta anticuerpos ya unidos a la superficie de los hematíes "*in vivo*".

Para el procesamiento de la técnica, **la muestra que se utiliza son hematíes.**

La **prueba de Coombs indirecta** (o Prueba de Antiglobulina humana Indirecta PAI), detecta anticuerpos libres que pueden reaccionar "*in vitro*" con hematíes que tienen los antígenos específicos.

Para el procesamiento de la técnica, **la muestra que se utiliza es suero.**

El común denominador en ambas pruebas es el uso de un reactivo, específicamente de un antisuero, llamado "Reactivo de Coombs" que en cuanto a su composición es una Anti-Inmunoglobulina Humana, que contiene anticuerpos de animales, generalmente conejos, cobayos y ratones, dirigidos contra IgG, IgM, y/o complemento humano.

Estos anticuerpos se unen a los anticuerpos unidos a los antígenos que están en la superficie de los hematíes, originando aglutinación de las células, correspondiendo a un resultado positivo, así como la ausencia de aglutinación corresponde a un resultado negativo.

La prueba de Coombs Indirecta forma parte de la última fase de las Pruebas Cruzadas llamada Fase Antiglobulínica, así como también de las técnicas de Detección e Identificación de Anticuerpos Irregulares.

En cuanto a la toma de decisión y la utilidad de estas pruebas, la siguiente tabla resume los casos en los que pueden ser utilizadas ambas:

**Tabla N° 9** Toma de Decisión para la utilización de las Pruebas de Coombs

PRUEBA DE COOMBS DIRECTA	PRUEBA DE COOMBS INDIRECTA
Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido EHRN	Parte de las Pruebas Cruzadas (fase final de las mismas llamada Fase Antiglobulínica)
Anemia hemolítica por auto anticuerpos, Anemia hemolítica inducida por fármacos (penicilina, cefalotina, rifampicina, metildopa, etc.) <sup>(14)</sup>	Parte final de las pruebas de Detección e Investigación de Anticuerpos Irregulares
Linfomas, Leucemia Linfocítica Crónica, Lupus Eritematoso Sistémico, algunos carcinomas, enfermedades hepáticas, Infección por Mononucleosis Infecciosa.	Investigación de reacciones transfusionales de tipo tardío (cuando el organismo ya formó los anticuerpos correspondientes)
Investigación de reacciones transfusionales de tipo inmediato, aunque también una reacción transfusional hemolítica tardía podría dar lugar a un resultado de Coombs Directo en campo mixto cuando se utiliza la técnica de Micro aglutinación con partículas de gel.	Seguimiento a mujeres embarazadas Rh D NEGATIVO que tienen anticuerpos Anti-D, evaluando título de los mismos

Fuente: López Miuril Marina., Tesis para obtener Título de Maestra en Ciencias en Patología: "PATOLOGÍAS MÁS FRECUENTES ASOCIADAS A LA FORMACIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS ERITROCITARIOS", Universidad de San Carlos de Guatemala, 2014.<sup>14</sup>

En el presente capítulo, no se realizarán mayores consideraciones sobre la Prueba Indirecta ya que serán detalladas a cabalidad cuando se describan las recomendaciones para las determinaciones de Detección e Identificación de Anticuerpos Irregulares, así como en las Técnicas de Pruebas Cruzadas, por tanto el enfoque del presente procedimiento irá directamente orientado al Test de Coombs Directo.

#### 4. DEFINICIONES IMPORTANTES

##### 4.1. ANTICUERPO MONOCLONAL

Anticuerpo específico contra un antígeno y que es producido por un hibridoma de célula B (una línea celular derivada por la fusión de una sola célula B normal con una línea tumoral de células B inmortales).

Los anticuerpos monoclonales se usan extensamente en investigación, diagnóstico clínico y tratamientos, así como en la preparación de reactivos.

##### 4.2. CLONA

Población de células genéticamente idénticas, derivadas de divisiones sucesivas de una sola célula progenitora.

##### 4.3. REACTIVO ANTI INMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI Ig G - ANTI C<sub>3d</sub>: REACTIVO DE COOMBS

El reactivo contiene Anti-IgG obtenida a partir de la inmunización de conejos con actividad no específica, que se elimina mediante técnicas de absorción, y al mismo tiempo, contiene IgM monoclonal murina con especificidad Anti-C<sub>3d</sub>.

Debido a esta peculiar composición del reactivo, es que es denominado poliespecífico.

Los anticuerpos se diluyen en una solución tamponada que contiene Albúmina Sérica Bovina.

Cada reactivo se suministra en una dilución óptima para su uso con técnicas en tubo o en tarjetas con gel inerte en el caso de la técnica de Micro aglutinación en columna con partículas de gel.

El reactivo incluye un colorante que le da el tono verde característico.

También existen reactivos de Coombs mono específicos, vale decir que detectan únicamente Anti-IgG o Anti-C<sub>3d</sub>.

#### **4.4. CONTROL POSITIVO COOMBS**

Está constituido por células que se encuentran recubiertas por anticuerpos y que al unirse al reactivo de Coombs hacen evidente la reacción de aglutinación.

Se utilizan de manera paralela cada vez que se realiza un Test de Coombs Directo a un paciente, siendo el control positivo que permite comparar la presencia de los aglutinados.

#### **4.5. CONTROL NEGATIVO COOMBS**

Está constituido por células que NO se encuentran recubiertas por anticuerpos y que al unirse al reactivo de Coombs NO hacen evidente la reacción de aglutinación.

Se utilizan de manera paralela cada vez que se realiza un Test de Coombs Directo a un paciente, siendo el control negativo el que da la certeza de que el reactivo no está reaccionando de manera inespecífica.

### **5. DESARROLLO**

#### **A) MUESTRA**

La muestra adecuada es sangre recogida con anticoagulante EDTAK<sub>3</sub>, 4 ml en el caso de adultos y de 1-2 ml en el caso de niños.

El uso de tubos con anticoagulante permite la conservación de los hematíes en condiciones óptimas para preparar adecuadamente la suspensión celular.

#### **B) REACTIVOS**

##### **SOLUCIÓN FISIOLÓGICA ESTÉRIL SSFE**

La solución salina fisiológica estéril SSFE al 0,9% ó SSFE tamponada con PBS podrán ser utilizadas para preparar las suspensiones de hematíes.

##### **REACTIVO ANTI INMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI Ig G - ANTI C<sub>3d</sub>: REACTIVO DE COOMBS**

Reactivo que contiene tanto Anti-IgG humana como Anti-C<sub>3d</sub>.

### **6. TÉCNICAS**

Las técnicas utilizadas para la determinación de la Prueba de Coombs Directa pueden ser realizadas en tubo así como también mediante la Técnica de Microaglutinación con partículas de gel. En

el presente documento, se hará referencia a la prueba en tubo ya que puede ser realizada en todos los Servicios de Sangre del país sin mayores inconvenientes.

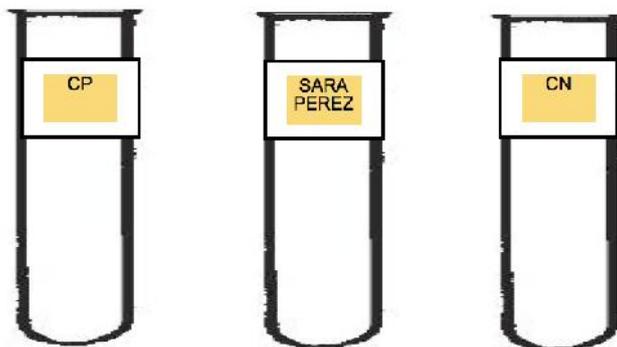
## 7. ACCIONES PRELIMINARES

- 🔴 Atemperar el reactivo de Coombs a temperatura ambiente, 20 minutos antes de iniciar el procedimiento.
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario de Células Control de Coombs.
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica.
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario del Reactivo de Coombs.
- 🔴 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.

## 8. PROCEDIMIENTO

- a) Identificar correctamente los tubos de ensayo con las iniciales del paciente, o del receptor, el tubo CP (Control Positivo) y CN (Control Negativo).

**Gráfico N° 8.** Preparación de batería de tubos de ensayo y rotulación de los mismos para la realización del Test de Coombs Directo.



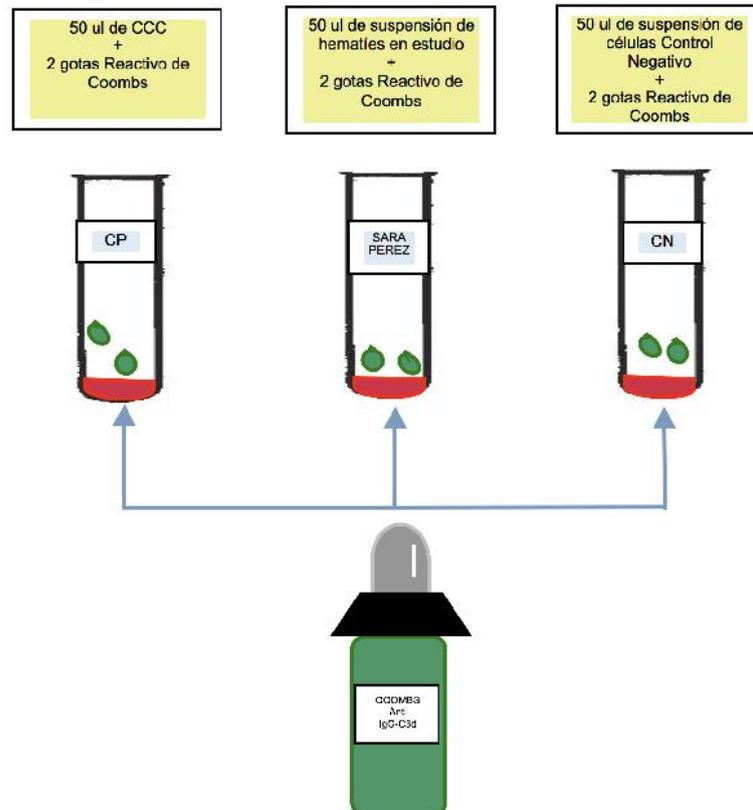
Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

- b) Lavar los hematíes en estudio mediante tres ciclos de centrifugación a 2.500 rpm durante 3 minutos cada lavado. Se sugiere utilizar pipetas Pasteur descartables para los dos primeros lavados y para el tercero, volcando el tubo sobre un papel absorbente, eliminar al máximo la solución de lavado remanente.
- c) Preparar una suspensión de hematíes al 5% en SSFE o en SSFE tamponada con PBS. El volumen para preparar esta suspensión puede ser de 300 a 500 ul, ya que únicamente se precisan 50 ul por determinación, por tanto este volumen es el adecuado.
- d) Dispensar 50 ul de la suspensión de hematíes preparada al 5% en el tubo destinado para el paciente, 50 ul de CCC al tubo marcado con CP (Control Positivo) y 50 ul de células CN, al tubo marcado con CN (Control Negativo), se debe recordar, que estas células utilizadas como control negativo son células de otros donantes o pacientes a los cuales se les realizó un test de Coombs Directo y se obtuvo resultado negativo.
- e) Dispensar dos gotas utilizando el gotero del frasco del Reactivo de Coombs a cada uno de los tubos de ensayo. Se puede dejar el tubo 5-10 minutos a temperatura ambiente y luego proceder a la centrifugación del mismo a 1000 rpm durante 1 minuto.

- f) Proceder a la lectura con ayuda de la fuente luz del rhesuscopio. En el caso de que exista aglutinación en el tubo del CP (Control Positivo) y no exista aglutinación en los tubos CN (Control Negativo) y el tubo del paciente, se deben añadir 50 ul de las CCC y centrifugar un minuto a 1000 rpm, posteriormente realizar la lectura y únicamente si la reacción negativa observada en ambos tubos se torna positiva, se valida la negatividad del resultado de los hematíes en estudio.
- g) En el caso de que exista aglutinación positiva en el tubo del paciente, así como en el tubo del CP y no así en el tubo CN, se deben añadir a este último, 50 ul de las CCC y centrifugar un minuto a 1000 rpm, si la reacción se torna positiva en el CN, se valida la prueba y se considera el resultado positivo de los hematíes en estudio.
- h) Finalmente si en cualquiera de las situaciones descritas existiera aglutinación en el tubo de CN, habrá que considerar la prueba inválida y se deberá repetir la determinación. En caso de que persistiera el resultado, se debe descartar una posible contaminación bacteriana y/o fúngica del reactivo de Coombs, así como también la posibilidad de que el reactivo se encuentre vencido.
- i) Existe una variante a esta técnica, denominada Prueba o Test de Coombs potenciado, el cual incluye en el procedimiento un paso adicional de incubación a 37 °C por un periodo de tiempo de 10 minutos. Esta técnica podría utilizarse para casos peculiares, en los cuales la clínica que muestra un paciente no coincide con un resultado negativo o, si el Servicio de Sangre ve pertinente adaptarla como técnica de rutina también será considerada válida ya que favorecería la detección del factor C<sub>3d</sub> y por tanto se tiene una opción adicional de poder evidenciar hemólisis.<sup>(31)</sup>

A continuación se resume gráficamente la dispensación de reactivos de la técnica previamente descrita, recordando que se deben seguir los pasos de centrifugación y lectura, o incubación-centrifugación-lectura:

**Gráfico N° 9.** Explicación del procedimiento para la realización de la Técnica de Coombs Directo.



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

## 9. INTERPRETACIÓN

La reacción que se produce después de la última centrifugación previa a la adición de las CCC, debe ser leída con ayuda de una fuente de luz proporcionada por un rhesuscopio y se interpreta en cruces según la tabla en la que se relacionan los grados de intensidad de la reacción de aglutinación referidos en el Apéndice 14, posteriormente se validan los resultados cuando las reacciones negativas se tornan positivas al dispensar las Células Control de Coombs (CCC), se centrifuga y se lee la reacción.

## 10. INFORME DE RESULTADOS

En cuanto al informe de resultados, el Test de Coombs Directo se reporta: POSITIVO o NEGATIVO. En casos especiales mediante solicitud expresa del médico tratante, se puede realizar un Test de Coombs Cuantitativo, en el cual, se realizan diluciones dobles seriadas del reactivo de Coombs con SSFE, SSFE tamponada con PBS, o con una solución de ASB al 3% preparada a partir del reactivo ASB 22% y diluida con SSFE.

Se procede de la misma manera que el Test de Coombs cuya técnica fue descrita y se informa hasta que título el resultado sigue siendo positivo.

## 11. COMENTARIOS

Como se mencionó previamente las CCC se emplean en Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión constituyendo un control analítico ante un resultado negativo de la Prueba de Antiglobulina Humana.

Su uso no es universal en nuestro medio debido, fundamentalmente, a la disponibilidad insuficiente de células comerciales y a la corta durabilidad de las células preparadas por los Servicios de Sangre, sin embargo a partir de las directrices proporcionadas en el presente Manual de Procedimientos Operativos, se tienen las herramientas necesarias para que su preparación constituya un procedimiento de rutina.

## CAPÍTULO 5

# DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES ERITROCITARIOS MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO

### 1. RESUMEN

La detección e identificación de anticuerpos irregulares juega un papel fundamental en la Medicina Transfusional. Es un proceso clave en las pruebas realizadas a todos los donantes de sangre para evitar la aloinmunización de los receptores, así como también en las pruebas de compatibilidad pre transfusional sin dejar de lado la importancia que revisten para el diagnóstico y pronóstico de otros procesos de tipo inmune como la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido.

La incidencia de los anticuerpos irregulares es variable, puede ser mínima o cero en quienes no se han expuesto nunca a una transfusión o a un embarazo y alta en quienes han recibido múltiples transfusiones o en mujeres multíparas.

La incidencia de los anticuerpos irregulares depende también de las características demográficas de la población estudiada, así como del método utilizado para la determinación de los anticuerpos. Hay que tomar en cuenta que los anticuerpos que son considerados clínicamente significativos son aquellos que disminuyen la sobrevida de los eritrocitos o causan enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido mientras que los no significativos no están asociados con los dos puntos anteriormente expuestos.

Tanto para realizar la correcta detección e identificación del anticuerpo irregular, así como para discernir si el anticuerpo tendrá significancia clínica, es muy importante contar con técnicas estandarizadas en los Servicios de Sangre que permitan trabajar de manera adecuada al operador.

Este capítulo presenta las recomendaciones para llevar a cabo el procedimiento de las pruebas de Detección e Identificación de Anticuerpos Irregulares mediante la técnica en tubo, mismas que contribuirán a garantizar la calidad de las determinaciones y evitar al máximo reacciones post transfusionales, aloinmunización al receptor por fallos durante el proceso analítico previo a toda Transfusión Sanguínea, así como en casos de Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido.

### 2. ALCANCE

Las recomendaciones del presente capítulo, van dirigidas a Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión.

Quedando establecido que, en los Bancos de Sangre se deben detectar e identificar los anticuerpos irregulares en todas las muestras procedentes de las unidades donadas y en los Servicios de Transfusión, al momento de realizar las pruebas de compatibilidad pre transfusional, se debe incluir la Detección de Anticuerpos Irregulares, mediante la utilización de paneles de detección de anticuerpos irregulares anti eritrocitarios, adquiriéndolos de manera comercial o preparándolos en cada servicio, tomando como recomendación las instrucciones descritas en el Apéndice 5.

Una vez que el anticuerpo irregular hubiera sido detectado, la muestra deberá ser remitida al Banco de Sangre para que en esta instancia se proceda a la confirmación del resultado y posterior identificación del mismo.

Se hace énfasis en el aspecto relacionado con el hecho de que si un Servicio de Transfusión detectara la presencia de algún anticuerpo irregular en el receptor, se deberá enviar la muestra al Banco de Sangre para que sea en esta instancia, en la que se procedan a realizar las pruebas cruzadas, idealmente con unidades que carezcan del antígeno contra el cual el paciente/receptor presenta los anticuerpos irregulares (de acuerdo a si se cuenta o no con los antisueros correspondientes). Caso contrario; se deberá testar de manera aleatoria varias unidades isogrupo hasta lograr conseguir la unidad que sea compatible para el receptor.

### 3. INTRODUCCIÓN

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, embarazo, trasplante), por incompatibilidad materno-fetal e incluso pueden aparecer sin un estímulo que sea identificable.<sup>(13)</sup>

En nuestro país, los anticuerpos irregulares encontrados en donantes de sangre presentan una frecuencia de 0,5 al 2%, porcentajes aceptables y comparables a los descritos en estudios a nivel internacional según el resultado de tres estudios que se realizaron bajo las características resumidas en la tabla siguiente:

**Tabla N° 10** Resumen de los resultados de la Frecuencia de Anticuerpos Irregulares en Donantes de Sangre, según investigaciones realizadas en los Bancos de Sangre de Referencia Departamental de Santa Cruz, Cochabamba y La Paz - Estado Plurinacional de Bolivia

AUTORA	RESULTADOS DE ANTICUERPOS IRREGULARES MÁS FRECUENTES	AÑO DEL ESTUDIO Y TAMAÑO MUESTRAL	OBSERVACIONES
Dra. Fabiana Escalante Pedraza BSRD de Santa Cruz <sup>17</sup>	Anticuerpo anti Le <sup>a</sup> presente en un 95% y anti-K en un 5% de los casos detectados e identificados de anticuerpos irregulares presentes en donantes de sangre que acudieron al Banco de Sangre de Referencia Departamental de Santa Cruz.	Análisis retrospectivo años 2013 (19.346 donantes con un 1% de presencia de Anticuerpos Irregulares) y 2014 (21.395 donantes con un 2% de presencia de Anticuerpos Irregulares).	La frecuencia del anticuerpo anti-K (5%), coincide exactamente con la frecuencia detectada en la investigación realizada en el Departamento de La Paz y el porcentaje no está distante del 4% reportado por el BSRD de Cochabamba.
Dra. María Luisa Herrera Rivera BSRD de Cochabamba <sup>18</sup>	En el estudio se tiene como anticuerpo irregular de mayor frecuencia el Anti-Le <sup>a</sup> (Anti Lewis a) con un 40.8%, seguido de  Anti-D con un 10%, Anti E 7.1% y anti K 4% de frecuencia.	Se analizó un total de 115.121 donantes de sangre durante las gestiones 2006 a 2014. Se detectó una frecuencia de <b>0.26%</b> de Anticuerpos Irregulares.	Es importante mencionar que un porcentaje muy importante de anticuerpos no pudieron ser identificados, las razones fueron analizadas y se concluyó que en los paneles puede ser que no existan antígenos propios de nuestra raza, por lo que la autora recomienda elaborar un panel hecho en casa o investigar otros métodos como la técnica de Elución para poder separar los anticuerpos y de esta manera tratar de identificarlos con mayor certeza.  De igual manera otros Anticuerpos Irregulares que se presentaron en la población de donantes analizada, fueron los siguientes: Anti-M, Anti-Le <sup>b</sup> , Anti-C <sup>w</sup> , Anti-C, y con menor frecuencia que los anteriores: Anti-Jka <sup>a</sup> , Anti-Kp <sup>a</sup> , Anti-k, Anti-Fy <sup>a</sup> , Anti-Fy <sup>b</sup> , Anti-P1, Anti-S y Anti-Jk <sup>b</sup> .

<p>Dra. Ana Alicia Rodríguez Bertón BSRD de La Paz<sup>19</sup></p>	<p>En el total de los casos positivos identificados, la presencia de aloanticuerpos cuya especificidad correspondió a Anti Lewis a (Le<sup>a</sup>) 33.5 %, Anti E 11%, Anti P1 8%, Anti M 7%, Anti C<sup>w</sup> 6%, Anti D 5%, Anti KELL (K) 5%, Anti C 3%, Anti c 3%, Anti Duffy a (Fy<sup>a</sup>) 3%, Anti Duffy b (Fy<sup>b</sup>) 3%, Anti Kp<sup>a</sup> 2%, Anti Jk<sup>a</sup> 2%, Anti Js<sup>a</sup> 1,5%, Anti Kidd b (Jk<sup>b</sup>) 1,5%, y otros con una frecuencia menor al 1% finalmente en un <b>4,5%</b> de casos fueron detectados e identificados dos anticuerpos simultáneamente.</p>	<p>Estudio retrospectivo fueron revisados los resultados del tamizaje inmunohematológico de 85,396 donantes efectivos de sangre durante las gestiones 2006 (enero) hasta 2014 (noviembre), registrándose la presencia de anticuerpos irregulares en un <b>0,5%</b> de la población total de hemodonantes.</p>	<p>Otro porcentaje: 33% de los casos fueron: Panaglutininas coincidiendo la tercera parte de este porcentaje con Autoanticuerpos (Coombs Directo y Auto Testigo Positivos) mismos que de acuerdo al título estarían presentes en donantes sanos o ser indicadores de enfermedades autoinmunes o anemias hemolíticas. Las restantes Panaglutininas corresponderían a los anticuerpos que no están dirigidos contra antígenos eritrocitarios, sino más bien son anticuerpos que se presentan sin un estímulo identificable y que no tienen significación clínica. Finalmente un <b>27%</b> de casos positivos no pudieron ser identificados y dieron positividad para el test de crioaglutininas en la mitad de las determinaciones, siendo la otra mitad casos de anticuerpos calientes no factibles de ser identificados mediante el panel celular disponible. Por este motivo se sugiere incluir en la técnica de identificación de anticuerpos irregulares paneles "hechos en casa" llamados también artesanales que incluyan hematies de nuestra población, ya que es posible que los casos no identificables sea debido a que los paneles comerciales que provienen de donantes europeos contengan antígenos diferentes a los que expresan los hematies de habitantes de nuestro país.</p>
---	---	---	--

Fuente: Programa Nacional de Sangre- Ministerio de Salud, con datos obtenidos de las Tesis de Grado de Escalante Pedraza F., Herrera Rivera Ma. L., y Rodríguez Bertón A. A <sup>(14), (15), (16)</sup>

Como conclusión, considerando las tres regiones del país, la frecuencia de anticuerpos irregulares estuvo comprendida entre 0.26% al 2% del total de donantes efectivos de sangre, correspondiendo este valor a lo referido en literatura extranjera mediante estudios que refieren que la frecuencia de anticuerpos irregulares en donantes de sangre podría ir entre 0.12% en países asiáticos, hasta un 2% en México o un 5% en Perú.<sup>(17)</sup>

Existió coincidencia en los resultados de las tres investigaciones, cuando se refiere que el anticuerpo Anti-Le<sup>a</sup>, (Lewis a) es el más frecuente desde 33.5% hasta 95% de frecuencia de todos los anticuerpos irregulares identificados.

Así también existe coincidencia en cuanto a la elevada frecuencia del Anti-K (KELL) desde un 4% hasta un 5% de los anticuerpos irregulares detectados en donantes de sangre, sin dejar de mencionar dos anticuerpos que se presentaron con elevada frecuencia: Anti-D, y Anti-E mismos que son de alto riesgo por ser capaces de causar Reacciones post transfusionales así como también Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido.<sup>(14), (15), (16)</sup>

Ante este hallazgo, si bien no se realizó el estudio para determinar la frecuencia de anticuerpos irregulares en pacientes, toma más peso la importancia de realizar el fenotipado Rh: C, c, E, e, a

los receptores poli transfundidos, mujeres embarazadas, Exanguinotransfusiones, además de pacientes que presenten reacciones transfusionales, ya que la presencia de anticuerpos irregulares en este tipo de pacientes es frecuente.<sup>(18)</sup>

Al encontrarse también que el Anti-K ocupa un lugar importante en cuanto a la frecuencia de anticuerpos irregulares en donantes de sangre, la determinación del antígeno KELL a todas las unidades de sangre provenientes de los hemodonantes, es de suma importancia para no “dejar pasar” este antígeno, cuya inmunogenicidad es relevante y más aún ante la posibilidad de que estuviera presente también con una frecuencia importante en los pacientes así como lo está en donantes de sangre.

En el Apéndice 6 se puede encontrar una relación detallada de los Anticuerpos Irregulares de mayor significación clínica.

La búsqueda y posterior detección de ANTICUERPOS IRREGULARES son pruebas realizadas actualmente en los laboratorios de Inmunohematología de los Bancos de Sangre, sin embargo como ya se mencionó, se deben empezar a realizar paulatinamente como técnicas de rutina en los Servicios de Transfusión a todos los receptores.

La incorporación de esta prueba a las ya efectuadas en los Servicios de Transfusión, es de trascendental importancia, ya que permite que los antígenos y anticuerpos que son detectados y estudiados “*in vitro*”; otorguen una “advertencia” de lo que ocurriría “*in vivo*”, ayudándonos a prevenir la transfusión de sangre incompatible, y así brindar al paciente la máxima seguridad posible y de manera consiguiente; mayor beneficio al recibir una transfusión sanguínea.

Es importante que se tomen en cuenta los aspectos necesarios para controlar procesos y procedimientos por realizar, haciendo énfasis en el control de calidad, tanto de los reactivos utilizados, como los controles de temperatura de Baños María, Termoblocks, Estufas de incubación, Refrigeradores, Congeladores, así como también tener en cuenta los mantenimientos preventivos para asegurar que el número de revoluciones por minuto de las centrifugas, sean las que registran los equipos.

Para ello, se debe establecer un plan de mantenimiento de equipos que asegure dichas condiciones de trabajo. Es importante mencionar, sobre el punto de control de calidad, que la calibración periódica de pipetas automáticas es muy importante ya que el correcto dispensado de volúmenes como establecen las técnicas, es vital para el adecuado desarrollo de las mismas.<sup>(12)</sup>

No se puede dejar de mencionar que los niveles de capacitación de los operadores deben ser óptimos y continuos, considerando también el compromiso y la entrega profesional al realizar cada una de las determinaciones que se realizan en Inmunohematología.

Es importante resaltar que la idea de la preparación de paneles celulares “hechos en casa” o “Made in House” está empezando a tomar cada vez más peso y es innegable el hecho de que, las personas en nuestro país tendrán un perfil antigénico en la membrana de sus hematíes que presentará variación con el perfil de personas europeas.

En Bolivia, se podría trabajar de acuerdo a cada región colectando muestras de personas que viven en los diferentes Departamentos del país.

Los viales podrían estar constituidos por: Frasco o Vial 1-Personas Aymaras, Frasco o Vial 2- Personas Quechuas y Frasco o vial 3- Personas de la región oriental.<sup>(31)</sup>

El fundamento teórico que sustenta esta elección, es que, una mujer Aymara es más probable que se embarace o reciba una transfusión de alguien de su misma región, desarrollando por lo tanto un anticuerpo que podrá ser detectado con el Panel Celular preparado con los Glóbulos Rojos de personas de la misma región o grupo étnico y no con un Panel Celular de Individuos de otras latitudes del mundo.<sup>(31)</sup>

Este punto no minimiza, ni mucho menos, la utilidad de los paneles comerciales, ya que definitivamente son necesarios, sin embargo; en casos de emergencia, cuando no se cuente con los paneles comerciales, los Servicios de Sangre deberán tener la capacidad de desarrollar la mejor estrategia para preparar paneles artesanales, o incluso llegar a una interesante alternativa: quienes tengan la disponibilidad de contar con paneles comerciales incluyan en su rutina al menos un frasco vial con paneles con eritrocitos provenientes de donantes o muestras sanguíneas de personas de la región donde se ubica el Servicio de Sangre.

Habrán quienes cuestionen el uso de paneles artesanales elaborados a partir de un “pool de hematíes O”, debido al hecho de no conocer la composición antigénica de los mismos, y más aún al no contar con los paneles respectivos de identificación, considerando que su uso puede resultar insulso, sin embargo; al utilizarlos se conocerá que el receptor, presenta “un anticuerpo irregular circulante” y que hay que reportar al Banco de Sangre esta situación para que procedan allí, a la confirmación e identificación del mismo, además de realizar las pruebas de compatibilidad de las unidades necesarias hasta encontrar la que fuese compatible, por tanto; habremos prevenido un caso de aloinmunización y/o posible reacción transfusional.

En el caso de los Bancos de Sangre que utilicen paneles artesanales y detecten la presencia de anticuerpos irregulares en una muestra, la unidad que corresponda a la misma no será utilizada hasta que se remita la muestra a un Banco de Sangre de Referencia Departamental del Sistema Nacional de Sangre que cuente con los paneles comerciales para la confirmación de la detección y la identificación correspondiente, hasta que se pueda confirmar o disentir con el resultado obtenido, dando lugar a que la unidad se descarte o pueda ser transfundida.

## 4. DEFINICIONES IMPORTANTES

### 4.1. ALOANTICUERPO

Anticuerpo producido en un individuo que cumple la condición básica de estar dirigido contra antígenos de los cuales carece en la membrana de sus eritrocitos. Se presentan en individuos de la misma especie.

Los aloanticuerpos a su vez se clasifican de la siguiente forma: <sup>(17)</sup>

- ✓ Regulares naturales: los producidos contra el sistema ABO (anti-A y anti-B).
- ✓ Irregulares naturales: anti A1, anti-M, anti-N, anti-P1, entre otros.
- ✓ Irregulares adquiridos o inmunes: anti sistemas Rh (anti-D, anti-c, anti-C, y otros), anti-KE-LL, anti-Duffy

### 4.2 AUTO ANTICUERPO

Se trata de un anticuerpo producido en un individuo que está dirigido contra antígenos expresados en la membrana de sus propios eritrocitos.

### 4.3. ANTICUERPOS REGULARES

Son aquellos que están presentes en el 100% de los casos donde está ausente el antígeno. Este tipo de anticuerpos no requieren inmunización previa con el antígeno específico, normalmente son de tipo IgM y entre ellos se pueden citar las isoaglutininas del sistema ABO, es decir el Anti-A y Anti-B.

Se producen desde que la persona entra en contacto con virus, bacterias, granos de polen, frutas y verduras que poseen azúcares similares a la N-acetilgalactosamina, la Galactosa y la Fucosa entre otros, que coinciden con los azúcares terminales de los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos del sistema ABO.

Por tanto, como un bebé nunca tuvo contacto con estos azúcares, su sistema inmune los reconocerá como “extraños” y procederá a desencadenarse una respuesta inmune con la formación de anticuerpos de tipo IgM en la mayoría de los casos.

### 4.4. ANTICUERPOS IRREGULARES

Son anticuerpos que se presentan contra un antígeno diferente del sistema ABO que no se encuentra expresado en la membrana de los eritrocitos propios.

Normalmente se generan en respuesta a la exposición del receptor a esta proteína “extraña” ya sea mediante transfusiones sanguíneas o embarazos, normalmente pertenecen a la clase de inmunoglobulinas IgG y son capaces de atravesar la placenta.

### 4.5. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

Procedimiento de Laboratorio de Servicios de Sangre, que está incluido dentro de las Pruebas Inmunohematológicas y permite identificar la existencia de anticuerpos contra los antígenos de grupo sanguíneo de los eritrocitos.

El fundamento de esta prueba es detectar la presencia de anticuerpos que reaccionarían con los antígenos presentes en los eritrocitos, para luego pasar a una segunda fase de identificar de que anticuerpo se trataría y si revestiría interés transfusional u obstétrico.

Para este tipo de prueba se necesitan adquirir paneles celulares de 2 ó 3 frascos conteniendo eritrocitos lavados y resuspendidos en solución conservadora tipo Alsever o en SSFE o SSFE tamponada con PBS. Los paneles podrán adquirirse de manera comercial o deberán ser preparados en los Servicios de Sangre. (Ver Apéndice 5)

### 4.6. IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES - PANEL CELULAR

Toda vez que se tiene confirmada la presencia de un anticuerpo irregular circulante en el donante o en el receptor, se debe proceder a realizar la Prueba de Identificación del o los anticuerpos irregulares que se detectaron. Se pretende determinar la especificidad del anticuerpo y para ello es indispensable utilizar células obtenidas comercialmente que pueden ser de 1 a 16 e incluso 24 frascos, incluyendo los eritrocitos provenientes de donantes bien identificados y fenotipados de los cuales se conoce las características de los antígenos de sus eritrocitos.

Estos donantes, son convocados por fábricas internacionales de reactivos inmunohematológicos, que se encargan de la preparación de los paneles que están constituidos por juegos

de frascos que contienen los hematíes en suspensión con soluciones conservadoras y de los cuales se conoce los antígenos de los hematíes que van en cada frasco.

Tienen vigencia de 6 a 8 semanas, por este motivo, cuando se realizan las especificaciones técnicas para la adquisición de este tipo de paneles, debe dejarse en claro que los paneles deberán entregarse periódicamente, mediante contrataciones que se realizan generalmente cada año, así los Servicios de Sangre tienen aseguradas y acordadas las fechas en las cuales los proveedores se encargaran de realizar las entregas correspondientes.

## 5. DESARROLLO

### A) MUESTRAS

Idealmente toda detección e identificación de anticuerpos irregulares debe realizarse a partir de una muestra extraída en un tubo sin anticoagulante para obtener una muestra de suero. Existen diferentes corrientes en cuanto a la utilización de plasma y la posible interferencia entre los anticoagulantes como el EDTAK<sub>3</sub> con ciertos anticuerpos irregulares que fijan el complemento.<sup>(13)</sup>

Cada Banco de Sangre deberá establecer el tipo de muestra que permita obtener resultados satisfactorios sin alterar la rutina de toma de muestra que tiene establecida para derivar los correspondientes tubos de ensayo a los laboratorios de Inmunoematología e Inmunoserología.

En los Servicios de Transfusión por el contrario, será factible la utilización de suero ya que la muestra del receptor se recogerá tanto en un tubo con anticoagulante EDTAK<sub>3</sub> para las pruebas de clasificación de grupo sanguíneo sistemas ABO (Prueba Directa), Rh, Test de Coombs Directo y otro tubo que se recoge sin anticoagulante a partir del cual se obtiene suero permitirá realizar la Prueba Inversa y la Detección de Anticuerpos Irregulares.

Las muestras de suero/plasma que no fueran a procesarse inmediatamente deben ser almacenadas a 4 +/- 2 °C por 24 horas como máximo, en caso de que el procesamiento fuera a realizarse en un tiempo más largo, deberán congelarse a menos 20 °C, lo ideal es siempre es procesar la muestra el mismo día que fue colectada.

### B) REACTIVOS

#### ✓ PANELES CELULARES PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

Pueden ser preparados en cada Servicio de Sangre, pueden ser adquiridos comercialmente, e incluso pueden utilizarse los comerciales y además utilizar un panel preparado con eritrocitos provenientes de personas que forman parte de la población de la región donde está ubicado el Servicio de Sangre.

En el caso de los paneles comerciales de 2 ó 3 frascos deberán expresar antígenos capaces de detectar anticuerpos que tienen significación clínica, es decir que pueden causar una reacción post transfusional y en otros casos EHRN.

Deben expresar al menos los siguientes antígenos: D,C,E,c,e,M,N,S,s,P1,Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, KELL, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup> y Jk<sup>b</sup>.<sup>(1)</sup>

Los paneles artesanales que se elaboraran en los Servicios de Sangre, idealmente deben contener células provenientes de 10 personas del grupo O Rh D POSITIVO, de los cuales, cuando haya la disponibilidad se pueden incluir 1 ó 2 del grupo O Rh D NEGATIVO.

Los Servicios de Sangre que cuenten con la posibilidad de realizar el fenotipaje Rh, verificar que incluyan los antígenos C, c, E, e.

La frecuencia del antígeno KELL no permitirá incluir este antígeno en todos los paneles que se elaboren, sin embargo cuando exista una unidad de sangre que presente antígeno KELL, estos hematíes deberán ser también incluidos.

Si se cuenta con la Solución Alsever que permite conservar los hematíes durante 6 a 8 semanas se incrementa el tiempo de validez de las células y por tanto se optimizan los tiempos de su preparación e incluso el uso de células de fenotipos que son poco frecuentes. Para seguir las instrucciones de su preparación remitirse al Apéndice 2.

#### ✓ **REACTIVO ANTI INMUNOGLOBULINA HUMANA POLIESPECÍFICO**

Suero Anti-humano (poliespecífico): mezcla de anti-IgG policlonal, producido por inmunización de conejos con IgG humana purificada con anti-C3d monoclonal obtenido por cultivo de líneas celulares de hibridomas murinos secretores de IgM. El reactivo contiene colorante verde (que no afecta las propiedades del reactivo) y < 1 g/l de azida sódica como conservante. El reactivo coloreado verde permite comprobar visualmente la adición del mismo a todos los tubos.

#### ✓ **ALBÚMINA SÉRICA BOVINA AL 22%**

La Albúmina Sérica Bovina al 22% está preparada a partir de una mezcla de suero de albúmina bovina y tampón salino, cada solución está lista para ser utilizada tal y como se proporciona.

Es parte de los llamados potenciadores de reacción, la adición de este reactivo aumenta la constante dieléctrica del medio de reacción, el cual a su vez, ocasiona una reducción del potencial zeta de las células rojas.

Esta reducción de la carga negativa disminuye la distancia existente entre las células rojas permitiendo que puedan aproximarse entre ellas con mayor facilidad y así se otorgan a los anticuerpos IgG mayores posibilidades de que produzcan la aglutinación.

La utilización de ASB 22% permite disminuir el tiempo de incubación en la técnica de detección/identificación de anticuerpos irregulares con relación al uso de SSFE.

#### ✓ **SOLUCIÓN DE BAJA FUERZA IÓNICA LISS**

Solución utilizada para la ejecución de técnicas inmunohematológicas que se provee lista para su uso y contiene Glicina, Cloruro de Sodio, Glucosa, Inosina, Adenina, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, EDTA, e Hidróxido de Sodio. Además puede contener Sulfametoxazol (0,003 g/l) y Trimetoprim (0,0006g/l) como preservantes u otros similares.

Se utiliza para reducir la fuerza iónica del medio de reacción en los procedimientos de detección e identificación de anticuerpos irregulares y en las pruebas de compatibilidad.

La presencia de este reactivo refuerza la interacción antígeno-anticuerpo durante el paso que corresponde la incubación dentro de la técnica que se realiza para detectar e identificar anticuerpos irregulares.

#### ✓ **SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA ESTÉRIL**

Es llamado comúnmente Suero fisiológico, es una solución isotónica y en su composición contiene: Cloruro de sodio: 9,0 g/l, el pH es ácido, aproximadamente 5,5-6,0.

Se utiliza para el lavado de células así como también para preparar suspensiones celulares. Se debe tener mucho cuidado al controlar diariamente que no existan evidencias de contaminación, por ello se recomienda alicuotar el suero en frascos estériles y ante la mínima evidencia de turbidez, cambio de color o formación de partículas, se debe desechar.

#### ✓ **SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA CON BUFFER FOSFATOS (PBS)**

Es el Suero Fisiológico al que se le añade un volumen de PBS (Tampón Buffer Fosfatos) que permite llegar desde un pH ácido hasta un pH prácticamente neutro de un 7,2 +/- 0,2.

Para ver la forma de preparar esta solución remitirse al Apéndice 3.

En esta solución salina modificada, el cloruro sódico proporciona protección osmótica a las células y los fosfatos suministran un pH fisiológico estable que favorece el mantenimiento de la viabilidad de los glóbulos rojos tanto en la preparación de suspensiones como durante los procedimientos de lavado de los hematíes.

## **6. TÉCNICAS**

Actualmente la Detección, Rastreo o Pesquizado de Anticuerpos Irregulares así como la Identificación de los mismos, se realiza en Bolivia mediante las técnicas en Tubo, Técnica de Micro aglutinación en columna con gel y la técnica en Microplaca.

Este Manual de Procedimientos Operativos, hará énfasis en la técnica en tubo ya que es la técnica que puede ser actualmente realizada en todos los Servicios de Sangre del país, más aun si se pretende que los Servicios de Transfusión realicen la prueba a todo receptor de transfusiones sanguíneas.

## **7. ACCIONES PRELIMINARES**

- 🔴 Atemperar el reactivo de Coombs a temperatura ambiente, 20 minutos antes de iniciar el procedimiento.
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario de Células Control de Coombs.
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica.
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario del Reactivo de Coombs.
- 🔴 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.
- 🔴 Verificar que los paneles celulares ya sea que fueron elaborados en los Servicios de Sangre o adquiridos de manera comercial, no presenten signos de hemólisis.

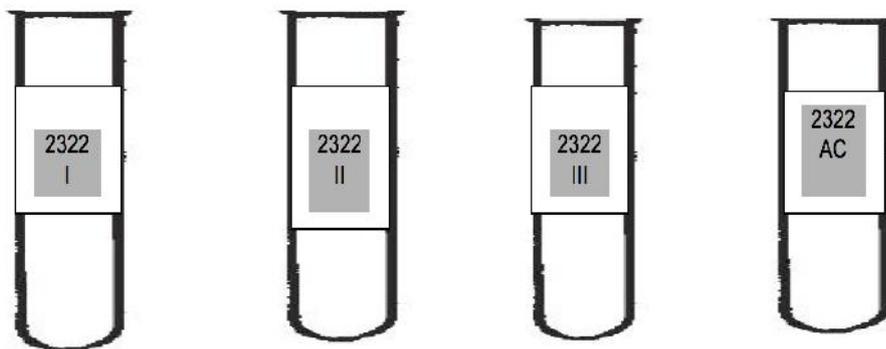
## 7.1. PROCEDIMIENTO DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

- a) Proceder a centrifugar la muestra a 3,500 rpm durante 10 minutos para separar el paquete de células del suero/plasma. En casos de transfusiones Inmediatas el procedimiento puede ser reducido a 5 minutos de centrifugación a 3,500 rpm.
- b) Separar el suero/plasma de los glóbulos rojos del receptor en un tubo de ensayo nuevo o correctamente lavado y esterilizado, rotulándolo con mucho cuidado para no cometer errores en la identificación.
- c) Identificar los tubos de ensayo con las iniciales del receptor o con el número que corresponda a la muestra del donante en estudio.

Se considera ideal incluir un tubo que contenga los hematíes y suero/plasma propios como Auto Control.

El número de tubos básicamente dependerá del número de frascos que contenga el panel celular utilizado. Por ejemplo, para un panel comercial de 3 células I-II-III, se necesitaría la batería de tubos reflejados en la siguiente gráfica:

**Gráfico N° 10** Preparación de batería de tubos de ensayo y rotulación de los mismos para la realización de la prueba para la Detección de Anticuerpos Irregulares.

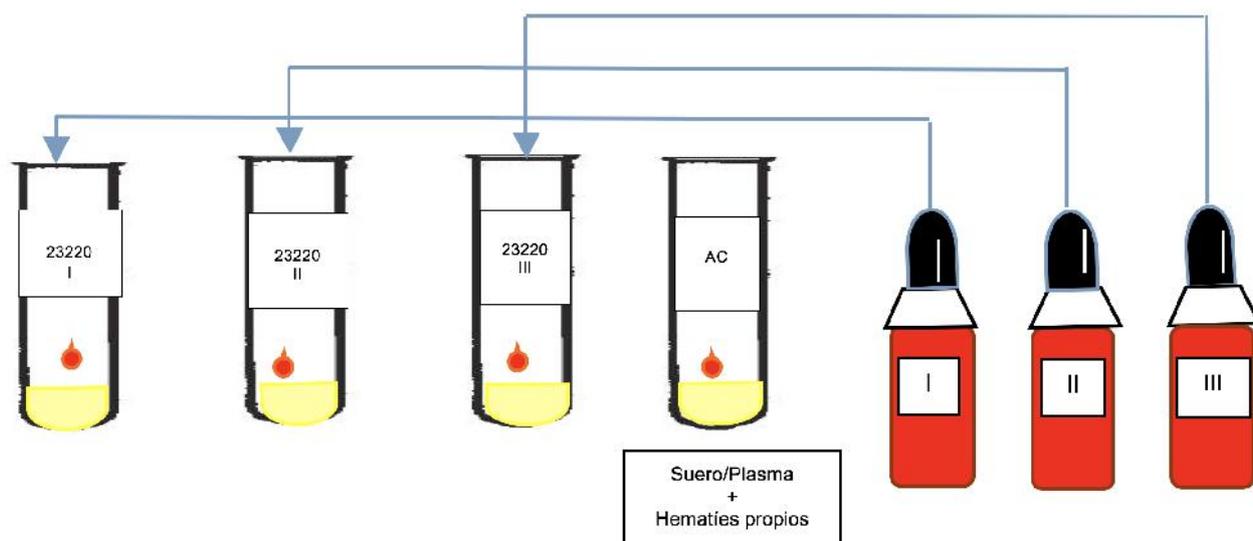


Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

Esta batería de tubos está preparada para el caso de que se use un solo potenciador de reacción, en el caso de que se decida trabajar con dos potenciadores de reacción, se deberán preparar otra serie de tubos I-II-III, especificando el medio de reacción ya sea con la letra "A" (Albumina Sérica Bovina 22%) y/o con la letra "L" (LISS) en los tubos de ensayo.

- d) Una vez que se tienen bien identificados y ordenados los tubos de ensayo, se deben dispensar 100 uL del suero de la muestra del donante, en los tubos marcados como I-II o I-II-III, o en caso de los Servicios de Transfusión, deberán dispensar 100 uL de suero del Receptor procediendo de la misma manera.
- e) Añadir al tubo correspondiente utilizando el frasco gotero las células Panel, por ejemplo: al tubo marcado I una gota de las células del Panel I, al tubo marcado II se dispensa 1 gota de las células contenidas en el frasco que contiene el Panel II y así respectivamente.
- f) Al tubo identificado como AC deberá dispensarse 100 uL del suero del Receptor o de la muestra del donante y 50 uL de sus propias células suspendidas al 5% en SSFE o SSFE tamponada con PBS.

**Gráfico N° 11** Procedimiento para la realización de la técnica para la Detección de Anticuerpos Irregulares.



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

- g) Homogenizar suero/plasma y células y dejar a temperatura ambiente 10 minutos y proceder a centrifugar a 1000 rpm durante un minuto.

Sobre la fuente de luz del aglutinoscopio, observar en busca de hemólisis o aglutinación. Si en alguno de los tubos existe aglutinación evidente de 3 a 4 cruces (+), en ésta que constituye la Fase Salina, se procede a registrar el resultado correspondiente.

En caso de que existieran indicios de aglutinación, registrar el resultado y continuar con los siguientes pasos, ya que magnificarán la aglutinación que aparentemente se estuviera observando.

- h) Proceder con la fase Térmica/Potenciador de Reacción, en el caso de usar ASB 22% se dispensan a toda la batería de tubos de ensayo dos gotas del reactivo mediante el frasco gotero y siguiendo lo establecido por el fabricante para el tiempo de incubación recomendado se procederá a incubar a 37°C en Baño María o Estufa de Incubación a 37 °C teniendo cuidado de cubrir la parte superior de los tubos con papel parafinado.

Normalmente el tiempo de incubación para ASB 22% referida en los insertos del reactivo, es de 15-20 minutos.

- i) En el caso de usar el potenciador LISS, se sugiere utilizar la técnica modificada en la cual no se suspenden los hematíes en LISS al 5% para dispensar una gota de los mismos con 100 ul de suero/plasma desde el inicio de la técnica, sino, que se dispensan dos gotas de LISS directamente a toda la batería de tubos, considerando que los hematíes fueron suspendidos en SSFE, de la misma manera que se procede con la ASB 22 %.
- j) Incubar a 37°C en Baño María o Estufa de Incubación durante el tiempo que el fabricante refiera en el inserto de la Solución LISS, siendo normalmente de 10 minutos. En casos de requerimientos de emergencias tales como Shock Hipovolémico en las que se necesita la transfusión inmediata, el tiempo podría reducirse a 5 minutos de incubación.
- k) Una vez concluidos los tiempos de incubación de la Fase Térmica/Potenciador de Reacción, se procede a centrifugar a 1000 rpm durante un minuto. Sobre la fuente de luz del

aglutinoscopio, se examina en busca de hemólisis o aglutinación. Si en alguno de los tubos existe aglutinación se registra el resultado y considerando que la reacción aún podría verse magnificada por la adición del reactivo de Coombs, se debe proceder con el paso número 12, a no ser que, la aglutinación fuera tan evidente que se observen 3 a 4 cruces (+) de aglutinación.

Si esto ocurriera, correspondería repetir la prueba y en caso de persistir el resultado registrar el mismo como Detección de Anticuerpos Irregulares Positivo y se debe proceder a la Identificación del Anticuerpo detectado.

- l) En caso de haber sido detectada una aglutinación débil o no haber sido detectada ninguna aglutinación, el siguiente paso es proceder a realizar 3 lavados de 3 minutos a 2,500 rpm con SSFE o SSFE tamponada con PBS.
- m) Ya dentro de lo que constituye la última parte de la prueba: la fase Antiglobulínica, dispensar dos gotas con el frasco gotero del reactivo de Anti-Inmunoglobulina Humana Anti- Ig G Anti-C<sub>3d</sub> (Coombs) a todos los tubos y centrifugar a 1000 rpm durante un minuto.
- n) Sobre la fuente de luz del aglutinoscopio, se examina en busca de hemólisis o aglutinación. Si en alguno de los tubos existe aglutinación se registra el resultado, y para los tubos que no presentaron aglutinación evidente, se procede con el paso 15.
- o) Para comprobar la validez del resultado en caso de ser negativa la presencia de aglutinación o hemólisis, se deberá dispensar 1 gota de Células Control de Coombs CCC, y luego de centrifugar a 1000 rpm durante un minuto, la reacción deberá tornarse positiva comprobando con este hecho que, existía el Reactivo de Coombs libre no ligado a ningún anticuerpo.

Sólo entonces, ante este cambio, afirmaremos que la reacción de Detección de Anticuerpos Irregulares es NEGATIVA.

Cada Servicio de Sangre deberá diseñar la planilla de registro de resultados, el siguiente constituye un ejemplo de registro de resultados de un panel de dos células que puede ser adaptado o modificado en cada Institución.

IDENTIFICACIÓN MUESTRA	REACCIÓN PANEL I			REACCIÓN PANEL II			AUTO CONTROL			RESULTADO DETECCIÓN DE ANTICUERPO IRREGULAR	POSIBLE ESPECIFICIDAD (EN CASO DE USO DE PANELES COMERCIALES)	INTERPRETACIÓN
	FSI	P/T	AC	FSI	P/T	AC	FSI	P/T	AC			
CLAUDIA SANTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NEGATIVO		AUSENCIA DE ANTICUERPOS
EFRÁIN LOPEZ	0	0	4+	0	0	4+	0	0	0	POSITIVO	ANTI-c ANTI-E ANTI-K	ALOANTICUERPO
22376	2+	0	0	2+	0	0	2+	0	0	POSITIVO		AUTO ANTICUERPO FRÍO
22678	0	0	4+	0	0	4+	0	0	0	POSITIVO	ALO ANTICUERPO	ANTI-D

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud.

**F.S.I.**= Fase Salina Inmediata

**PT** = Fase Potenciador de Reacción/Térmica

**AC** = Fase Antiglobulínica (Coombs)

**OBS.**= Observaciones

**NOTA.** Las reacciones negativas se reportaran con un 0 y las reacciones positivas deberán reportarse según la intensidad de las cruces de (1 a 4+)

Cuando se utilizan paneles celulares comerciales, se tienen tablas que vienen incluidas con cada panel y de acuerdo a los tubos en los cuales se presentó la aglutinación, permiten tener una idea de cuál sería o cuales serían los posibles anticuerpos irregulares detectados, sin embargo, se debe proceder con la técnica de identificación de anticuerpos irregulares que de manera más específica, permite identificar los anticuerpos en cuestión.

### 7.1.1. TÉCNICAS

Actualmente la Identificación de Anticuerpos Irregulares se realiza en Bolivia mediante las técnicas en Tubo y Técnica de Micro aglutinación en columna con gel.

Este Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados, hará énfasis en la técnica en tubo ya que es la técnica que puede ser actualmente realizada en todos los Bancos de Sangre del país y en los Servicios de Transfusión que comiencen a incorporar la técnica.

### 7.1.2. ACCIONES PRELIMINARES

- 🔥 Atemperar el reactivo de Coombs a temperatura ambiente, 20 minutos antes de iniciar el procedimiento.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario de Células Control de Coombs.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica.
- 🔥 Realizar el Control de Calidad Diario del Reactivo de Coombs.
- 🔥 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.

## 7.2. PROCEDIMIENTO IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

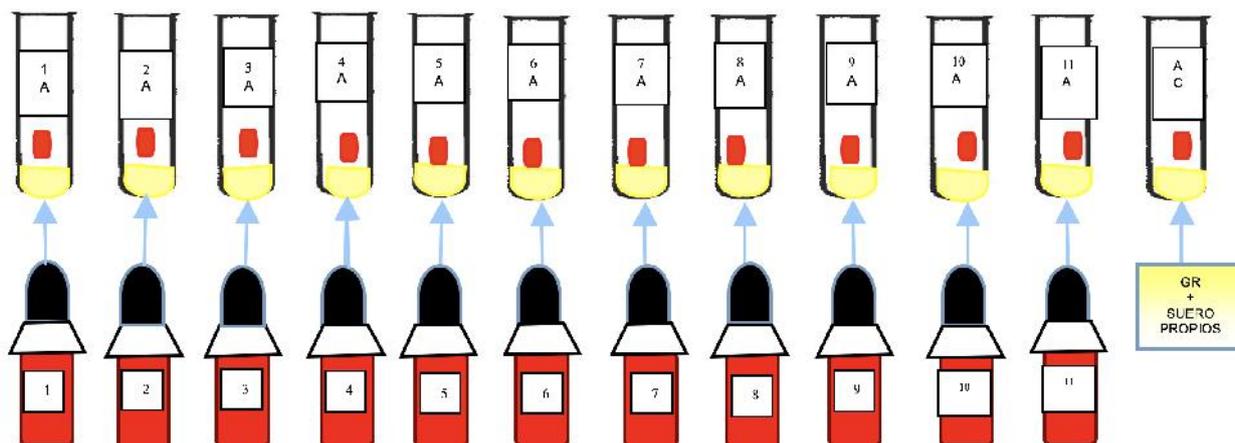
- a) Identificar el número de tubos de ensayo según el número de células con las que cuenta el panel de identificación, puede ser de 11, 16 ó 24 células.

Se deberá incluir un tubo AC (AUTOCONTROL) ya sea del receptor o del donante, en el que se testaran los glóbulos rojos y el suero/plasma propios.

- b) Dispensar 100 uL del suero/plasma y una gota (50 uL) de cada panel en el tubo que corresponda. En caso de que se decida trabajar simultáneamente con dos medios potenciadores de reacción, la batería de tubos se duplicará y se debe tener el cuidado correspondiente de identificar además el medio de reacción en cada tubo. Por ejemplo con las letras: "A" (Albúmina), "L" (LISS) o "B" (Bromelina).

A continuación, gráficamente se ilustra cómo deberíamos preparar la batería de tubos:

**Gráfico N° 12.** Procedimiento para la rotulación de los tubos de ensayo y realización de la técnica para la Identificación de Anticuerpos Irregulares.



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

- c) Homogenizar suero/plasma y células, colocar toda la batería de tubos en el refrigerador a 4 °C durante 20 minutos y proceder a realizar la centrifugación a 1000 rpm durante un minuto. Sobre la fuente de luz del aglutinoscopio, se examina en busca de hemólisis o aglutinación. Si en alguno de los tubos existe aglutinación en ésta que constituye la Fase Salina, en la cual se da un rango térmico mayor y se amplían las posibilidades para detectar anticuerpos o auto anticuerpos fríos, se procede a registrar el resultado correspondiente y se sigue con el siguiente paso.
- d) Dejar la batería de tubos sobre el mesón a temperatura ambiente (20-22°C) durante 20 minutos y proceder a realizar la centrifugación a 1000 rpm durante un minuto. Sobre la fuente de luz del aglutinoscopio, se examina en busca de hemólisis o aglutinación. Si en alguno de los tubos existe aglutinación en ésta que constituye la Fase Salina, se procede a registrar el resultado correspondiente y se sigue con el siguiente paso.
- e) Dispensar a toda la batería de tubos de ensayo dos gotas de Albumina Sérica Bovina ASB 22% usando el gotero del frasco, dejar 5 minutos a temperatura ambiente (para que el cambio de temperatura no sea tan brusco) y proceder a incubar según recomendaciones del fabricante de ASB 22% el tiempo estipulado, normalmente son 15- 20 minutos a 37 °C.
- f) En el caso de utilizar LISS, dispensar (dos gotas) de solución LISS utilizando el gotero del frasco comercial LISS a cada uno de los tubos de ensayo<sup>27</sup> y proceder a incubar según recomendaciones del fabricante el tiempo estipulado, normalmente son 10-15 minutos a 37 °C y centrifugar a 1000 rpm durante un minuto.

Sobre la fuente de luz del aglutinoscopio, se examina en busca de hemólisis o aglutinación. Si en alguno de los tubos existe aglutinación en ésta que constituye la Fase Potenciador de Reacción/Térmica registrar y continuar con el siguiente paso.

- g) Proceder a realizar 3 lavados de 3 minutos a 2,500 rpm con SSFE o SSFE tamponada con PBS, dispensar dos gotas con el frasco gotero del reactivo de Anti-Inmunoglobulina Humana Anti- IgG Anti-C<sub>3d</sub> (Coombs) a toda la batería de tubos y centrifugar a 1000 rpm durante un minuto.
- h) Sobre la fuente de luz del aglutinoscopio, se examina en busca de hemólisis o aglutinación. Si en alguno de los tubos existe aglutinación se registra la fase en la que se detectó la reacción que en este caso constituye la Fase Antiglobulínica y se espera a tener el resultado de los tubos en las cuales la reacción de aglutinación fue negativa.

- i) En los tubos de ensayo en los cuales la reacción de aglutinación fue negativa, el resultado debe ser validado, para este efecto, se deberá dispensar 1 gota de Células Control de Coombs CCC, y luego de centrifugar un minuto a 1000 rpm, la negatividad deberá tornarse positiva, comprobando con este hecho, que el Reactivo de Coombs estaba libre y no se encontraba ligado a ningún anticuerpo previamente. Sólo entonces, ante este cambio, afirmaremos que la reacción de Detección de Anticuerpos Irregulares es NEGATIVA.

Con ayuda de la tabla de interpretación provista en cada panel celular, proceder a registrar los resultados en la misma y a determinar de qué anticuerpo irregular se trata.

Cada Servicio de Sangre deberá diseñar la planilla de registro de resultados; la siguiente constituye un ejemplo que puede ser adaptado o modificado en cada Institución.

CÉLULAS DE PANEL	Rh					MNS				P	KELL		LEWIS		DUFFY		KIDD		RESULTADOS					
	D	C	E	c	e	M	N	S	s	P <sub>1</sub>	K	k	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	4°C	TA	37 °C	AG	CCC	
1 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>																								
2 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>																								
3 R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>																								
4 r' r																								
5 r' r																								
6 r r																								
7 r r																								
8 R <sub>0</sub> r																								
9 r r																								
10 r r																								
11 R <sub>2</sub> R <sub>1</sub>																								
AUTO CONTROL																								

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud.

**TA**= Temperatura ambiente

**AG**= Antglobulina Humana (Coombs)

**CCC**= Células Control de Coombs

Se recalca que, cada panel celular viene acompañado de una tabla donde están marcados los antígenos que portan los hematíes incluidos en cada frasco del panel, de acuerdo a ello, se debe ir comparando las reacciones de los tubos y por similitud hay que ver a que anticuerpo correspondería el patrón de reacciones obtenido.

En algunos casos, el anticuerpo se identificará claramente, siendo idénticas las reacciones positivas y negativas de los tubos a las que refiere el inserto del panel (guía de resultados).

En otros, puede que debido a la presencia de más de un anticuerpo, la identificación pueda complicarse, en este caso buscaremos que al menos dos de las reacciones positivas y tres de las reacciones negativas coincidan con el panel y aquel anticuerpo que coincida con estas características será al que atribuiremos su presencia en la muestra.

También se puede buscar una coincidencia de una reacción positiva y siete reacciones negativas que coincidan con el patrón obtenido para permitir identificar el anticuerpo con un valor de probabilidad p de 0,05.<sup>(1)</sup>

Finalmente si aún así no se puede identificar el anticuerpo, deberá reportarse:

**“Presencia de Anticuerpo Irregular detectado no identificado mediante panel celular disponible”**

**8. EJEMPLO DE INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

En la tabla N° 11 que a continuación sigue, marcado con naranja se tienen registrados los resultados de cada una de las reacciones de los tubos de ensayo, con la característica de que al utilizar las Células Control de Coombs CCC, la negatividad evidenciada cambia a un resultado positivo.

Para la interpretación se debe tomar el resultado registrado en la fase AG donde se evidenciaba negatividad inicialmente.

Ya con esta certeza, se procede a comparar con cuál de los patrones ya definidos de cada uno de los posibles anticuerpos existiría mayor similitud, se puede observar claramente que en este caso coincide en todas las reacciones con un Anti-KELL marcado para mejor visualización con fondo color celeste.

En todos los casos será importante verificar que en el tubo AUTOCONTROL no exista ningún tipo de reacción para así descartar cualquier posible auto anticuerpo.

En los apéndices 7 y 8 se pueden observar dos ejemplos adicionales de interpretación de anticuerpos irregulares.

**Tabla N° 11** Interpretación de resultados en la Identificación de un Anticuerpo Irregular

CÉLULAS DE PANEL	Rh					MNS				KELL		P	LEWIS		DUFFY		KIDD		RESULTADO				
	D	C	E	c	e	M	N	S	s	K	k	P1	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	4 °C	TA	37°C	AG	CCC
1 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	+
2 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
3 R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+
4 r' r	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	0	+
5 r' r	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+
6 r r	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0	0	0	+	
7 r r	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+
8 R <sub>0</sub> r	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
9 r r	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	
10 r r	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	
11 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+
AUTO CONTROL																		NEGATIVO					

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud.

**9. INTERPRETACIÓN FINAL**

Cuando la especificidad de un anticuerpo ha sido detectada, idealmente se debería contar con el antisuero correspondiente para establecer la ausencia de dicho antígeno en los glóbulos rojos de la muestra del donante o en la muestra del paciente/receptor para comprobar el resultado; pues cabe esperar que si se detecta por ejemplo un anti-Le<sup>a</sup>, el antígeno Le<sup>a</sup> debe estar ausente en los hemátis de la muestra en estudio.

En el caso de que la muestra en la cual el anticuerpo irregular detectado corresponda a un paciente que requiera una transfusión sanguínea, se deberán buscar unidades carentes del antígeno correspondiente al anticuerpo irregular detectado.

Actualmente en el país, los Bancos de Sangre de Referencia Departamental cuentan con: Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e, y Anti-K; así que, si se identificaran estos anticuerpos irregulares, dichos antisueros deberán dar un resultado negativo al ser testados con los glóbulos rojos en cuestión, pues cabe esperar que una persona no producirá anticuerpos contra los antígenos que posee en la membrana de sus eritrocitos. Comprobado este hecho, si se trata de alguno de los fenotipos del sistema Rh y el antígeno KELL, se empezará a buscar unidades carentes del antígeno correspondiente para proceder al despacho.

Al momento de que se dispongan los antisueros correspondientes a los antígenos de los demás sistemas de grupo sanguíneo, se deberá proceder de igual manera, buscando para las transfusiones sanguíneas las unidades carentes del antígeno correspondiente al anticuerpo irregular detectado.

En caso de tratarse de muestras provenientes de donantes de sangre, todos los componentes sanguíneos que contengan plasma deberán ser descartados para uso transfusional y más bien, serán alicuotados para ser utilizados como controles internos a ser incluidos cada día al momento de procesar las muestras.

## CAPÍTULO 6

# DETERMINACIÓN DE FENOTIPOS “C, c, E, e” DEL SISTEMA Rh MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO

### 1. RESUMEN

El presente capítulo presenta el procedimiento adecuado del fenotipado del Sistema Rh mediante la técnica en tubo e incluye la determinación de los antígenos C, c, E, y e.

El polimorfismo del sistema sanguíneo Rh. (ISBT004)<sup>(24)</sup> así como la inmunogenicidad de sus antígenos, le confiere el segundo lugar en importancia clínica, tanto en la práctica transfusional como en la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Está compuesto por 56 antígenos<sup>(19)</sup> definidos por métodos serológicos, siendo los más importantes y por lo mismo denominados antígenos mayores del sistema, los antígenos D, C, c, E y e.

Hablamos de fenotipo ya que es la manifestación del genotipo de cada donante, el genotipo puede ser deducido en base al fenotipo que se detecte, para efectos prácticos, el conocer la presencia o ausencia de los antígenos en cuestión es suficiente para las prácticas básicas de Medicina Transfusional.

Idealmente lo que se debería realizar es entregar a cada receptor la unidad fenotípicamente idéntica al mismo, en la práctica actual aun cuando se está realizando el fenotipado de todas las unidades de sangre en los Bancos de Sangre del país, no se conoce -en la mayoría de los casos- el fenotipo de los receptores a quienes va dirigida y posteriormente transfundida la unidad.

Se espera a futuro llegar a esta condición ideal en la que se realice el fenotipado para los pacientes de los cuales se conoce el fenotipo y que sea cumplida especialmente en pacientes poli transfundidos, pacientes que hayan pasado una reacción transfusional urgente y casos de exanguinotransfusión entre otros.

Es importante resaltar que quienes carecen de los antígenos c y E presentan riesgo de sensibilizarse ante una transfusión o embarazos que puedan transferir eritrocitos con antígenos c y E, ya que ambos antígenos son considerados como los más inmunogénicos del sistema Rh.

### 2. ALCANCE

El presente capítulo es de aplicación en Bancos de Sangre, y opcionalmente en Servicios de Transfusión para pacientes poli transfundidos, pacientes que hubieran presentado reacciones transfusionales en días previos, mujeres embarazadas, así como también para exanguinotransfusiones; casos en los cuales, se podría realizar el fenotipaje Rh C, c, E, e, solicitando una unidad con el “fenotipo definido” para que el Banco de Sangre proceda con el despacho de la unidad con el “fenotipo solicitado”.

Dentro del Sistema Rh, después del antígeno “D” los antígenos “C, c, E y e” son también muy importantes en cuanto a su antigenicidad, la misma va en este orden: “c, E, e, C” siendo responsables de

numerosos problemas clínicos ya que al carecer de la expresión de alguno de ellos post transfusión de paquetes globulares o sangre total se pueden desarrollar anticuerpos contra el antígeno faltante, por tanto, en una siguiente transfusión o embarazo podrían tener lugar ya sea reacciones transfusionales, así como también Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido EHRN.

Es por éste motivo, que de acuerdo a lo expuesto, para determinados pacientes sería ideal que se pueda conocer su fenotipo “C c E e” y solicitar al Banco de Sangre que proceda a despachar las unidades con idéntico fenotipo donante-receptor, caso contrario, el hecho de estar actualmente determinando el fenotipo Rh a todos los donantes en los Bancos de Sangre, tendría la única función del cumplimiento de su realización cuando se realizan evaluaciones externas del desempeño y para recolección de datos estadísticos, pero la real función de evitar la aloinmunización de receptores que tienen riesgo de formar anticuerpos, no se estaría practicando.

En caso que el Servicio de Transfusión no pueda realizar el fenotipado en este tipo de receptores podrían sugerir al médico tratante que efectúe la solicitud de esta prueba al Banco de Sangre que les corresponda para proceder como fue referido previamente.

### 3. INTRODUCCIÓN

Las proteínas del Sistema Rh se expresan exclusivamente en la superficie del eritrocito y son un tetrámero con dos moléculas de Rh AG y dos de Rh (CE o D).

La proteína Rh D expresa el antígeno D, mientras que la proteína Rh CE expresa tanto a los antígenos C o c (que involucran la segunda asa extra celular), junto con los antígenos E y e (que involucran la cuarta asa extra celular) de la misma proteína.<sup>(21)</sup>

El sistema Rh-Hr, clínicamente tiene gran importancia, debido al poder inmunogénico, especialmente al antígeno D, pero este sistema posee otros antígenos que eventualmente pueden sensibilizar a un paciente y provocar las mismas consecuencias clínicas, sobre todo reacciones hemolíticas transfusionales.

Este sistema, posee gran polimorfismo, formado por aproximadamente más de 56 antígenos, estos varían de acuerdo a las reuniones de la ISBT: International Society of Blood Transfusion, -*Sociedad Internacional de Transfusiones Sanguíneas*- en las cuales de acuerdo a diversos criterios de inclusión y exclusión expertos a nivel mundial deciden si los antígenos se mantienen, se reducen o se incluyen nuevos.

El fenotipo se determina enfrentando los hematíes problema con los antisueros anti-C, anti-E, anti-c y anti-e. La existencia o no de estos antígenos en la superficie de los hematíes, se detecta por una reacción de aglutinación.

El conocer la existencia de estos antígenos también forma parte del conjunto de pruebas de laboratorio que se realizarían en determinados casos, por ejemplo ante una Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido, será importante conocer el fenotipo del recién nacido y buscar en el suero materno posibles anticuerpos que pudieran estar dirigidos contra estos antígenos.

Recordemos que el anticuerpo más prevalente como causa de la aloinmunización en la EHRN sigue siendo el anti D, en cerca de la mitad de los casos, aunque seguido muy de cerca por anti-Kell, anti-c, anti-E, anti C, y anti-Fy<sup>a</sup>.<sup>(12)</sup>

## 4. DEFINICIONES IMPORTANTES

### 4.1. DEFINICIÓN DE ANTÍGENO DESDE LA VISIÓN INMUNOHEMATOLÓGICA

Se denomina así a toda sustancia extraña presente en la membrana de los hematíes, que introducida en el organismo es capaz de provocar una reacción inmunitaria.

Las características de los antígenos vienen determinadas por el tamaño, forma, rigidez del antígeno, por el número y localización de los determinantes antigénicos o epítomos en la membrana eritrocitaria que varía según la naturaleza del antígeno y pueden reaccionar “in vitro” o “in vivo” con el anticuerpo específico.

### 4.2. FACTORES QUE AFECTAN LA REACCION ANTÍGENO ANTICUERPO “IN VITRO”

La reacción antígeno-anticuerpo dependerá de ciertas condiciones, tales como temperatura, pH, fuerza iónica del medio de reacción, proporción entre anticuerpos y antígenos, además del tiempo de incubación.

Existen varios métodos in vitro para visualizar las reacciones antígeno-anticuerpo, los más utilizados en Banco de Sangre son aglutinación y hemólisis.

### 4.3. ANTICUERPOS

Son las proteínas plasmáticas más abundantes en el suero después de la albúmina, que se han formado en el organismo por las células plasmáticas y los linfocitos B como respuesta a la entrada de un antígeno.

Pertencen al grupo de las globulinas y desde el punto de vista electroforético se hallan situadas en la región de las gammaglobulinas. Debido a su relación directa con la inmunidad se conocen con el nombre de inmunoglobulinas.

La molécula de anticuerpo tiene dos funciones: unirse de manera específica a moléculas del agente patógeno que desencadenó la respuesta inmunitaria; y la otra, es reclutar células y moléculas para destruir dicho agente una vez que el anticuerpo está unido a él.<sup>(26)</sup>

### 4.4. ANTÍGENOS DEL SISTEMA Rh

Son sumamente inmunogénicos, los cinco más importantes son por supuesto el D, y luego también están el C, c, E y e, siendo el de mayor poder sensibilizante el D, le siguen en importancia el c y el E, los cuales pueden causar reacciones hemolíticas post-Transfusionales, originar la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido EHRN y aumentar el riesgo de rechazo en trasplante de órganos en personas poli transfundidas debido a la sensibilización.

### 4.5. INMUNOGENICIDAD (CAPACIDAD ANTIGÉNICA)

La composición, complejidad química y el tamaño molecular de un antígeno determinan muchas de sus propiedades físicas y biológicas, incluyendo la inmunogenicidad.

Un antígeno habitualmente tiene un peso molecular mayor a 50.000 Daltons, a mayor tamaño, mayor inmunogenicidad. Sustancias de unos 100.000 Dalton (Da) suelen ser buenos inmunógenos, mientras que las de menos de 5.000-10.000 Daltons son malos inmunógenos, algunas

moléculas pequeñas, pueden unirse específicamente a los anticuerpos pero no activan a las células B o T. <sup>(22)</sup>

## 5. DESARROLLO

### A) MUESTRA

La muestra adecuada es sangre recogida con anticoagulante EDTAK<sub>3</sub>, que permite tener los hematíes viables para la preparación de suspensiones celulares de óptima calidad, sin rastros de hemólisis.

### B) REACTIVOS

Solución Salina Fisiológica Estéril SSFE ó SSFE tamponada con PBS para la preparación de suspensiones celulares.

Se requiere también la utilización de los antisueros comerciales correspondientes a los antígenos C, c, E, e, vale decir: Anti-C, Anti-c, Anti-E y Anti-e.

Al momento de realizar las especificaciones técnicas de los reactivos, se deben solicitar reactivos de origen monoclonal de clase Ig M.

## 6. TÉCNICAS

En cuanto a la técnica para la determinación de Fenotipos del Sistema Rh, éstas pueden ser efectuadas en tubo, en micro placa o mediante la Técnica de Micro aglutinación en columna con partículas de gel.

El presente capítulo se dedicará a la determinación de los antígenos C, c, E y e mediante la técnica en tubo ya que la misma puede ser implementada en todos los Servicios de Sangre que aún no lo hubieran hecho.

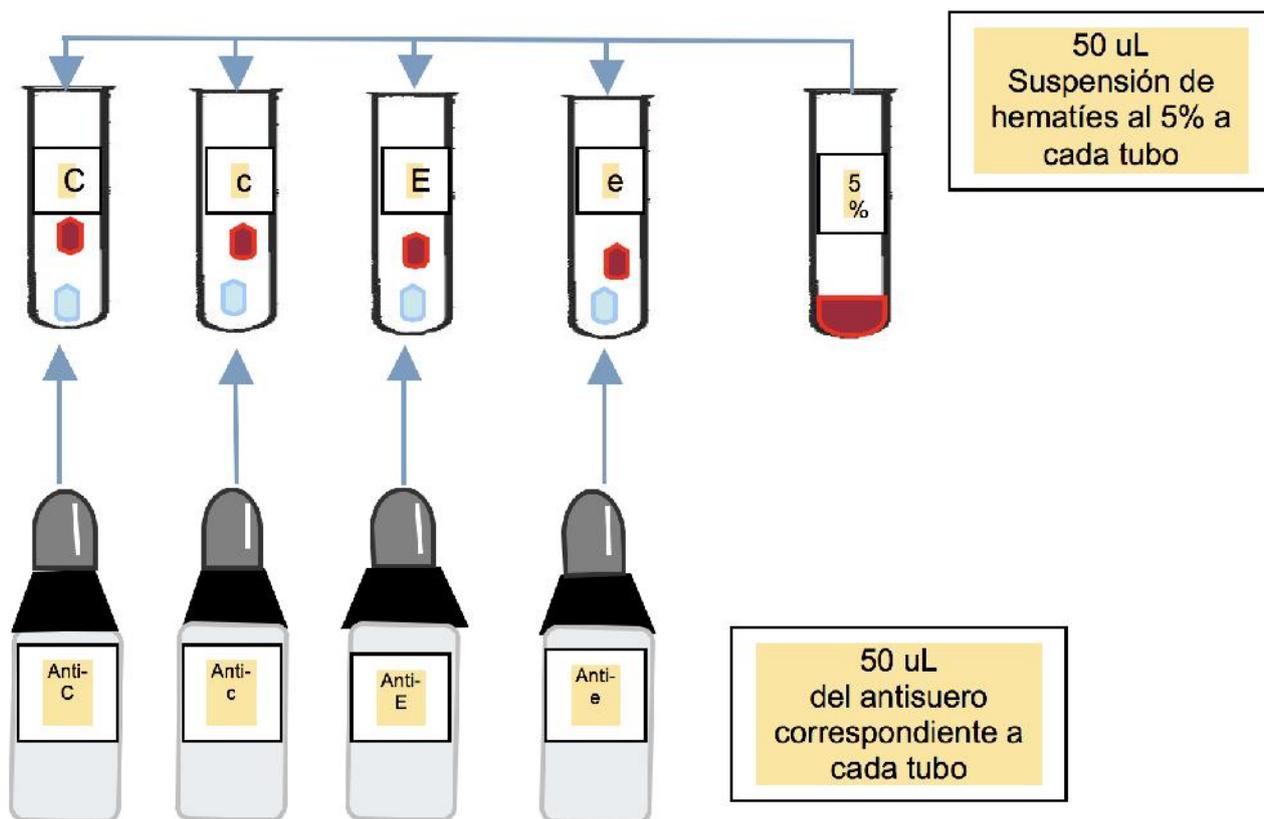
## 7. ACCIONES PRELIMINARES

- 🔴 Atemperar los reactivos Anti-C, Anti-c, Anti-E y Anti-e a temperatura ambiente 20 minutos antes de iniciar las determinaciones.
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica SSFE.
- 🔴 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.

## 8. PROCEDIMIENTO

- a) Obtener bien diferenciado el paquete globular y el plasma en la muestra obtenida de acuerdo al tiempo y número de revoluciones que se hubieran estandarizado en el Servicio de Sangre, (Ej. 5-10 minutos a 3500 rpm, luego, proceder a separar el plasma en otro tubo de ensayo para dejar el empaquetado de glóbulos rojos.
- b) Preparar una suspensión al 5% de los hematíes a tipificar en SSFE o en SSFE tamponada con PBS. Se deben seguir estrictamente las instrucciones referidas en el inserto de los reactivos, ya que puede ser que indique la necesidad de lavar los hematíes antes de preparar la suspensión.
- c) Numerar una batería de 4 tubos con las denominaciones de los reactivos y luego dispensar uti-

lizando el gotero del frasco una gota del reactivo correspondiente a cada tubo y acto seguido 50  $\mu$ L de la suspensión de hematíes al 5%.



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

- d) Según la técnica que describa el inserto, podrá dejarse los tubos 10 minutos a temperatura ambiente o directamente proceder a una centrifugación de un minuto a 1000 rpm (este valor puede ser modificado de acuerdo a cada Servicio de Sangre, sin embargo no se deben alejar del objetivo primordial que es el de obtener en el menor tiempo posible al menor número de rpm botones sólidos bien definidos de fácil resuspensión con un sobrenadante transparente y en el caso de las “no aglutinaciones” que éstas se disgreguen sin mayor esfuerzo.
- e) Observar sobre la fuente de luz de un rhesuscopio la presencia de aglutinación, registrar los resultados obtenidos de acuerdo a la tabla de intensidad de reacción de hemaglutinación del Apéndice 14.

## 9. INTERPRETACIÓN

La aglutinación de los hematíes en el tubo correspondiente indica un resultado positivo, vale decir la presencia del antígeno en la membrana de los hematíes.

La ausencia de aglutinación en el tubo correspondiente es indicio de un resultado negativo, por tanto el antígeno no está presente en la membrana del hematíe.

**POSITIVO:** EXISTENCIA DE AGLUTINACIÓN SEA DE 1, 2, 3, ó 4 CRUCES (+)

**NEGATIVO:** NO EXISTE NINGÚN GRADO DE AGLUTINACIÓN

## 10. INFORME DE RESULTADOS

Recordemos que los antígenos del sistema Rh C, c, E, e, son antígenos antitéticos, significando este hecho, que se presentan en el caso de Cc: ambos, uno, **pero nunca ninguno**; lo mismo pasa en el caso de los antígenos Ee.

Los ejemplos indican cómo deben reportarse los resultados:

**RESULTADO FENOTIPOS Rh:** C + c - E + e -

Sin embargo también podría reportarse de manera más detallada:

**Antígeno C:** positivo

**Antígeno c:** negativo

**Antígeno E:** positivo

**Antígeno e:** negativo

## 11. COMENTARIOS

La presencia de resultados positivos inesperados pueden deberse a la presencia de gelatina de Wharton cuando se utiliza sangre de cordón. Para estos casos es fundamental realizar un lavado adicional de los hematíes en cuestión y repetir el procedimiento. Los hematíes que dan un resultado positivo en el Test de Coombs Directo, pueden producir resultados falsos positivos.

Resultados negativos o débiles inesperados pueden presentarse a causa de: antígenos expresados débilmente, o por actividad reducida del reactivo, por ello es vital **NO UTILIZAR REACTIVOS CUYA FECHA DE VENCIMIENTO HAYA EXPIRADO.**

Cuando se trate de reacciones débiles, estas podrán ser potenciadas incubando los tubos de ensayo 15 minutos a 37 °C en calor seco, así como también a la misma temperatura en Baño María.

## CAPÍTULO 7

# DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO KELL (K) MEDIANTE LA TÉCNICA EN TUBO

### 1. RESUMEN

Este capítulo presenta los lineamientos para el procedimiento correcto de la tipificación del antígeno KELL.

El Sistema de Grupo Sanguíneo KELL es el sistema más importante luego del ABO y Rh, debido al alto polimorfismo y antígenos fuertemente inmunogénicos que incluye.

Es un Sistema de Grupo sanguíneo altamente polimórfico existiendo más de 30 aloantígenos relacionados al sistema, en el cual, los pares de alelos producen Antígenos antitéticos uno de baja y otro de alta incidencia y los antígenos suelen expresarse en forma de alelos por ejemplo K1 y K2 o Kell y Cellano; dicho de otra manera K y k.

Según estudios realizados a nivel internacional, el antígeno K solo está presente en un 3% de la población.<sup>(28)</sup>

El antígeno KELL se presentó con una frecuencia de 0.6% en el total de 85,396 donantes de sangre efectivos; en ninguno de los casos su presencia coincidió además con la presencia de anticuerpos irregulares en un estudio realizado en la ciudad de La Paz-Bolivia.<sup>(16)</sup>

Los antígenos del Sistema Kell de mayor importancia clínica son: K, k, Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup>, Js<sup>a</sup> y Js<sup>b25</sup>, suelen estar presentes en el feto desde la décima semana de gestación, encontrándose perfectamente desarrollados en los hematíes del Recién Nacido.

Por las características anteriormente expuestas, es muy importante que en los Bancos de Sangre del país se determine su presencia en todos los donantes de sangre, para que así en los casos positivos antígeno KELL, se tenga cuidado y se tome la decisión pertinente al momento de proceder con el despacho de una unidad KELL POSITIVO.

Los anticuerpos del sistema Kell ocupan el tercer lugar en frecuencia de detección de anticuerpos irregulares en los Bancos de Sangre, son del tipo Ig G, subclase IgG<sub>1</sub> y ocasionalmente fijan complemento; en menor frecuencia son del tipo Ig M, esto según literatura extranjera y coincidentemente también son muy frecuentes en nuestro país (aproximadamente 5%).<sup>(14),(15),(16)</sup>

Anti-K y anti-k son capaces de causar reacciones graves, tales como reacción hemolítica post transfusional y la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN). Los aloanticuerpos pueden persistir por años.

La distribución de frecuencia fenotípica para ambos antígenos del sistema sanguíneo Kell son similares en diversas poblaciones del mundo, en las cuales coincide que el antígeno más frecuente es el antígeno K2 o kell (k minúscula) llamado también Cellano, éste se encuentra presente según las poblaciones entre un 97-99% de la población, y en el caso del antígeno K1 KELL (K mayúscula) estaría únicamente presente entre el 1-3% de la población.<sup>(23)</sup>

No se puede dejar de mencionar que también es un serio inconveniente al momento de realizar las

pruebas cruzadas cuando se tienen receptores de sangre que previamente se han aloimmunizado contra antígenos de alta frecuencia, pues si el aloanticuerpo que posee reconoce un antígeno de alta frecuencia, como lo es el antígeno K2, (k o Cellano) será muy complejo encontrar glóbulos rojos compatibles ya que dicho receptor tendrá un anticuerpo contra un antígeno que es tan frecuente que prácticamente está presente en todas las unidades de las cuales se dispondrán en los Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión.

## 2. ALCANCE

Estas recomendaciones deben ser aplicadas en Bancos de Sangre a todas las muestras provenientes de los donantes de sangre.

## 3. INTRODUCCIÓN

El sistema de grupos sanguíneos KELL fue descubierto en 1946, fue nombrado de ésta manera ya que el anticuerpo se detectó por primera vez en la Sra. Kelleher, una paciente en la que los anticuerpos anti-K habrían dado origen a que su bebé desarrollara la EHRN Enfermedad Hemolítica del Recién nacido. Se comprobó que los hematíes del neonato expresaban Antígeno KELL y que se hallaban sensibilizados con los anticuerpos Anti-K de la madre.

A partir de entonces se fueron descubriendo más antígenos que formaron parte de este sistema, en 1949 Levine describe el anti-k o Cellano, como alelo antitético del KELL, en 1957 Allen y Lewis demuestran que los Antígenos Kp<sup>a</sup> y Kp<sup>b</sup> pertenecen al Sistema Kell y en 1979 es descrito el tercer alelo Kp<sup>c</sup>.

También se describe el fenotipo Ko ó Kell null, un fenotipo caracterizado por un descenso marcado de antígenos Kell al que se denominó fenotipo Mc Leod.

En 1958 es descubierto en Anti- Js<sup>a</sup> y el antitético Js<sup>b</sup> en 1963. A partir de este año se suscitaron una serie de investigaciones y se fueron descubriendo más antígenos, para llegar al número actual de antígenos del sistema Kell que va más allá de las tres decenas.

El sistema de grupos sanguíneos de Kell es complejo. El locus de Kell es altamente polimórfico y da lugar a muchos antígenos Kell.

Sin embargo, hay dos genes alélicos codominantes mayores que producen dos antígenos importantes: K y k (anteriormente conocidos como Kell y Cellano, respectivamente), que difieren por un solo aminoácido. El antígeno k es más común que el antígeno K en la mayoría de las poblaciones, el fenotipo K-k + se encuentra en el 98% de las personas de raza negra y en el 91% de los caucásicos.<sup>(18)</sup>

Los anticuerpos anti-Kell suelen ser de la clase de anticuerpos Ig G (encontrar un Ig M es mucho menos común).

Los anticuerpos que han estado implicados en causar reacciones transfusionales que ocasionalmente pueden ser de naturaleza severa, incluyen a los siguientes: anti-K, anti-k, anti-Kp<sup>a</sup> y anti-Js<sup>b</sup>.<sup>(24), (25)</sup>

Debido a que la frecuencia del antígeno KELL es tan baja en la población, existe el riesgo al transfundir una unidad KELL POSITIVO a un receptor, de que se produzcan anticuerpos Anti-KELL, por tanto, si en el futuro esta persona requiriese una transfusión sanguínea nuevamente, y se transfundiera una unidad KELL POSITIVO, la reacción transfusional sería severa.

De igual manera es muy importante recordar que si no se detectan los anticuerpos irregulares correctamente, por ejemplo, en este caso un Anti-KELL, y se transfunden en componentes sanguíneos que contienen plasma, se produciría una inmunización pasiva.

Es por ello que; su uso únicamente es para aquellos casos de pacientes adultos varones mayores de 60 años en los que se solicita una transfusión sanguínea única.

## 4. DEFINICIONES IMPORTANTES

### 4.1. REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

Los antígenos de los hematíes son estructuras químicas que proporcionan propiedades específicas a su superficie y que solo pueden detectarse con anticuerpos que corresponden a esos antígenos, la mayoría de estas reacciones antígeno-anticuerpo implican la aglutinación o hemólisis de los hematíes.

La aglutinación de los hematíes por el anticuerpo depende de la capacidad física de la molécula de Inmunoglobulina para cubrir la distancia que los separa y formar un enlace tridimensional, la declinación se presentará solamente si la molécula es suficientemente larga para cubrir esta distancia. Tres factores intervienen en el fenómeno de aglutinación:

- ✓ Tamaño molecular del anticuerpo.
- ✓ Posición y número de los antígenos celulares.
- ✓ Fuerza y repulsión entre los eritrocitos o potencial zeta. <sup>(24)</sup>

### 4.2. REACTIVOS DE TIPIFICACIÓN MONOCLONAL

Estos reactivos utilizados en Inmunohematología, son una poderosa herramienta y están siendo usados desde hace ya varios años atrás cada vez con mayor insistencia para la fenotipificación antigénica de los hematíes en lugar de los reactivos policlonales.

Los anticuerpos monoclonales son producidos por hibridomas linfocitarios que se producen por la fusión de células productoras de anticuerpos (linfocitos B) de animales inmunizados y células neoplásicas de mieloma. Los anticuerpos monoclonales humanos con especificidad para antígenos de grupo sanguíneo también han sido sintetizados por transformación de linfocitos B humanos con virus de Epstein Barr en células linfoblastoideas que pueden crecer en cultivo y secretar anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales difieren de los anticuerpos convencionales en tres características:

- ✓ Especificidad: reaccionan con un único determinante antigénico en lugar de hacerlo con múltiples de ellos.
- ✓ Pureza: no solamente una fracción del contenido proteico sérico es Inmunoglobulina sino todo el reactivo.
- ✓ Reproducibilidad: se espera la misma especificidad y afinidad para cada sub cultivo proveniente de un único clon. <sup>(24)</sup>

### 4.3. POLIETILENGLICOL

El PEG es un polímero lineal hidrosoluble que se usa como aditivo para incrementar la cap-

tación de anticuerpos. Su acción principal es eliminar el agua intercelular favoreciendo el acercamiento de los hematíes.

## 5. DESARROLLO

### A) MUESTRA

La muestra adecuada es sangre recogida con anticoagulante EDTAK<sub>3</sub>, para poder tener los hematíes viables que nos permitan preparar las suspensiones celulares correspondientes con la calidad óptima (sin rastros de hemólisis).

### B) REACTIVOS

Solución Salina Fisiológica Estéril SSFE o SSFE tamponada con PBS para la preparación de suspensiones celulares y lavado de células.

Se requiere también la utilización del antisuero comercial Anti-KELL, debiendo presentar la característica de ser reactivo Monoclonal que contenga anticuerpo monoclonal Ig M, diluido en tampón fosfato que contenga cloruro sódico (0.9 g%), albúmina bovina (6 g%) y potenciadores macro moleculares, pudiendo ser un ejemplo en Polietilenglicol PEG.

## 6. TÉCNICAS

En cuanto a la técnica para la determinación del antígeno KELL, puede ser efectuada en tubo, en micro placa o mediante la Técnica de Micro aglutinación en columna con partículas de gel. El presente documento se dedicará a la determinación del antígeno K mediante la técnica en tubo.

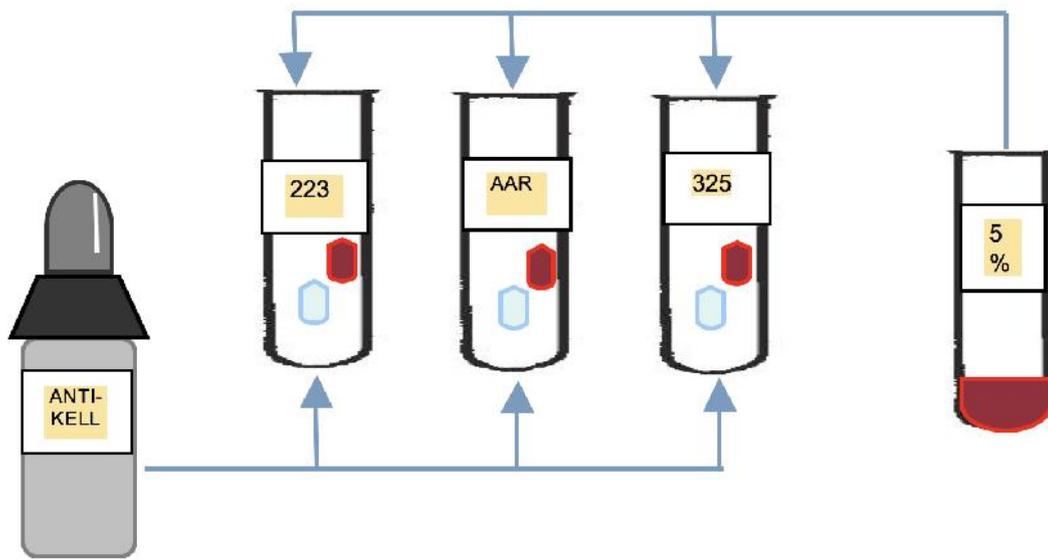
## 7. ACCIONES PRELIMINARES

- 🔴 Atemperar el reactivo Anti-K a temperatura ambiente 20 minutos antes de iniciar las determinaciones.
- 🔴 Realizar el Control de Calidad Diario de la Solución Fisiológica SSFE.
- 🔴 Verificar que la muestra se encuentre correctamente identificada.

## 8. PROCEDIMIENTO

- a) Obtener bien diferenciado el paquete globular y el plasma en la muestra obtenida de acuerdo al tiempo y número de revoluciones que se hubieran estandarizado en el Servicio de Sangre, (Ej. 5-10 minutos a 3500 rpm, luego, proceder a separar el plasma en otro tubo de ensayo para dejar el empaquetado de glóbulos rojos.
- b) Preparar una suspensión al 5% de los hematíes a tipificar en SSFE o en SSFE tamponada con PBS. Se deben seguir estrictamente las instrucciones referidas en el inserto del reactivo que se esté utilizando ya que puede ser que indique la necesidad de lavar los hematíes antes de preparar la suspensión.
- c) Numerar la batería de tubos con la identificación correcta y clara de la persona o el número de muestras en las cuales se requiera determinar la presencia del antígeno KELL.
- d) Utilizando el gotero del frasco añadir una gota del reactivo anti-KELL a cada tubo y luego dispensar 50 ul de la suspensión celular preparada al 5% de acuerdo al siguiente diagrama didáctico:

**Gráfico N° 14.** Procedimiento para la realización de la técnica para la determinación del antígeno KELL.



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

- e) Homogenizar manualmente mediante agitación suave del tubo y proceder a la centrifugación durante un minuto a 1000 rpm.
- f) Sobre la fuente de luz proporcionada por un aglutinoscopio resuspender cuidadosamente el botón celular y leer macroscópicamente si existe reacción de aglutinación.
- g) En los casos en los que se evidencia aglutinación débil en los tubos de ensayo, deben dejarse los mismos durante 15 minutos a temperatura ambiente para luego proceder a repetir los pasos de centrifugación y lectura.

## 9. INTERPRETACIÓN

Si se ha producido una aglutinación, la reacción es positiva y el antígeno correspondiente al reactivo utilizado está presente en la membrana de los hematíes analizados. Si no ha habido aglutinación, la reacción es negativa y el antígeno no está presente en estos hematíes.

## 10. INFORME DE RESULTADOS

Cuando exista evidencia de aglutinación indicando la presencia del antígeno K en los hematíes testados, el resultado deberá informarse de la siguiente manera:

DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO KELL: **POSITIVO**

Cuando no exista evidencia de aglutinación indicando que el antígeno K no se encuentra presente en la membrana de los hematíes testados, el resultado deberá informarse de la siguiente manera:

DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO KELL: **NEGATIVO**

## 11. COMENTARIOS

La transfusión de Sangre Total y Paquete Globular con fenotipo KELL positivo, por única vez podrán

ser transfundidos a receptores varones mayores de 60 años, teniendo especial cuidado de que bajo ningún concepto se transfundan estas unidades a:

1. Pacientes que recibirán varias unidades de sangre y/o hemocomponentes.
2. Pacientes que presentaron reacciones transfusionales en los días previos.
3. Mujeres en edad fértil.
4. Pacientes pediátricos.
5. Pacientes poli transfundidos.

Se recomienda el uso de un reactivo control , constituido por Albúmina Sérica Bovina ASB 22% durante la determinación de antígeno KELL en glóbulos rojos de personas que se conoce que poseen auto anticuerpos, personas cuyos hematíes presenten Test de Coombs Directo Positivo, así como cuando se realice la determinación utilizando como muestra sangre de cordón.

Se debe tener en cuenta la estabilidad de las reacciones y si bien es cierto que una aglutinación formada no puede revertirse, es ideal leer las reacciones inmediatamente después de la centrifugación.

Las muestras de sangre almacenada de manera inadecuada o almacenada a 4°C por un máximo de tiempo de 7 días, puede dar reacciones más débiles que la sangre fresca atribuible a posibles alteraciones de la membrana eritrocitaria.

Es evidente que podrían presentarse resultados tanto falsos positivo y falsos negativo debido a:

- ✓ Uso de material contaminado, por malas técnicas de lavado sin realizar posteriormente la esterilización de los mismos.
- ✓ Inadecuada preparación de la suspensión celular ya sea muy diluida o muy concentrada, por ello se recomienda que se realice la misma al 5%.
- ✓ Una desviación de las instrucciones efectuadas por el fabricante que están referidas en el inserto del reactivo, podría traer como consecuencia que los resultados sean erróneos.
- ✓ Los fabricantes de reactivos no se responsabilizan de los resultados obtenidos, si se utilizan los reactivos fuera de la fecha límite de validez de los mismos, actualmente no existe ninguna evidencia y mucho menos norma alguna que sustente el uso de reactivos vencidos **ni 1, 3 ni 6 meses posteriores a su caducidad aún cuando se utilicen controles internos.**

## CAPÍTULO 8

### CONTROL DE CALIDAD EN INMUNOHEMATOLOGÍA

Si bien conseguir la excelencia es meta de todas las especialidades médicas, la medicina transfusional ha sido una de las que más medidas ha adoptado en los últimos años para lograrla. Ello se debe a que esta especialidad se sitúa en el punto de mira de la sociedad en general y a que las transfusiones sanguíneas siguen presentando riesgos, aunque sean mínimos, para la salud de los receptores.<sup>(27)</sup>

Una organización orientada a la calidad, proporciona una cultura cuyos resultados se evidencian en el comportamiento, las actitudes y los procesos que se hacen perceptibles mediante la satisfacción de las necesidades y expectativas de los interesados.

La NORMA ISO 9000:2015 indica que la calidad es el “grado en el que un conjunto de características inherentes de un objeto cumple con los requisitos”.<sup>(28)</sup>

Se debe entender “objeto” como todo lo que pueda percibirse o concebirse”, como por ejemplo: un producto, un servicio, un proceso, un recurso, un sistema, una organización.

Por tanto, ya en el tema de gestión de calidad, se busca establecer responsabilidades, corregir errores encontrados, realizar auditorías internas, y cumpliendo todo lo anteriormente dicho encaja a cabalidad la tarea de implantar procedimientos de control de calidad en Inmunohematología.

Básicamente se deberá vigilar la estabilidad de los procesos y procedimientos a fin de tener resultados confiables, a través de ejecutar acciones tales como:<sup>(29)</sup>

- ✓ Controlar el desempeño de reactivos, materiales, equipamiento, métodos analíticos y capacitación del personal.
- ✓ Establecer señales de alerta para prevenir la liberación de resultados no conformes e identificar la necesidad de establecer acciones correctivas.

#### 1. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL CONTROL DE EQUIPAMIENTO

- ✓ Se deberán adquirir equipamientos que atiendan a las necesidades particulares de cada Servicio de Sangre.
- ✓ Mantener los equipos calibrados y sus manuales deberán estar accesibles para los usuarios.
- ✓ Contratar personal calificado para que realice mantenimientos preventivos y correctivos de los equipos y elaborar un registro histórico de los mismos.
- ✓ Establecer registros de control de temperaturas con tres registros diarios de las temperaturas de estufas de incubación, baños maría, refrigeradores y congeladores mediante el uso de termómetros digitales con sonda.
- ✓ Elaborar fichas técnicas para cada equipo en el que estén definidos los pasos resumidos para el funcionamiento y conservarlos al lado de cada uno de ellos, de esta manera un operador nuevo podrá ponerlos en marcha sin mayores inconvenientes.

#### 2. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL CONTROL DE TÉCNICAS

- ✓ Seguir estrictamente las instrucciones de los insertos de cada reactivo utilizado en las diferentes técnicas inmunohematológicas.

- ✓ Utilizar controles positivos y negativos en la realización de las técnicas.
- ✓ Para la validación de las pruebas de Coombs utilizar siempre las Células Control de Coombs (CCC), a fin de validar los resultados que no hubieran presentado aglutinación al realizar la técnica en tubo.
- ✓ Utilizar obligatoriamente el reactivo Anti-AB y un reactivo Anti-D (IgM/IgG blend) que permita detectar variantes D además de Rhesus Control o Albúmina Sérica Bovina al 22% del mismo fabricante del Anti-D, como control negativo en la determinación de grupo sanguíneo Sistemas ABO y Rh.
- ✓ Procesar técnicas en paralelo cuando se implementa una nueva técnica o tecnología siguiendo el nuevo protocolo de manera conjunta con el método que se estaba utilizando para evaluar la concordancia de ambas técnicas.

### 3. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL CONTROL DEL PERSONAL OPERATIVO

- ✓ Establecer un programa de inducción en el caso de que personal técnico operativo comience a trabajar en el Área de Inmunohematología de un Servicio de Sangre, asegurándose de que conoce y sigue los Procedimientos Operativos Estandarizados además de tener las aptitudes técnicas para llevarlos a cabo de manera adecuada.
- ✓ Realizar cursos de educación continua tanto en el parte teórica como en la parte práctica.
- ✓ Formar parte de Programas Externos de Control de Calidad PECC, de manera continua y sistematizada.

### 4. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL CONTROL DE LOS REACTIVOS

- ✓ Diseñar los Procedimientos Operativos Estandarizados para realizar la Evaluación del Desempeño de los Reactivos Hemoclasificadores y Reactivo de Coombs, cada vez que se reciba un nuevo lote, considerando los parámetros de Especificidad, Avidéz, Título y Potencia, estableciendo los instrumentos de verificación mediante registros.
- ✓ Establecer un Control de Calidad Diario para evaluar los Reactivos Hemoclasificadores y el Reactivo de Coombs antes de empezar cada jornada de trabajo estableciendo los instrumentos de verificación mediante registros.
- ✓ Participar en Programas Externos de Control de Calidad para Inmunohematología, estableciendo los instrumentos de verificación mediante registros.
- ✓ Control de existencias de reactivos con el fin de asegurar que el período de vencimiento es suficiente y no exista riesgo de caducidad.

### 5. PRINCIPALES REACTIVOS UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA

- ✓ Antisueros: reactivos que permiten identificar antígenos presentes en la membrana de los hematíes. Algunos ejemplos de antisueros son: Anti-A, Anti-B, Anti-AB, Anti-D, Rhesus Control, Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e, Anti-K.
- ✓ Lectinas: son reactivos obtenidos básicamente de gramíneas (familia de plantas herbáceas) que permiten diferenciar los subgrupos de A, tal es el caso de Anti-A1 y Anti-H.
- ✓ Reactivos Eritrocitarios o Paneles Celulares: Están constituidos por células de personas cuyo fenotipo parcial o total es conocido. Permiten llevar a cabo las pruebas Inversa o Sérica así como la Detección e Identificación de Anticuerpos Irregulares. Pueden ser adquiridos comercialmente o preparados en los Servicios de Sangre.
- ✓ Potenciadores de Reacción: Son reactivos que adicionados a las pruebas permiten facilitar la interacción entre antígenos y anticuerpos aproximando los hematíes, facilitando la reacción de aglutinación y consecuentemente disminuyendo el tiempo de reacción. Los potenciadores de reacción que se utilizan con mayor frecuencia son: Albúmina Sérica Bovina al 22% (ASB), Solución de Baja Fuerza Iónica LISS y Bromelina.

- ✓ Reactivo Antiglobulina Humana o Reactivo de Coombs: es un heteroanticuerpo que reconoce Anti-IgG y Anti-C<sub>3d</sub> humanas, siendo el fundamento de su utilización un artificio que permite visualizar mejor la reacción de aglutinación.
- ✓ Soluciones de Lavado y Preparación de Suspensiones Celulares: Son fundamentalmente la Solución Salina Fisiológica Estéril SSFE y la SSFE tamponada con PBS a pH 7,2 +/-0,2.
- ✓ Soluciones para conservar los Hematíes por tiempos más prolongados, tal es el caso de la Solución de Alsever que permite la conservación de los mismos por al menos 8 a 10 semanas, durante las cuales se mantiene la integridad de la membrana celular hemática sin que se altere la integridad de los antígenos de grupo sanguíneo, siempre y cuando se conserven a una temperatura de 4 +/- 2 °C, bajo protección de la luz.

### 5.1. CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA

A todos los reactivos utilizados en Inmunohematología, se debe realizar una inspección visual de:

- ✓ Ausencia de precipitados, partículas, hongos, y turbidez en el caso de los antisueros, potenciadores de reacción y soluciones de lavado y preservación de hematíes.
- ✓ Ausencia de hemólisis, cambio de coloración de los hematíes y signos de contaminación en los reactivos celulares.
- ✓ Verificación de que cada reactivo incluya el inserto donde se especifiquen claramente en idioma español: el nombre del fabricante, dirección, el nombre del producto, composición, instrucciones claras de uso, referir para las técnicas para las cuales fue diseñado, descripción completa de la técnica a seguir, interpretación de resultados, limitaciones de la prueba, conservante utilizado, precauciones que se debe seguir para manipular el reactivo, así como debe indicar si el producto fue testado para los principales patógenos transmitidos por sangre dando a conocer el resultado negativo de los mismos.
- ✓ Verificación de la integridad de los envases secundarios y envases primarios.
- ✓ En cuanto a la etiqueta debe contener la siguiente información mínima: nombre del producto, nombre del fabricante, número de licencia en el país de origen, número de lote, fecha de vencimiento, temperaturas óptimas de almacenamiento (mínima y máxima), volumen del producto, fuente del producto ya sea monoclonal o humana, e identificación diseño gráfico o logo de la marca comercial. Así mismo la etiqueta no debe cubrir completamente el producto, ya que debe permitir la inspección visual del reactivo.
- ✓ Todos los reactivos deberán estar esterilizados de manera previa a su utilización. En el caso de los reactivos hemoclasificadores, al momento de realizar la calificación de los mismos de manera previa a su adjudicación deberá darse mayor puntaje si las roscas de los mismos cumplen la característica de ser azul o celeste para el anti-A, amarillo para el anti-B, plomo o rosado para el Anti-AB y negro o blanco para el anti-D. Los bulbos de los goteros pueden ser todos negros, plomos o blancos.
- ✓ Verificar de manera previa a la adquisición de reactivos que cuenten con Registro Sanitario Actualizado, situación que puede ser evidenciada en la página web de la Agencia de Medicamentos AGEMED: (<http://agemed.minsalud.gob.bo/reg-far/>), página que es actualizada regularmente o solicitando directamente dicha información en las oficinas de ésta institución pública desconcentrada del Ministerio de Salud.<sup>(30)</sup>

### 5.2. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE SUEROS HEMOCLASIFICADORES ANTI-A, ANTI-B, ANTI-AB. ANTI-D, RHESUS CONTROL

Entre los parámetros que obligatoriamente se deben verificar, están: Especificidad, Avidéz y el Título que va relacionado con la Potencia del reactivo, al cual se le puede asignar un score o puntaje.

A continuación se describe cada uno de los parámetros que deben ser tomados en cuenta:

**5.2.1. AVIDEZ:** es una medida de la capacidad de unión y la velocidad con el cual el anticuerpo se combina con su correspondiente antígeno.

Los valores de referencia que fueron consensuados para su aplicación en las evaluaciones de desempeño de los reactivos son los siguientes:

VALORES DE REFERENCIA PARA LA PRUEBA DE AVIDEZ (UTILIZAR LA SUSPENSIÓN DE HEMATÍES ESTABLECIDA SEGÚN LAS INSTRUCCIONES DEL INSERTO DEL REACTIVO QUE SE ESTÁ EVALUANDO)			
	GRUPO SANGUÍNEO O SUBGRUPO DE ERITROCITOS ENSAYADOS	NÚMERO DE ESPECÍMENES A TESTAR EN LA PRUEBA DE AVIDEZ	MÁXIMO TIEMPO (SEGUNDOS) EN QUE TENDRÍA QUE INICIARSE LA AGLUTINACIÓN
REACTIVO ANTI-A	A <sub>1</sub>	2	7
	A <sub>2</sub>	2	10
	A <sub>1</sub> B	1	7
	A <sub>2</sub> B (SI ESTUVIERA DISPONIBLE)	1	10
REACTIVO ANTI-B	B	3	8
	A <sub>2</sub> B	1	10
	A <sub>2</sub> B (SI ESTUVIERA DISPONIBLE)	1	10
REACTIVO ANTI-AB	A <sub>1</sub>	2	10
	A <sub>2</sub>	2	15
	B	3	8
REACTIVO ANTI-D	D POSITIVO R1r (C+c+E-e+)	3	DENTRO DE 20 SEGUNDOS
	D POSITIVO R0r (C-c+E-e+)	3	DENTRO DE 20 SEGUNDOS
	D DÉBIL (SI ESTUVIERA DISPONIBLE)	1	DENTRO DE 30 SEGUNDOS

Fuente: Programa Nacional de Sangre / Ministerio de Salud

**5.2.2. ESPECIFICIDAD:** es la reactividad selectiva de un anticuerpo con su correspondiente antígeno, por lo que cada antisuero se hace reaccionar con los diferentes tipos de células (de los sistemas sanguíneos ABO y Rh) observando si hubo aglutinación inespecífica. Los resultados que se deben obtener son los siguientes:

ANTISUERO	CÉLULAS A <sub>1</sub>	CÉLULAS A <sub>2</sub>	CÉLULAS A <sub>1</sub> B	CÉLULAS B	CÉLULAS O	CÉLULAS D (+)	CÉLULAS D (-)
ANTI-A	+	+	+	-	-		
ANTI-B	-	-	+	+	-		
ANTI-AB	+	+	+	+	-		
ANTI-D						+	-
RHESUS CONTROL	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

**5.2.3. TITULACIÓN:** es la medición de la máxima dilución del antisuero al cual es todavía capaz de reaccionar con las células que corresponda.

Se busca el límite de detección de reacciones específicas para cada suero en estudio realizando diluciones seriadas dobles (1:2, 1:4, 1:8,...etc.) de los reactivos hemoclasificadores; dicho de otra manera, se evalúa la sensibilidad del reactivo.

El resultado se expresa como el recíproco de la mayor dilución del suero que da una lectura de aglutinación de al menos 1+ ante un volumen constante de eritrocitos en suspensión del 2-5%.

Los valores de referencia que fueron consensuados para su aplicación en las evaluaciones de desempeño de los reactivos son los siguientes:

VALORES DE REFERENCIA PARA LA PRUEBA DE TITULACIÓN			
	GRUPO SANGUÍNEO O SUBGRUPO DE ERITROCITOS ENSAYADOS	NÚMERO DE ESPECÍMENES A TESTAR EN LA PRUEBA DE TITULACIÓN	TÍTULO MÍNIMO ACEPTABLE
REACTIVO ANTI-A	A <sub>1</sub>	2	256
	A <sub>2</sub>	2	128
	A <sub>1</sub> B	2	128
REACTIVO ANTI-B	B	2	256
	A <sub>1</sub> B	2	64
REACTIVO ANTI-AB	A <sub>1</sub>	2	256
	A <sub>2</sub>	2	64
	B	2	128
REACTIVO ANTI-D MEZCLA DE SALINO Y ALBUMINOSO IgG E IgM	D POSITIVO R1r (C+c+E-e+)	2	32
	D POSITIVO R0r (C-c+E-e+)	2	32

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

**5.2.4. POTENCIA:** es el grado medido en cruces, de la intensidad de la reacción de aglutinación, al cual se le asigna un puntaje conocido también como “score”.

Los valores de asignación de puntos según la intensidad en cruces de la reacción de aglutinación que fueron consensuados para su aplicación en las evaluaciones de desempeño de los reactivos son los siguientes:

LECTURA	AGLUTINACIÓN	PUNTOS
++++	UN SOLO CÚMULO GRANDE.	10
+++	GRANDES CONGLOMERADOS CON POCOS ERITROCITOS LIBRES.	8
++	GRAN CANTIDAD DE CONGLOMERADOS PEQUEÑOS CON UN NÚMERO MODERADO DE ERITROCITOS LIBRES.	6
+	CONGLOMERADOS DEFINIDOS FINOS (CÚMULOS DE 20 ERITROCITOS O MENOS).	3
±	ERITROCITOS DISPERSOS QUE PUEDEN CONTENER OCASIONALMENTE ALGÚN CONGLOMERADO PEQUEÑO.	1
-	LOS ERITROCITOS SE MUEVEN LIBREMENTE. NO HAY CONGLOMERADOS VISIBLES.	0

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

**Nota.-** El score o puntaje cumple la finalidad de “calificar” un grupo de reactivos. Cuando se hayan evaluado: avidéz, especificidad, titulación y potencia y se obtengan valores similares en todos los parámetros, el score o puntaje, permitirá tomar la decisión final de cuál será el reactivo que se seleccionará.

Será mejor el reactivo que aún estando diluido en las pruebas de titulación, permita evidenciar reacciones “más fuertes”, es decir con aglutinaciones de 3-4 cruces (+) en el mayor número de tubos.

La sumatoria del puntaje de cada uno de los tubos dará el valor final asignado.

## 6. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL REACTIVO DE COOMBS

El reactivo de Coombs Anti Inmunoglobulina Humana para su evaluación como diagnosticador, debe cumplir los requisitos de especificidad y titulación.

La determinación de la avidéz no aplica en la evaluación del desempeño ya que el reactivo de Coombs no se utiliza en placa.

**6.1. TÍTULO:** implica evaluar el límite de detección de reacciones específicas del reactivo de Coombs, realizando diluciones seriadas dobles del reactivo (1:2, 1:4, 1:8,...etc.), vale decir, se evalúa la sensibilidad

**6.2. ESPECIFICIDAD:** mide la capacidad del reactivo para reaccionar exclusivamente con hematíes sensibilizados utilizando Células Control de Coombs CCC (ver Apéndice 4).

Se debe proceder utilizando CCC y células no sensibilizadas y realizar un Test de Coombs Directo, la reacción deberá ser positiva con las CCC y deberá ser negativa con células que no fueron sensibilizadas y constituyen el Control Negativo (células O Rh D positivo o negativo que dieron resultado negativo al realizar el Test de Coombs Directo).

El título mínimo aceptable debe ser de 1:32<sup>(31)</sup>, utilizando CCC para la reacción de aglutinación en tubo.

## 7. CONTROL DE CALIDAD DIARIO DE LOS REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES, REACTIVO DE COOMBS Y CELULAS A, B, O.

Como ya fue mencionado, existen procedimientos de control de calidad que el personal de los Servicios de Sangre debe realizar a cada nuevo lote de reactivos para verificar la conformidad de los criterios mínimos aceptables que ya fueron definidos en lo referente a la especificidad, avidéz, título y potencia.

Cualquier reactivo que no cumpla con las especificaciones requeridas no debe ser utilizado.

La frecuencia de este tipo de evaluación dependerá de las compras de los reactivos y de manera específica de las entregas de diferentes lotes.

Se reitera que ante la recepción de un nuevo lote, procede realizar una nueva evaluación de desempeño, misma que deberá estar sistemáticamente registrada y archivada.

Sin embargo, cada día al empezar la jornada de trabajo, se debe realizar otro tipo de control de calidad, denominado Control de Calidad Diario de Reactivos Hemoclasificadores, Reactivo de Coombs y Células A,B,O.

Se debe disponer de hematíes de fenotipo conocido: A, B, O, células Rh D positivo, células Rh D negativo, células sensibilizadas: CCC y células no sensibilizadas para poder evaluar los Reactivos Hemoclasificadores y el reactivo de Coombs.

Así también se requiere disponer de alícuotas de suero o plasma de personas del grupo sanguíneo A, B y O para evaluar las células A, B y O que se utilizan en la Prueba Inversa.

Los hematíes pueden ser adquiridos de manera comercial o preparados en el laboratorio.

El control de calidad diario nos permite tener la certeza de que los resultados reportados en el día no presentaran fallos atribuibles al desempeño de los reactivos en lo referente a la ejecución de la técnica.

Los resultados de los controles diarios deben ser registrados y sistemáticamente archivados.

En el Apéndice 11 se presenta un modelo que podría ser adaptado por los Servicios de Sangre.

## 8. CONTROL DE CALIDAD DE LA SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA SSFE

La Solución Salina Fisiológica Estéril, debe ser controlada de acuerdo a parámetros que a continuación se detallan, indicando además la frecuencia del procedimiento.

PARÁMETRO A SER EVALUADO	REQUERIMIENTO DE CALIDAD	FRECUENCIA DEL CONTROL
APARIENCIA	MEDIANTE INSPECCIÓN VISUAL, NO EXISTE TURBIDEZ, PRESENCIA DE PARTICULAS NI CAMBIO DE COLORACIÓN.	DIARIO
pH	6,0 A 8,0	DIARIO PARA SSFE QUE NO HA SIDO TAMPONADA A pH 7,2 CON PBS
REACTIVIDAD	NO HAY AGLUTINACIÓN DE HEMATÍES NO SENSIBILIZADOS, NO HAY ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.	CADA NUEVO LOTE

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

## 9. CONTROL DE CALIDAD DE LA SOLUCIÓN DE BAJA FUERZA IÓNICA LISS

La Solución de Baja Fuerza Iónica LISS, debe ser controlada de acuerdo a parámetros que a continuación se detallan, indicando además la frecuencia del procedimiento.

PARÁMETRO A SER EVALUADO	REQUERIMIENTO DE CALIDAD	FRECUENCIA DEL CONTROL
APARIENCIA	MEDIANTE INSPECCIÓN VISUAL, NO EXISTE TURBIDEZ, PRESENCIA DE PARTÍCULAS NI CAMBIO DE COLORACIÓN.	DIARIO
pH	6,5 A 7,0	CADA NUEVO LOTE
REACTIVIDAD	NO HAY AGLUTINADOS DE HEMATÍES NO SENSIBILIZADOS, NO HAY ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.	CADA NUEVO LOTE

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

## 10. CONSIDERACIONES SOBRE EL DESCARTE DE LOS REACTIVOS

La fabricación de antisueros utilizados en Inmunohematología, tiene dos orígenes: uno policlonal y otro monoclonal. Los donantes humanos de las células empleadas para producir los hibridomas son ensayados y encontrados no reactivos para Anti-HIV, Anti-HCV, HBsAg y Virus de Epstein Barr EBV. Sin embargo, ningún método conocido puede garantizar que todos los productos derivados de sangre humana estén libres de agentes infecciosos, por ello, se debe tener cuidado en el uso y descarte del envase de cada uno de los reactivos así como de su contenido.

Los reactivos normalmente contienen 0,1% (p/v) de azida sódica. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere y puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre para formar sales altamente explosivas.

Si los remanentes de reactivos, reactivos vencidos, se descartan por el desagüe, se deben verter los contenidos en contenedores con hipoclorito de sodio al 0.5% y dejar una noche en reposo, luego se deben enjuagar con grandes volúmenes de agua para prevenir la acumulación de azidas en las cañerías.

Si es que los reactivos se están descartando en bloques de cemento preparando los “cubos” que son recogidos por desechos patógenos, tener el cuidado pertinente de que los mismos se encuentren bien fraguados y no exista la más mínima posibilidad de filtraciones.



## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Rodríguez M.H. "El Banco de Sangre y la Medicina Transfusional". México D.F. Editorial Médica Panamericana; 2004. pp.:33-85.
- (2) Rodríguez M.H. "El Banco de Sangre y la Medicina Transfusional". México D.F. Editorial Médica Panamericana; 2004. pp.:33-85.
- (3) Medicina y Laboratorio: Programa de Educación Médica Continua Certificada. Universidad de Antioquia-Edimeco-Colombia. Volumen 15; Números 1-2, 2009.
- (4) Daniels G., Castilho L., et al Interantional Society of Blood Transfusion, Commitee on terminology for red blood cells surface antigens. Macao Report Vox Sanguinis 2009; 96: 153-156.
- (5) American Association of Blood Banks Technical Manual. 17th edition, Walker, Arlington, 2012.
- (6) Ramiro Navarrete Coronado, Daniel Segura Ulate, "Frecuencia de Fenotipos del Sistema Rh-Hr en donantes Rh Negativos en el Hospital San Vicente de Paúl", Revista Médica de Costa Rica y Centro América LXIX (601), pp. 143-147, 2012.
- (7) Bonilla Zavala Ruth, "Importancia de las pruebas cruzadas y la búsqueda de anticuerpos". Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS. Medigraphic Artemisa en línea. Versión Julio 2006. [www.medigraphic.com/pdfs/imss](http://www.medigraphic.com/pdfs/imss)
- (8) Eleftherios C. Vamvakas and Morris A. Blajchman "Transfusion related mortality: the ongoing risks of allogenic blood transfusion and the available strategies for their prevention" Bloodjournal.hematologylibrary.org at UCLA (U.S.A.) on may 23,2011.
- (9) "Sir John Dacie", Department of Haematology Imperial College , Faculty of Medicine, Hanmer-smith Hospital, London U.K, annotation 2005. [www.onlinelibrary.wiley.com](http://www.onlinelibrary.wiley.com).
- (10) Medicamentos que producen discrasias sanguíneas. [http://www.humv.es/webfarma/Informacion\\_Medicamentos/Formulario/EA\\_discrasias.htm](http://www.humv.es/webfarma/Informacion_Medicamentos/Formulario/EA_discrasias.htm) Medicamentos/formulario
- (11) Abbas Abul, Lichtman Shiv, "Basic Inmunology" 4th edition Elsevier. Published date: 13th november of 2012, p.336.
- (12) Professional Advisory Committee"Recomended serological techniques for reagent testing", J.P.A.C. Joint United Kingdom (U.K.) Blood Transfusion and Tissue Transplantation Services, en: <http://www.transfusionguidelines.org/red-book/chapter-11-reagent-manufacture/11-4-recommended-serologicl-techniques-for-reagent-testing>.
- (13) "Recomendaciones para la detección e identificación de anticuerpos irregulares eritrocitarios", Departamento de Laboratorio Biomédico Nacional de Referencia. Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud Gobierno de Chile, Diciembre de 2014.

- (14) Escalante Pedraza Fabiana, Tesis: "Investigación del proceso de tamizaje inmunohematológico para la detección de anticuerpos irregulares en el Banco de Sangre de Referencia Departamental de Santa Cruz-Bolivia" Gestiones 2006-2014.
- (15) Herrera Carrasco María Luisa, Tesis: "Frecuencia y tipo de Anticuerpos Irregulares en el tamizaje inmunohematológico de donantes de sangre, Banco de Sangre de Referencia Departamental de Cochabamba-Bolivia" Gestiones 2006-2014.
- (16) Rodríguez Bertón Ana Alicia, Tesis: "Determinación de la frecuencia y especificidad de anticuerpos irregulares y su relación con el antígeno Kell en donantes de sangre efectivos que acuden al Hemocentro-Banco de Sangre de Referencia Departamental de La Paz-Bolivia durante enero de 2006 a noviembre de 2014"
- (17) Luna Gonzales Jacobo, "Anticuerpos Irregulares su importancia en medicina transfusional", Medigraphic versión agosto 2015, en: [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com)
- (18) Armijo O., De la Calle M., et al, "Isoinmunización anti Kell-Manejo Clínico de 26 casos". Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología, 2010; 75 (1): 91-5.
- (19) Daniels G., Castilho L., Flegel W.A., Fletcher A., Garrandy et al., "International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for red cell surface antigens: Macao Report" VoxSanguis 2009;96:153-6.
- (20) "Blood Group Alleles Names for Rh (ISBT 004) workshop 2010" International Society of Blood Transfusion, Nov. 2015, en: [www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics](http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics).
- (21) Wagner F.F., Flegel W.A., Review: The molecular basis of the Rh Blood Group Phenotypes. Immunohaematology 2004, 20 (1): 23-36.
- (22) Gal Iglesias Beatriz, Lopez Gallardo, Meritxell et al "Bases de la Fisiología", Editorial Tebar 2007, p. 120., en: [www.books.google.com](http://www.books.google.com).
- (23) "Frecuencia de Antígenos del Sistema Sanguíneo Rh y del Sistema Kell en donantes de sangre", Publicación en Revista Cubana de Hematología y Hemoterapia, vol. 31, No. 2. Ciudad de La Habana, Abril-Junio-2015.
- (24) Reid Me and Lomas-Francis, "The Blood Group Antigen Facts Book", Second ed. 2004, New York: Elsevier Academic Press. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (National Center of Biotechnology Information U.S.A.).
- (25) Servicio de Medicina Transfusional "Más allá del ABO y Rh", Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Agosto 2013, [www.hemobaires.org.org](http://www.hemobaires.org.org).
- (26) Vedia Dely, Aro Silvia, Morales Ma. Eugenia, Herrera Ma. Luisa, "Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados para Tamizaje Inmunohematológico", Banco de Sangre de Referencia Departamental de Cochabamba, Versión 007, POE-TIH-006v009, pagina 13.
- (27) Franco Elena, "El control de Calidad de los análisis inmunohematológicos en la región de las

Américas”, pp. 176, en: <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v13n2-3/15736.pdf>.

- (28) El concepto de calidad en ISO 9001:2015, publicado en agosto de 2015 en <http://www.calidadprimero.com/2015/08/20/el-concepto-de-calidad-en-iso-90002015/>.
- (29) Ferreira Melgaco Angela, Barjas de Castro Maria de Lourdes et als, “ Inmuno-Hematología Laboratorial, Editado y publicado por Ministerio de Salud, Secretaria de Atención en Salud, Departamento de Atención Hospitalaria y de Urgencias, Brasilia-Brasil 2014, pp. 11-19.
- (30) Manual para Registro Sanitario de Reactivos de Diagnostico, UNIMED R.M.0298 La Paz, Bolivia Junio de 2002. Documento para consulta en: <http://agemed.minsalud.gob.bo/reg-far/>
- (31) Garcia Rosasco M. “Inmunoematología Eritrocitaria: De la teoría a la práctica”, (visita a Bolivia año 2017).



## APÉNDICE 1

### PREPARACIÓN DE CÉLULAS TESTIGO A, B, O UTILIZADAS PARA LA CONFIRMACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO ABO MEDIANTE PRUEBA INVERSA O SÉRICA

La determinación del Grupo Sanguíneo en el Sistema ABO debe ser realizada de manera simultánea mediante dos tipos de pruebas:

- ✓ Una prueba directa llamada también prueba celular
- ✓ Una prueba inversa llamada también prueba sérica

En la prueba directa se utilizan reactivos comerciales Anti-A, Anti-B y Anti-AB, para identificar la presencia de antígenos A y B en la membrana del hematíe.

En la prueba inversa se utilizan hematíes A y B para verificar la presencia de anticuerpos de grupo sanguíneo conocidos como isoaglutininas Anti-A y Anti-B referidos también como “anticuerpos regulares”.

Los hematíes A y B pueden ser adquiridos de manera comercial o pueden ser preparados en los Servicios de Sangre.

En la prueba inversa, se incluyen además, hematíes del grupo O a manera de evidenciar que no debe existir aglutinación bajo ninguna circunstancia al testar estas células, ya que los hematíes O al no tener los antígenos A y B, no deben ser aglutinados al ser confrontados con el suero que se está estudiando.

En caso de que existiera aglutinación con los hematíes O, debería sospecharse que ese suero podría tener anticuerpos “no regulares”, situación que daría lugar a que se realice con especial cuidado la técnica para la detección e investigación de anticuerpos irregulares.

A continuación se detalla el procedimiento para la preparación de los hematíes A, B y O en suspensión al 5%:

1.- Se debe disponer de tres frascos goteros de vidrio, los cuales pueden ser frascos de reactivos hemoclasificadores vacíos, correctamente lavados y esterilizados los cuales deben ser etiquetados como A, B y O y además llevar registrada la fecha de preparación de las células.

2.- Se debe contar con al menos 1 ml de sangre o paquete globular de cada grupo sanguíneo A, B y O, que indistintamente pueden ser Rh D Positivo o Negativo.

Deberá vaciarse el contenido de fragmentos de las tubuladuras (llamados también “pilotos”) de las bolsas de sangre que se tienen almacenadas, a tres tubos de ensayo rotulados como A, B y O.

Se debe colectar la cantidad necesaria de tubuladuras para alcanzar el volumen requerido no teniendo importancia que provengan los fragmentos de tubuladura o “pilotos”, de diferentes bolsas de sangre.

3.- Realizar tres ciclos de lavado a cada uno de los tubos de ensayo, centrifugando a 2,500 r.p.m. durante 1 minuto cada ciclo.

Los lavados deberán ser realizados con solución salina fisiológica estéril SSFE , utilizando pipetas plásticas Pasteur descartables para decantar la SSFE, una para cada grupo sanguíneo.

4.- Posterior al último ciclo de lavado habiendo decantado toda la solución salina, para preparar un volumen de 5 ml de suspensión celular al 5%, proceder a dispensar en cada frasco gotero según corresponda 250 uL de las células lavadas: las del tubo A al frasco gotero A, repitiendo el mismo proceder para las células B y O.

5.- Dispensar 4750ul de SSFE o SSFE tamponada a 7,2 +/- 0,2 con PBS a cada frasco gotero. Tapar los frascos con sus goteros (bien identificados) y homogeneizar suavemente por inversión durante 10 veces.

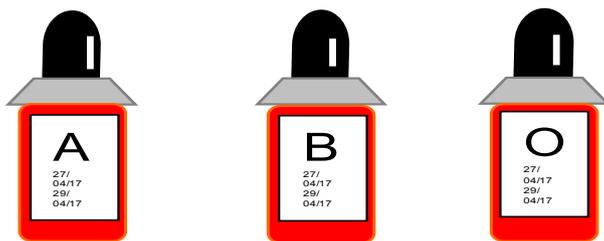
6.- Utilizar las células preparadas durante el desarrollo de las Pruebas Inversas, conservándolas a una temperatura de 4 +/- 2 °C cuando no estén siendo utilizadas.

Es importante mencionar que la validez de estas células es de 48 a 72 horas y que su uso no debe ser prolongado por mayor tiempo, incluso; si se evidencian signos de hemólisis antes del tiempo referido, deberán ser descartadas y corresponderá preparar nuevas células.

7.- Estas células podrán ser utilizadas también para los controles de calidad diarios de los reactivos hemoclasificadores.

8.- A continuación se observa gráficamente como deberían estar rotulados los frascos goteros.

**Gráfico N° 15** Rotulación y envasado correcto de frascos goteros de las células de fenotipo conocido A, B, y O para la realización de la Técnica Inversa para verificación del grupo sanguíneo (Sistema ABO).



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

## APÉNDICE 2

### PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MODIFICADA DE ALSEVER PARA CONSERVACION DE HEMATÍES

Las suspensiones celulares, son utilizadas como reactantes en diferentes técnicas inmunohematológicas. Tal es el caso de la prueba inversa, la detección e identificación de anticuerpos irregulares, controles internos y externos de calidad y en la preparación de Células Control de Coombs (CCC).

Las soluciones que conservan los hematíes deben mantener intacto el fenotipo eritrocitario y reducir los riesgos de desarrollo microbiano durante largo tiempo, posibilitando su uso para pruebas diagnósticas in vitro.

La solución de Alsever es una solución isotónica que se usa de manera rutinaria como anticoagulante y a la vez preservante de suspensiones de hematíes, que permite la conservación de los mismos por al menos 8 a 10 semanas, durante las cuales se mantiene la integridad de la membrana celular hemática sin que se altere la integridad de los antígenos de grupo sanguíneo, siempre y cuando se conserven a una temperatura de  $4 \pm 2$  °C, bajo protección de la luz.

Debido al tiempo en que los hematíes se mantienen estables, la Solución de Alsever es ideal para conservar paneles celulares, Células Control de Coombs, Células de Grupos Sanguíneos Negativos utilizados para los controles internos diarios e incluso para las Células A y B en los Servicios de Transfusión en los que no se cuenta con estos grupos sanguíneos frecuentemente.

Para preparar la solución de Alsever Modificada en el Hospital de Pediatría Garrahan de Argentina y utilizando la técnica estandarizada por la Dra. Norma H. Serna, deben seguirse los siguientes pasos:

#### 1.- Pesar los componentes sólidos:

- ✓ Citrato de sodio .....8 gramos
- ✓ Sulfato de Neomicina ..... 0,113 gramos
- ✓ Cloranfenicol .....330 miligramos

#### 2.- Medir los siguientes volúmenes:

- ✓ Dextrosa al 10% ..... 205 ml
- ✓ Solución Salina fisiológica estéril ..... 500 ml
- ✓ Agua destilada estéril c.s.p. .... 1000 ml

#### 3.- Mezclar los volúmenes en un matraz de 1 litro y disolver los solutos.

Una vez disueltos, completar la cantidad suficiente para 1000 ml con agua destilada estéril.

4.- Trasvasar la solución preparada a un frasco de vidrio de color ámbar que se haya esterilizado previamente, cerrar herméticamente y etiquetar anotando la fecha de preparación y la fecha de vencimiento.

5.- La Solución Alsever tendrá una fecha de vigencia de 3 meses a partir de su preparación y deberá conservarse en frasco ámbar a una temperatura de  $4 \pm 2$  °C. Cada vez que sea utilizada, deberá verificarse que no se presente contaminación, vale decir coloración oscura, presencia de precipitados, turbidez, etc.

## APÉNDICE 3

### PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA TAMPONADA A pH 7,2 CON BUFFER FOSFATOS PBS

La solución fisiológica es una disolución acuosa de sustancias compatibles con los organismos vivos debido a sus características definidas de osmoticidad, pH y fuerza iónica cuyo pH suele ser ácido 5,5- 6,0.

Se utiliza para realizar suspensiones celulares y lavado de células, sin embargo existe mayor estabilidad en cuanto a la unión antígeno anticuerpo cuando el pH tiende a ser neutro, por ello se podría también utilizar la misma solución salina al 0,9% llevando su pH a prácticamente la neutralidad utilizando una solución de Buffer Fosfatos Salino (PBS) para conseguir el pH requerido.

La solución de PBS se adquiere de manera comercial ya sea líquida o en tabletas de tampón listas para ser diluidas.

La SSF, cuyo pH debe ser de 7.2 +/- 0,2; es uno de los buffers más utilizados al ser isotónico y no tóxico para las células y básicamente porque a este pH se desarrollan de mejor manera la mayoría de las reacciones antígeno-anticuerpo; recordemos siempre que el grado de ionización de las moléculas depende del pH del medio.

La solución salina fisiológica tamponada a pH 7,2 se utiliza para realizar las suspensiones celulares así como también lavar los hematíes mediante procedimientos de centrifugación.

El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal.

Para preparar esta solución se tienen dos alternativas:

#### OPCIÓN 1

De acuerdo a la disponibilidad para conseguir los compuestos químicos p.a., se necesitarían pesar:

- ✓ 8,06 g de ClNa
- ✓ 0,22 g de ClK
- ✓ 1,15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ✓ 0.20 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ✓ 1000 ml de agua destilada

Las sales pesadas deben ser depositadas en un matraz adecuado para el volumen que se desea preparar.

Dispensar en primera instancia 200 ml del volumen de agua destilada y proceder a homogeneizar hasta que se disuelvan las sales, posteriormente adicionar los mililitros faltantes para completar el volumen final de la preparación que corresponde a 1000 ml.

Luego se debe ajustar el pH de la solución preparada a 7.2 utilizando un pH-metro (equipo que mide el pH de las soluciones y que antes de cada medición debe calibrarse con soluciones de pH conocidas provistas comercialmente que corresponden a pH 4, 7 y 10). Si se requiere disminuir el pH

utilizar una solución de HCl, si por el contrario se necesita incrementar el pH, utilizar una solución de NaOH.

## **OPCIÓN 2**

Se ha estandarizado en nuestro país una técnica muy práctica para la preparación de la solución salina fisiológica tamponada a pH 7,2 +/- 0,2 con Buffer Fosfatos PBS que se adquiere en solución líquida de manera comercial.

Debe añadirse un volumen de 1 ml de solución PBS lista para ser utilizada, a un volumen de 999 ml de Solución Salina Fisiológica estéril, con esto el pH se ajusta automáticamente a 7,2 +/- 0,2.

Los Servicios de Sangre que no pudieran preparar esta solución tamponada, podrán seguir utilizando la Solución Salina Fisiológica Estéril SSFE, al 0,9% controlando diariamente mediante inspección visual que no exista turbidez ni presencia de partículas, y si se cuenta con pH-metro verificar que el pH no sea menor de 6,0 ni mayor a 8,0. Si se realizan las mediciones con papel indicador de pH el color debe mantenerse en el color naranja no tendiendo a virar ni a rojo (más ácido) ni a verde (más básico).

## APÉNDICE 4

### PREPARACIÓN DE CÉLULAS CONTROL DE COOMBS (CCC)

Es importante conocer que los hematíes reactivos llamados Células Control de Coombs, se emplean en Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión como control analítico ante un resultado negativo de la prueba de antiglobulina humana. Su uso no es universal en nuestro medio debido, fundamentalmente, a la disponibilidad insuficiente de células comerciales, a la corta durabilidad de las células preparadas por el propio laboratorio, así como también a la falta de conocimiento de la importancia de su uso para la confirmación de resultados negativos cuando se realiza el test de Coombs.

Las células para el control de Coombs (CCC) son células rojas humanas del grupo O Rh positivo recubiertas con anticuerpos de la clase IgG anti D. Se añaden a cualquier resultado de prueba antiglobulina humana negativa, se centrifuga y luego se comprueba la aglutinación. El resultado debe ser positivo después de la adición de las células control de Coombs.

Estas células «verificadoras» permiten asegurarse de que el procedimiento se ha realizado correctamente. Si las células control de Coombs no convierten la reacción positiva, la prueba no es válida. Dentro de las posibles causas de este resultado podría citarse el no haber añadido el suero AHG a los tubos (situación que es muy difícil de que ocurra cuando se utiliza el reactivo verde), el lavado inadecuado de las células o el deterioro del reactivo de AHG, entre otras.

Para preparar las CCC se deben seguir los siguientes pasos:

1. Dispensar 6 ml de solución salina fisiológica estéril SSFE en un tubo de ensayo nuevo de 13 x 100 mm, marcar el nivel utilizando un marcador indeleble, ya que hasta esta marca deberá llenarse la solución salina fisiológica para realizar los lavados correspondientes.
2. Agregar una gota de reactivo hemoclasificador anti D con el gotero en posición vertical para que la gota caiga sin tocar las paredes del tubo.
3. Cubrir el tubo de ensayo con papel parafinado (PARAFILM), y mezclar por inversión durante 20 veces cuidadosamente sin ocasionar derrames.
4. En un tubo de ensayo nuevo de 12 x 75 mm, lavar 1 ml de células O Rh D POSITIVO, mediante tres ciclos de centrifugación de 1 minuto a 2,500 r.p.m., teniendo cuidado después del último lavado de haber decantado completamente la solución salina. (No se debe tocar la parte superior de los tubos con los guantes especialmente si estos contienen talco, para ello; tomar los tubos de ensayo por la parte media de los mismos).
5. Agregar un volumen de 1ml de los glóbulos rojos lavados al tubo que contiene la solución salina y la gota de anti D y luego de homogeneizar suavemente cubriendo la parte posterior del tubo de ensayo con papel parafinado y proceder con el paso 6.
6. Incubar a 37 °C durante 30 minutos en Baño María, teniendo cuidado de que el nivel del agua del equipo no sobrepase el nivel de la suspensión en el tubo.
7. Concluido el tiempo de incubación, lavar 4 veces con solución salina fisiológica estéril con ciclos

de centrifugación de 1 minuto a 2,500 r.p.m., teniendo cuidado después del último lavado de haber decantado completamente la solución salina.

8. Preparar una solución final del 2 al 5% en solución salina fisiológica, el volumen suficiente para trabajar cómodamente durante 2 a 3 días (por ejemplo 5 ml) ,que es el periodo de tiempo que las células tendrán vigencia, ya que pasado este tiempo se iniciará el proceso normal de hemólisis que indicará que se deben preparar nuevas células.
9. Para realizar un control de calidad NEGATIVO de las células, dispensar en un tubo de ensayo una gota de las Células Control de Coombs (CCC) y una gota de SSFE, centrifugar un minuto a 1000 r.p.m., con ayuda de la fuente de luz del rhesuscopio leer y observar la reacción, NO DEBE EXISTIR AGLUTINACIÓN.
10. Para realizar un control de calidad POSITIVO de las células, dispensar en un tubo de ensayo una gota de las Células Control de Coombs (CCC) y una gota del reactivo de Coombs, centrifugar un minuto a 1000 r.p.m., con ayuda de la fuente de luz del rhesuscopio y observar la reacción: DEBE EXISTIR AGLUTINACIÓN DE 2 A 3 CRUCES.
11. El haber cumplido los parámetros de los pasos 9 y 10; denota que las células rojas preparadas quedaron débilmente sensibilizadas con Ig G, objetivo que se estaba buscando, además de no presentar auto aglutinación, indicando ser funcionalmente adecuadas para su uso in vitro como control de la prueba de Coombs.

## APÉNDICE 5

### PREPARACIÓN DE PANELES CELULARES ARTESANALES “MADE IN HOUSE” O “HECHOS EN CASA”

El personal del área de Inmunohematología de cada Banco de Sangre se encuentra en la posibilidad de preparar paneles de detección de anticuerpos irregulares con células de fenotipo conocido. Lo importante es considerar haber incluido hematíes portadores de antígenos contra los cuales se producen anticuerpos que se presentan con mayor frecuencia circulando en la población de nuestro país.

De acuerdo a los estudios realizados, dichos anticuerpos son los siguientes: Anti Lewis<sup>a</sup>, Anti E , , Anti D , Anti Kell (K) , Anti C, Anti c , Anti P1 , Anti M, Anti Duffy a (Fy<sup>a</sup>) , Anti Duffy b (Fy<sup>b</sup>) , Anti Kp<sup>a</sup>, Anti Jk<sup>a</sup> , Anti Js<sup>a</sup> y Anti Kidd b (Jk<sup>b</sup>).<sup>(14), (15), (16)</sup>

Para poder incluir hematíes con estos antígenos; se debe contar con los antisueros correspondientes para su detección.

Al momento, se cuenta al menos con Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e y Kell, será importante considerar la adquisición de los antisueros que permitan detectar los antígenos que corresponden a los demás anticuerpos descritos.

En un futuro mediato se deberán preparar paneles con un mayor número de antígenos. Lo ideal será considerar preparar los paneles de detección, dividiéndolos en Panel 1 y Panel 2, cada uno de ellos incluyendo hematíes que porten los siguientes antígenos:

#### PANEL COMPLETO PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

Sistemas de Grupos Sanguíneos																									
	Rh				MN		Lutheran		P	Lewis		Kell				Duffy		Kidd							
Panel	D	C	C <sup>w</sup>	E	c	e	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>
1	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+
2	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0

Fuente: Luna-González Jacobo, Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2005; 43 (Supl 1): 17-20<sup>(17)</sup>

Por el momento, lo que que es factible de realizar, es coleccionar fragmentos de tubuladuras de 10 donadores diferentes de grupo sanguíneo O, ocho de factor O Rh D positivo y dos de factor O Rh D negativo; de los cuales tenemos la certeza que cuentan con los siguientes antígenos:

## PANEL MODIFICADO PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

Sistemas de Grupos Sanguíneos			
	Rh		Kell
Panel	D	C E c e	K
1	+	+ 0 0 +	+
2	+	0 + + 0	0

Fuente: Programa Nacional de Sangre

Los hematíes ya fenotipados deberán ser correctamente lavados y preparados en suspensión al 5% en SSFE, SSFE tamponada con PBS a pH 7,2 +/- 0,2 o en Solución de Alsever (cuyas preparaciones se encuentran descritas en los Anexos II y III).

La Solución de Alsever es la que permite conservar los paneles por periodos de tiempo más prolongados que van entre 8 a 10 semanas siempre que se mantengan a 4 +/- 2°C cuando no se estén utilizando.

Al momento que se evidencie la presencia de hemólisis, o se sospeche de contaminación bacteriana/fúngica por cambio de coloración, olor desagradable del panel, etc., los paneles deberán ser descartados y se deberán preparar nuevos paneles.

La manera más básica de preparar un panel de detección de anticuerpos irregulares en los Servicios de Transfusión consistirá en coleccionar idealmente 8 fragmentos de tubuladuras de sangre del grupo O Rh D positivo y 2 fragmentos de tubuladuras de sangre del grupo O Rh D negativo. En caso de no contar con grupo O Rh D negativo, y/o no contar con 10 unidades, considerar todos los grupos O Rh D positivos que al momento se disponga en el Servicio de Transfusión.

Se deberá realizar un “pool” juntando las muestras de sangre provenientes de las tubuladuras y concentrarlas en un tubo de ensayo nuevo o re utilizado (correctamente lavado y esterilizado).

Proceder a realizar tres ciclos de lavado de 1 minuto a 2,500 r.p.m. con solución salina fisiológica estéril y finalmente a partir de los hematíes lavados preparar una suspensión al 5% en SSFE, SSFE tamponada a pH 7,2 o idealmente en Solución de Alsever y conservarlos en frascos goteros limpios y esterilizados, correctamente rotulados indicando la fecha de preparación y fecha de expiración.

El tiempo de vigencia del panel será de 72 horas (3 días) en caso de utilizar SSFE o SSFE tamponada a pH 7,2 y en caso de utilizar Solución Alsever, según refiere la bibliografía, el tiempo de sobre vida de las células podría llegar a las 10 semanas.

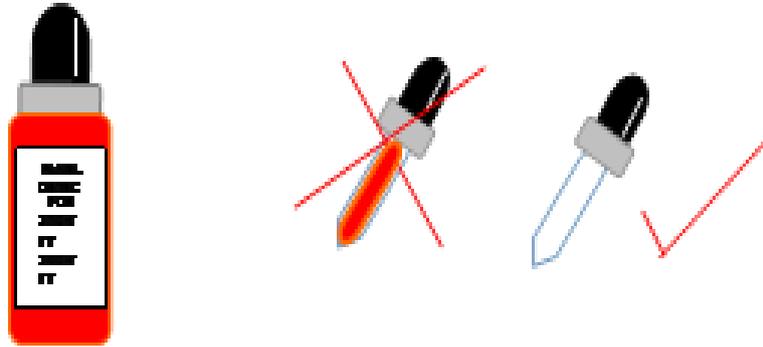
Si antes de este tiempo se evidencian signos de hemólisis en el sobrenadante o se sospecha de contaminación, se deberá preparar un panel nuevo.

Se sugiere tener especial cuidado de no dejar los paneles sobre los mesones del laboratorio a temperatura ambiente, sino, sacarlos del refrigerador únicamente minutos antes de ser utilizados y posteriormente colocarlos nuevamente a 4 +/- 2 °C en refrigeración hasta que su uso sea necesario.

Los frascos goteros siempre deberán taparse correctamente y evitar tocar con la punta de los dispensadores de los goteros cualquier superficie, además de ello no dejar al interior de los mismos

ningún volumen de células para evitar contaminaciones, es decir, vaciar todo el contenido dentro del frasco gotero y recién proceder a tapar el frasco.

**Gráfico N° 16** Explicación gráfica de cómo deben conservarse vaciados los tubos de los goteros antes de cerrar las tapas de los frascos.



Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

## APÉNDICE 6

### CARACTERÍSTICAS DE ANTICUERPOS IRREGULARES DE SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Clínicamente significativos	Significativos si reaccionan a 37°C	Significativos algunas veces	Clínicamente benignos
ABO	Le <sup>a</sup>	Yt <sup>a</sup>	Chido/Rodgers
Rh	M, N	G	JMH
Kell	P1	Gy <sup>a</sup>	Knops
Duffy	Lutheran	Hy	Bg
Kidd	A1	At <sup>a</sup>	Xg
SsU	Sd <sup>a</sup>	Colton	Cs <sup>a</sup>
Vel	AnWj	Cromer	Yk <sup>a</sup>
PP1Pk		Dombrock	McC <sup>a</sup>
H (Oh)		Indian	
		Lan	
		LW	
		Scianna	

**Fuente:** Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud con datos obtenidos de Technical Manual American Association of Blood Banks . Walker Arlington. 2012. 17<sup>th</sup> edition.<sup>(4)</sup>

## APÉNDICE 7

### EJEMPLO 1 DE INTERPRETACIÓN DE RESULTADO DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

CÉLULAS DE PANEL	Rh			MNS					KELL		P	LEWIS		DUFFY		KIDD		RESULTADO				
	D	C	E	c	e	M	N	S	s	K	k	F1	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	TA	37°C	AG	CCC
1 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+
2 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
3 R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	
4 r' r	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	+
5 r' r	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	
6 r r	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	0	0	+
7 r r	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+
8 R <sub>0</sub> r	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
9 r r	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+
10 r r	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+
11 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	
AUTO CONTROL																			NEGATIVO			

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud.

#### INTERPRETACIÓN

Como puede observarse en el ejemplo precedente aunque el patrón de reacción en los 11 tubos de aglutinación no coincide absolutamente en todos ellos, tal es el caso del tubo 11 donde la reacción debería ser negativa y es positiva, ya se cumple que al menos dos de las células positivas son positivas y dos de las células negativas son negativas, **por tanto la especificidad asignada a este anticuerpo es Anti-E.**

Para ayudarnos con la lectura se pueden ir tachando los anticuerpos que no se asemejan para nada al patrón y siempre se debe verificar que el auto control tenga resultado negativo, además de ello verificar la validez de las reacciones negativas cuando al agregar las Células Control de Coombs los resultados se tornan positivos.

## APÉNDICE 8

### EJEMPLO 2 DE INTERPRETACIÓN DE RESULTADO DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

CÉLULAS DE PANEL	Rh				MNS					KELL		P	LEWIS		DUFFY		KIDD		RESULTADO				
	D	C	E	c	e	M	N	S	s	K	k	P1	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	TA	37°C	AG	CCC	
1 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+
2 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	
3 R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+		
4 r' r	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	+	
5 r' r	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0		
6 r r	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	
7 r r	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	
8 R <sub>0</sub> r	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
9 r r	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+		
10 r r	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	
11 R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0		
AUTO CONTROL																			NEGATIVO				

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud.

### INTERPRETACIÓN

Como puede observarse en el ejemplo precedente aunque el patrón de reacción en los 11 tubos de aglutinación no coincide absolutamente en todos ellos, tal es el caso del tubo 6 donde la reacción debería ser negativa y es positiva, ya se cumple que al menos dos de las células positivas son positivas y dos de las células negativas son negativas, **por tanto la especificidad asignada a este anticuerpo es Anti-Le<sup>a</sup>.**

Para ayudarnos con la lectura se pueden ir tachando los anticuerpos que no se asemejan para nada al patrón y siempre se debe verificar que el auto control tenga resultado negativo, además de ello verificar la validez de las reacciones negativas cuando al agregar las Células Control de Coombs los resultados se tornan positivos.

## APÉNDICE 9

### PRUEBA D<sup>u</sup>- D VARIANTE PARA CASOS EN LOS QUE SE TIENE UN RESULTADO Rh D NEGATIVO

El D<sup>u</sup>, es una variante del antígeno D, que no se pone de manifiesto en la determinación que normalmente se realiza para determinar el antígeno D cuando se utiliza el reactivo hemoclasificador Anti-D. Para poder evidenciar el antígeno D<sup>u</sup>, es necesario adicionar el reactivo de Coombs previa incubación de los hematíes a 37 °C.

En una primera fase de la técnica se producirá la unión de los anticuerpos anti-D a sus receptores en la membrana de los hematíes y en la segunda fase tiene lugar la aglutinación únicamente en presencia de antiglobulina humana (Reactivo de Coombs).

Para realizar esta técnica debe seguirse la siguiente secuencia de pasos:

1. Etiquetar dos tubos de ensayo con la identificación del “número de muestra” o “iniciales del paciente” y el segundo tubo con la denominación “control”.
2. Preparar una suspensión de los hematíes en cuestión al 5% en solución salina fisiológica estéril SSFE o en SSFE tamponada a 7,2 +/- 0,2 en Buffer Fosfatos.
3. Dispensar a cada tubo 1 gota (50 uL) de eritrocitos a investigar.
4. Al tubo (s) de “muestra” o “paciente” dispensar una gota del Reactivo Anti-D y al tubo “control” una gota del reactivo Rhesus Control. En caso de no disponer del reactivo Rhesus Control, dispensar una gota de Albúmina Sérica Bovina al 22%.
5. Mezclar suavemente el contenido de los tubos y centrifugar, leer los resultados con ayuda de la fuente de luz del rhesuscopio.
6. Incubar 30 minutos a 37°C en Baño María o en Estufa de Incubación en calor seco, teniendo el cuidado de cubrir los tubos con papel parafinado (PARAFILM), para evitar una posible evaporación .

Los 30 minutos de incubación referidos, son un parámetro, lo importante es seguir estrictamente las instrucciones del fabricante del reactivo establecidas en el inserto correspondiente.

7. Cumplido el tiempo de incubación proceder a centrifugar un minuto a 1000 r.p.m., leer los resultados con ayuda de la fuente de luz del rhesuscopio y registrar el resultado. En esta etapa de la prueba, en caso de estar presente el antígeno D<sup>u</sup>, ya deberían observarse aglutinados muy pequeños, en algunos casos difíciles de observarlos macroscópicamente, por ello, se sigue con el siguiente paso para magnificar la reacción.
8. Efectuar tres ciclos de lavado con solución salina fisiológica estéril SSFE, centrifugando durante 1 minuto a 2,500 r.p.m.

Decantar la solución de lavado completamente después del último ciclo, teniendo cuidado de no contaminar las reacciones con el talco de los guantes, para ello, sujetar los tubos de la parte media de los mismos y no de la parte superior.

9. Agregar a cada tubo, 2 gotas del suero Anti-globulina humana (suero de Coombs), mezclar suavemente y centrifugar un minuto a 1000 r.p.m.
10. Leer los resultados con ayuda de la fuente de luz del rhesuscopio, desprendiendo con suavidad el botón de glóbulos formado en el fondo de cada tubo.
11. Aún cuando existiera una aglutinación de 1 +, el resultado se interpreta: POSITIVO denotando la presencia del antígeno D<sup>u</sup> o un D variante.

En el reporte de resultados tener el cuidado correspondiente de informar que para efectos de donación de sangre la persona debe ser considerada como Rh D POSITIVO y para efectos de recibir sangre en caso de una transfusión sanguínea, debe ser considerada como Rh D NEGATIVO.

Con esta recomendación se estaría previniendo sensibilizar a receptores que son Rh D NEGATIVOS, así como también en caso de que ésta persona requiriese una transfusión sanguínea se previene que se le administre una unidad Rh D POSITIVO y ocurra una sensibilización, ya que debe recordarse que los Rh D<sup>u</sup> o los D parciales, no son Rh D positivo, por tanto deben recibir únicamente sangre Rh D NEGATIVA.

## APÉNDICE 10

### 10.1 ANTICUERPOS QUE HABITUALMENTE PRODUCEN ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO (EHRN)

Anticuerpos	Comentarios
Sistema Rh:Rh(D), c	EHRN grave y frecuente
C, E, e, G Ce(f), Ce, C <sup>w</sup> , E <sup>w</sup> , Hro, Hr, Rh29, Goa, Rh32, Be <sup>a</sup> , Evans, Tar, Sec, JAL, MAR-like	EHRN ocasional
Sistema Kell: K, k, Kpa, Kp <sup>b</sup> , Js <sup>a</sup> , Js <sup>b</sup> , Ul <sup>a</sup> , Ku, K11,K19, K22	EHRN severa
Sistema ABO: (Anti A, Anti-B)	EHRN puede variar desde leve a severa
Sistema MNS: a) S,s,U, b)M,En <sup>a</sup> , Mi <sup>a</sup> , Vw, Mur, Hut, Hil, Mt <sup>a</sup> c) Mv, Far, sD, Or, MUT, Mur	EHRN grave  EHRN excepcionalmente grave  EHRN ocasionalmente grave
Sistema Duffy: Fy <sup>a</sup> ,Fy <sup>b</sup>	EHRN leve, menor número de casos reportados por anti-Fyb
Sistema Kidd: Jk <sup>a</sup> , Jk <sup>b</sup>	En caso de acontecer EHRN, no suele ser grave
Sistema Colton:Co <sup>a</sup> , Co <sup>b</sup>	EHRN grave
Sistema Diego:Di <sup>a</sup> , Di <sup>b</sup> , Wr <sup>a</sup> , ELO, BOW	EHRN grave pero no se reportaron un gran número de casos
Sistema Gerbich: Ge3	Se han reportado 2 casos graves de EHRN

**Fuente:** Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud con datos obtenidos de: Fung Mark et als. Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre. 18ava edición. 2014. pp. 337-363 y Dean Laura. Blood Groups and Red Cell Antigens. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US).2005. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/>

## 10.2 ANTICUERPOS QUE RARAMENTE PRODUCEN ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO (EHRN)

Anticuerpos	Comentarios
Anti-PP1Pk (fenotipo p)	Se asocian a abortos recurrentes 1er trimestre.
Lu <sup>a</sup> , Lu <sup>b</sup>	ANTÍGENOS poco desarrollados en el feto. ANTICUERPOS adsorbidos por la placenta.
Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup>	No activos a 37°C.  No se expresan en el feto.
Acs de los sistemas: Yt, Do, LW,Ch/Rg, Cr, Kn, In	No se han descrito casos de EHRN grave.
Vel, Lan, At <sup>a</sup> , Jr <sup>a</sup>	Sólo formas leves.

Fuente: Programa Nacional de Sangre / Ministerio de Salud con datos obtenidos de: Fung Mark et als. Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre. 18ava edición. 2014. pp. 337-363 y Dean Laura. Blood Groups and Red Cell Antigens. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US).2005. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/>

# APÉNDICE 11

## PLANILLA DE REPORTE DE CONTROL DE CALIDAD DIARIO DE REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES, REACTIVO DE COOMBS Y CÉLULAS A,B,O

SERVICIO DE SANGRE: SERVICIO DE TRANSFUSIÓN HOSPITAL PEDRO GASCA\*

FECHA: 26 DE MAYO DE 2017

LÍNEA COMERCIAL DE REACTIVOS DE GRUPO SANGUÍNEO: ANTI-A, ANTI-B, ANTI-AB, ANTI-D, RHESUS CONTROL\*QUINTIN CORP\*\*

LÍNEA COMERCIAL DEL REACTIVO DE COOMBS: ANTI INMUNO GLOBULINA HUMANA ANTI IgG \*GLOBULEN\*\*\*\*

NOMBRES Y APELLIDOS DEL PERSONAL QUE REALIZÓ EL CONTROL DE CALIDAD DIARIO: Dr. CARLOS LENZ OBLITAS\*\*\*\*

### CONTROL DE CALIDAD DIARIO DE REACTIVOS DE GRUPO SANGUÍNEO Y REACTIVO DE COOMBS CON CÉLULAS DE FENOTIPO CONOCIDO A, B, O

TIPO DE CÉLULAS	ANTI-A	ANTI-B	ANTI-AB	ANTI-D	Rh CONTROL	REACTIVO COOMBS
CÉLULAS A	POS	NEG	POS			
CÉLULAS B	NEG	POS	POS			
CÉLULAS AB	POS	POS	POS			
CÉLULAS O	NEG	NEG	NEG			
CÉLULAS D POSITIVO				POS	NEG	
CÉLULAS D NEGATIVO				NEG	NEG	
CÉLULAS SENSIBILIZADAS CCC						POS
CÉLULAS NO SENSIBILIZADAS						NEG

### CONTROL DE CALIDAD DIARIO DE CÉLULAS A,B,O CON SUEROS CONOCIDOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS A, B Y O

TIPO DE CÉLULAS	SUERO SANGUÍNEO A GRUPO	SUERO SANGUÍNEO B GRUPO	SUERO SANGUÍNEO O GRUPO
CÉLULAS A	NEG	POS	POS
CÉLULAS B	POS	NEG	POS
CÉLULAS O	NEG	NEG	NEG

(\*), (\*\*), (\*\*\*), (\*\*\*\*): NOMBRES FICTICIOS

Fuente: Programa Nacional de Sangre / Ministerio de Salud

## APÉNDICE 12

### TÉCNICA DE LAVADO Y DESINFECCIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO CONTROL DE CALIDAD DEL PROCEDIMIENTO DE LAVADO DEL MATERIAL \*

\*Técnica diseñada y estandarizada por: Aro S. y Herrera M. L.  
Banco de Sangre de Referencia Departamental de Cochabamba <sup>(26)</sup>

Para llevar a cabo esta técnica, se deberá contar con estos materiales:

- a) Solución de Hipoclorito de Sodio al 0,5% y al 1%
- b) Detergente líquido biodegradable (Lava Vajillas)
- c) Alcohol al 70%
- d) Agua Destilada
- e) Colorante Rojo de Metilo en polvo
- f) Etanol 96 ° GL (Gay-Lussac)

El procedimiento consiste en seguir los siguientes pasos:

- a) Los coágulos de sangre contenidos en los tubos de ensayo deben ser transferidos a un recipiente de plástico, luego añadir solución de hipoclorito al 1%, dejar inactivar por 1 hora, escurrir el desinfectante y descartar los coágulos en doble bolsa de plástico bien anudada (desechos patógenos).
- b) El material exento de coágulos debe sumergirse en un recipiente con Hipoclorito al 1% para remover los restos de materia orgánica, luego pasar a otro recipiente con Hipoclorito al 0,5% y dejar en reposo por 30 minutos, enjuagar varias veces con agua corriente.
- c) Preparar en un bañador una solución de agua y detergente líquido biodegradable (Lava Vajillas), la relación debe ser de 150 ml de detergente para 10 litros de agua, de acuerdo a la misma, se pueden preparar volúmenes mayores o menores de acuerdo a los requerimientos de cada Servicio de Sangre.
- d) Utilizando la solución con detergente, cepillar los tubos de ensayo u otro material de vidrio (probetas, matraces, vasos de precipitados, etc.) con el objetivo de eliminar restos de material orgánico, en el caso de tubos de ensayo removiendo las etiquetas auto adhesivas y restos de marcador, utilizando la parte áspera de una esponja si fuese necesario.
- e) Enjuagar el material en agua corriente 10 o más veces hasta verificar que no existan restos de espuma del detergente y depositar en otro bañador que contenga agua destilada durante 5 minutos para luego proceder con el siguiente paso.
- f) Dejar en remojo el material en un recipiente que contenga alcohol etílico al 70% para eliminar restos de grasa del material por un periodo de tiempo de 10 minutos.

- g) Acomodar el material sobre un paño absorbente y dejar escurrir el alcohol. Una vez escurrido el alcohol, acomodar todo el material con la parte abierta de tubos de ensayo, matraces, vasos de precipitados, probetas, etc., hacia abajo en las rejillas de la estufa de esterilización o pupinel recubiertas con papel madera, papel secante u otro que resista altas temperaturas. Dejar que se alcancen 160 °C y empezar a controlar 2 horas para que se cumpla el proceso de esterilización.
- h) Esperar que se cumplan las dos horas y dejar enfriar el material esterilizado dentro del equipo para luego sacarlo y proceder a verificar la calidad del lavado del material.
- i) El control de calidad del lavado de material de vidrio permite verificar que no hayan quedado restos de sustancias lipídicas adheridas al vidrio y se realiza mediante el empleo de agua destilada.

Se escogen al azar 10 tubos de ensayo de cada lote lavado y se debe dispensar a cada tubo un volumen de agua destilada y luego vaciarlo.

Si al escurrir el agua se ve que no fluye de manera uniforme, si se observan gotas de agua en la superficie del tubo, es indicativo de que aún existe materia grasa, por tanto el lavado no fue realizado de manera adecuada; caso contrario habiendo pasado satisfactoriamente el control de calidad, el material puede ser utilizado.

- j) El control de calidad del lavado de material de vidrio para verificar que no hayan quedado restos de detergente adheridos al vidrio, se realiza mediante el empleo de una solución alcohólica de rojo de metilo.
- k) Pesar 0,1 g de rojo de metilo y diluir en 100 ml de etanol de 96 °GL, envasar en un frasco color ámbar y anotar fecha de preparación y fecha de expiración (tiempo de duración 1 año).
- l) Seleccionar 10 tubos de ensayo al azar y depositar 200 uL de la solución indicadora a cada tubo, dejar actuar por tres minutos y observar si existe cambio de color rojo a cualquier tonalidad de amarillo indicativo de alcalinidad y por tanto sugerente de que trazas de detergente residual aun existen en el material lavado.
- m) El mismo procedimiento puede realizarse para verificar el lavado de las puntas de las micropipetas, seleccionando al azar 10 puntas del lote lavado y absorbiendo 50 uL de la solución indicadora de rojo de metilo, dejando actuar por 3 minutos y observando si existe viraje de color.
- n) Tanto en el caso del control de calidad con agua destilada o con rojo de metilo si el control de calidad no fuese satisfactorio todo el lote deberá lavarse nuevamente, caso contrario el material controlado de manera satisfactoria, será autorizado para su uso.

## APÉNDICE 13

### EJEMPLO DE PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE HEMATÍES AL 5%

A continuación, se describe con detalle un ejemplo para preparar una suspensión de hematíes al 5%: un volumen de 500 microlitros que es la cantidad suficiente para realizar la determinación del grupo ABO e incluso Rh, ya que tan solo se utilizan 50 microlitros por reactivo hemoclasificador y son cinco reactivos.

Podría realizarse de dos maneras, primera opción:

Si 500 microlitros constituyen el  $\longrightarrow$  100%

"X"  $\longleftarrow$  5%

$$X = (5 \times 500)/100 \text{ por tanto;}$$

$$X = 2500/100;$$

X = 25 microlitros de hematíes a los que se adicionan 475 microlitros de Solución Salina Tamponada o simplemente Solución Salina Fisiológica Estéril.

Segundo ejemplo siguiendo la fórmula de las concentraciones equivalentes:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2,$$

C = concentración y V = volumen

Preparación de una suspensión de hematíes al 5% un volumen de 500 microlitros. Para ello, consideramos en la fórmula que C1 es siempre 100% y la Concentración 2 y Volumen 2 son aquellos valores a los que queremos llegar, por tanto:

$$V1 = C2 \times V2 / C1$$

$$V1 = (50 \times 500) / 100$$

$$V1 = 250 \text{ microlitros de hematíes}$$

A los que adicionaríamos 250 microlitros de Solución Salina Tamponada o simplemente Solución Salina Fisiológica Estéril.

Mediante la utilización de cualquiera de las metodologías anteriormente descritas, se pueden preparar suspensiones a diferentes concentraciones según indiquen los fabricantes de los reactivos en los insertos correspondientes.

## APÉNDICE 14

### INTERPRETACIÓN DE POSITIVIDAD O NEGATIVIDAD SEGÚN GRADOS DE INTENSIDAD DE LA REACCIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

Tabla N°4

INTENSIDAD DE REACCIÓN	AGLUTINACIÓN EN TUBO CÓMO SE VISUALIZA	REPRESENTACIÓN GRÁFICA
4 CRUCES +	Botón único, fondo claro, sin hematíes en el sobrenadante.	
3 CRUCES +	Varios aglutinados de gran tamaño, fondo claro, sin hematíes en el sobrenadante.	
2 CRUCES +	Muchos aglutinados de tamaño mediano, fondo con muy pocos hematíes en el sobrenadante.	
1 CRUZ +	Numerosos aglutinados pequeños. Fondo turbio por presencia de hematíes libres.	
NEGATIVO	Ausencia de aglutinación y evidencia de un fondo turbio de color rojizo por presencia de hematíes libres.	
HEMÓLISIS POSITIVIDAD	Presencia de coloración rojiza característica de hemólisis	

Fuente: Programa Nacional de Sangre/ Ministerio de Salud

## ANEXO 1

# CLASIFICACIÓN DE LAS DISCREPANCIAS EN LA DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO Y SUGERENCIAS PARA SU RESOLUCIÓN

CLASIFICACIÓN DE LAS DISCREPANCIAS EN LA DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO	SUGERENCIAS PARA SU RESOLUCIÓN
<p><b>GRUPO I.</b></p> <p>Reacciones inesperadas en el grupo inverso debido a reacciones débiles o falta de anticuerpos. Pueden tener lugar o se asocian con:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ <b>Pacientes adultos mayores</b> (se presenta la disminución progresiva de los títulos de las aglutininas anti-A y anti-B)</li> <li>✓ <b>Hipogammaglobulinemia Severa</b>, Anticuerpos anti-A y anti-B también pueden estar presentes en bajas concentraciones en pacientes inmunosuprimidos por terapia o enfermedad y en pacientes sometidos a intercambios intensos de plasma.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Se puede resolver resaltando las reacciones débiles o sin reacción mediante la incubación del suero del paciente con células A1 y B a 4°C por 10 minutos.</li> <li>✓ Si no hay todavía ninguna reacción después de la centrifugación, la mezcla del suero-células se incuba a 37°C durante 15-30 minutos (buscando activar anticuerpos de tipo IgG).</li> </ul>
<p>✓ <b>GRUPO II.</b></p> <p>Estas se asocian con reacciones inesperadas en el tipaje directo debido a reacciones débiles de un antígeno o porque el antígeno, no está presente.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ <b>Subgrupos de A o B:</b> subgrupos del antígeno A (Ax, Am, Ay, Ael) que no aglutinan o aglutinan débilmente por la mayoría de los reactivos Anti-A. Subgrupos del antígeno B (Bx, Bm, Bel) que no son aglutinados o aglutinan débilmente por la mayoría de los reactivos Anti-B.</li> <li>✓ <b>Grupo B Adquirido</b>, casos de grupo sanguíneo A que parecerán B, por acción de la desacetilasa de bacterias que convierten la N- acetilgalactosamina a galactosamina, que es muy similar a la galactosa, el principal determinante de B.</li> <li>✓ <b>Casos de Leucemia en los cuales se pueden debilitar el antígeno A o el B</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Las reacciones débiles con antisueros pueden ser resueltas mejorando la reacción del antígeno con su antisuero respectivo con incubación de la prueba a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.</li> <li>✓ El fenómeno de B adquirido puede resolverse mediante una disminución del pH del antisuero monoclonal.</li> <li>✓ El anticuerpo Anti-B en el suero de la persona B adquirido no aglutina con glóbulos rojos autólogos (<b>autocontrol negativo</b>).</li> </ul>

**GRUPO III.**

Están asociados con anomalías proteicas o de plasma, formación de "rouleaux" y pseudo aglutinación.

- ✓ Elevado nivel de globulinas por ejemplo en pacientes con mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström o Linfoma de Hodgkin.
  - ✓ Elevado nivel de fibrinógeno.
  - ✓ Muestras de pacientes con una concentración anormal de proteínas en suero.
  - ✓ Pequeños coágulos de fibrina en plasma o suero parcialmente coagulado puede ser confundido con aglutinaciones de eritrocitos en el grupo inverso.
  - ✓ Muestras de sueros alterados en el cociente de proteínas, así como también cuando se toman muestras a los pacientes después de que les han sido administrados **expansores de volumen** de alto peso molecular pueden causar agregación de glóbulos rojos y aparentar una aglutinación.
- ✓ Considerar la presencia de la patología al momento de interpretar el grupo sanguíneo.
  - ✓ Se sugiere centrifugar nuevamente el suero/plasma 10 minutos a 3,500 r.p.m., para tratar de que los restos de fibrina precipiten y trabajar con el sobrenadante en el caso de la prueba inversa.
  - ✓ Mientras el efecto de los expansores plasmáticos administrados al paciente sigan causando el fenómeno de pseudo aglutinación es preferible transfundir Paquete Globular O Rh D Negativo, hasta que la discrepancia sea resuelta.

<p><b>GRUPO IV.</b> Debido a causas diversas, tal es el caso de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Transfusión reciente de plasma de grupo diferente que fue transferido como tal o a través de pequeños volúmenes contenido en otros componentes sanguíneos (Ej: Paquetes Globulares, Sangre Total).</li> <li>✓ Aloanticuerpos fríos (Ej. anti M) o auto anticuerpos (Ej. anti I), auto anticuerpos dependientes de pH, anticuerpo dependiente de reactivo (por ejemplo EDTA, Parabenos: conservantes de los reactivos hemoclasificadores) resultando en una reacción positiva inesperada.</li> <li>✓ Aglutinación de campo mixto con glóbulos rojos de más de un grupo ABO.</li> <li>✓ Poliaglutinación resultante de anomalías heredadas o adquiridas de la membrana de los glóbulos rojos con exposición de auto criptoantígeno (Ej. activación T). La determinante T está cubierta normalmente por ácido N-acetil neuramínico y por lo tanto puede ser descrita como cripto antígeno. El antígeno puede ser expuesto por la acción de neuraminidasas bacterianas o virales a Anti-T y anti-Tn presentes en el suero de todos los sujetos excepto bebés. Presumiblemente se forman como una reacción al T y Tn presente en muchas Vacunas y bacterias gram negativas. Muchos organismos, incluyendo los neumococos, estreptococos, estafilococos, Clostridium, E. coli, Vibrio cholerae y el virus de la influenza son capaces de producir este efecto in vitro. La activación T puede ocurrir in vivo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Los auto anticuerpos fríos que causan reacciones falsas positivas en el tipaje directo pueden eliminarse mediante el lavado de eritrocitos con solución salina que ha sido atemperada a 37°C.</li> <li>✓ Auto aglutinación causante de reacciones falsas positivas en la prueba inversa pueden resolverse con la incubación a 37°C durante 30-60 minutos.</li> <li>✓ Los aloanticuerpos inesperados en el suero del paciente aparte de las isoaglutininas causantes de discrepancias ABO se resuelve tan pronto sea identificado el anticuerpo (Ej. anti M), el grupo inverso debe ser repetido con células A1 y B que sean negativas para ese antígeno.</li> <li>✓ Isoaglutininas ABO inesperadas que producen discrepancias de grupo (Ej.anti A1 en A2 o A2B) puede resolverse mediante la repetición del grupo inverso usando al menos 3 células A1, A2, B, O junto con un auto control.</li> <li>✓ Los eritrocitos del paciente pueden ser tipificados con Lectinas anti A1 y anti H de Dolichos biflorus y Ulex europaeus para determinar los subgrupos del antígeno A.</li> <li>✓ Si existiera un anticuerpo dependiente de reactivo (Ej.: anticuerpo anti-acriflavina contra acriflavina utilizado como colorante en el reactivo Anti B) causante de discrepancias de grupo deberá resolverse mediante el lavado de los glóbulos rojos de la persona con solución salina normal por lo menos 3 veces.</li> </ul>
---	--

Fuente: Vijay Kumawat M.D. Neelam Marwaha M.D.FAMS, Ratti Ram Sharma M.D, en "ABO Blood Group Discrepancies causes and resolution", Indian Journal of Tranfusion Medicine 2014.

**Nota.-** El Rouleaux consiste en un fenómeno en el cual agregados de glóbulos rojos se adhieren a lo largo de sus superficies planas, dando una apariencia al microscopio de monedas apiladas.

Este fenómeno se dispersa y desaparece cuando los hematíes son resuspendidos en solución salina.

Una aglutinación verdadera es estable en presencia de solución salina.



## LISTADO DE TABLAS

### **Tabla N° 1**

Actualización de los Sistemas de Grupos Sanguíneos por la ISBT: Sociedad Internacional de la Transfusión Sanguínea en febrero de 2017.

### **Tabla N° 2**

Fenotipos del Sistema ABO: Antígenos y Anticuerpos.

### **Tabla N° 3**

Descripción de los tubos de ensayo utilizados en las Pruebas Directa e Inversa y los elementos que contienen para que se originen las reacciones de Hemaglutinación.

### **Tabla N° 4**

Interpretación de Positividad o Negatividad según grados de intensidad de la reacción de Hemaglutinación.

### **Tabla N° 5**

Interpretación del Grupo Sanguíneo en el Sistema ABO según los resultados de la Prueba Directa y la Prueba Inversa.

### **Tabla N° 6**

Fuentes de errores técnicos en discrepancias de resultados en la Determinación de Grupo Sanguíneo.

### **Tabla N° 7**

Interpretación de resultados del Antígeno D en función a la reacción de aglutinación con los reactivos Anti-D y Rhesus Control.

### **Tabla N° 8**

Requisitos que se necesitan para la realización de las Pruebas de Compatibilidad pre Transfusional.

### **Tabla N° 9**

Toma de decisión para la utilización de las Pruebas de Coombs.

### **Tabla N° 10**

Resumen de los resultados de la Frecuencia de Anticuerpos Irregulares en Donantes de Sangre, según investigaciones realizadas en los Bancos de Sangre de Referencia Departamental de Santa Cruz, Cochabamba y La Paz.

### **Tabla N° 11**

Interpretación de resultados de la identificación de un Anticuerpo Irregular.

## LISTADO DE APÉNDICES

### APÉNDICE N° 1

Preparación de Células Testigo A, B, O utilizadas para la confirmación de Grupo Sanguíneo ABO mediante Prueba Inversa o Sérica.

### APÉNDICE N° 2

Preparación de Solución modificada de Alsever para conservación de Hematíes.

### APÉNDICE N° 3

Preparación de Solución Salina Fisiológica Tamponada a pH 7,2 con Buffer Fosfatos (PBS).

### APÉNDICE N° 4

Preparación de Células Control de Coombs (CCC).

### APÉNDICE N° 5

Preparación de Paneles Celulares Artesanales “Made in House” o “Hechos en Casa”.

### APÉNDICE N° 6

Características de Anticuerpos Irregulares de Significancia Clínica.

### APÉNDICE N° 7

Ejemplo 1 de Interpretación de Resultado de Prueba de Identificación de Anticuerpos Irregulares.

### APÉNDICE N° 8

Ejemplo 2 de Interpretación de Resultado de Prueba de Identificación de Anticuerpos Irregulares.

### APÉNDICE N° 9

Prueba D<sup>U</sup> - D variante, para casos en los que se tiene un resultado Rh D negativo.

### APÉNDICE N° 10

**10.1** Anticuerpos que habitualmente producen Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN).

**10.2** Anticuerpos que raramente producen Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN).

## **APÉNDICE N° 11**

Planilla de Reporte de Control de Calidad Diario de Reactivos Hemoclasificadores, Reactivo de Coombs y Células A, B, O.

## **APÉNDICE N° 12**

Técnica de Lavado y Desinfección de Material de Vidrio y Plástico, Control de Calidad del Procedimiento de Lavado del Material

## **APÉNDICE N° 13**

Ejemplo de Preparación de una Suspensión de Hematíes al 5%.

## **APÉNDICE N° 14**

**Tabla N° 4** Interpretación de Positividad o Negatividad según grados de intensidad de la reacción de Hemaglutinación.

## LISTADO DE GRÁFICOS, FOTOGRAFÍAS Y ANEXOS

### GRÁFICO N° 1

Presencia de Antígenos en la membrana del hematíe y las isoaglutininas Anti-A y Anti-B.

### GRÁFICO N° 2

Preparación de batería de tubos de ensayo y rotulación de los mismos para la realización de la prueba de grupo sanguíneo Sistemas ABO: técnicas directa e inversa.

### GRÁFICO N° 3

Realización de la Técnica de grupo sanguíneo Sistemas ABO: técnicas directa e inversa.

### GRÁFICO N° 4

Curva de interacción de Antígeno-Anticuerpo durante la reacción de Hemaglutinación.

### GRÁFICO N° 5

Explicación de la realización de la Técnica para la determinación del antígeno D, del Sistema Rh.

### GRÁFICO N° 6

Explicación de la realización de la Técnica para la determinación de la Prueba Cruzada Lado Mayor.

### GRÁFICO N° 7

Explicación de la realización de la Técnica para la determinación de la Prueba Cruzada Lado Menor.

### GRÁFICO N° 8

Preparación de batería de tubos de ensayo y rotulación de los mismos para la realización del Test de Coombs Directo.

### GRÁFICO N° 9

Explicación del procedimiento para la realización de la Técnica de Coombs Directo.

### GRÁFICO N° 10

Preparación de batería de tubos de ensayo y rotulación de los mismos para la realización de la prueba para la Detección de Anticuerpos Irregulares.

### GRÁFICO N° 11

Procedimiento para la realización de la técnica para la Detección de Anticuerpos Irregulares.

### GRÁFICO N° 12

Explicación del procedimiento para la rotulación de los tubos de ensayo y realización de la técnica para la Identificación de Anticuerpos Irregulares.

### GRÁFICO N° 13

Procedimiento para la realización de la técnica para la determinación de Fenotipos del Sistema Rh: D, c, E, e.

### GRÁFICO N° 14

Procedimiento para la realización de la técnica para la determinación del antígeno KELL.

### GRÁFICO N° 15

Rotulación y envasado correcto de frascos goteros de las células de fenotipo conocido A, B, y O para la realización de la Técnica Inversa para verificación del grupo sanguíneo (Sistema ABO).

#### **GRÁFICO N° 16**

Explicación gráfica de cómo deben conservarse vaciados los tubos de los goteros antes de cerrar las tapas de los frascos.

#### **ANEXO 1**

Clasificación de las Discrepancias de Grupo Sanguíneo ABO y sugerencias para su resolución.

#### **ANEXO 2**

Reunión de Validación del Manual de Procedimientos Operativos de Técnicas Inmunohematológicas efectuadas en Servicios de Sangre, realizado en la ciudad de La Paz-Bolivia el 25 y 26 de mayo de 2017.

#### **FOTOGRAFÍAS N° 1 Y 2**

Placa de vidrio y Placa de Plástico con orificios cóncavos para determinación de grupo sanguíneo.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**AC:** Auto Control

**AGH:** Antiglobulina Humana

**AHAI:** Anemia Hemolítica Autoinmune

**BSRD:** Banco de Sangre de Referencia Departamental

**CCC:** Células Control de Coombs

**CE:** Comunidad Europea

**CP:** Concentrado Plaquetario

**EDTAK<sub>3</sub>:** Ácido Etilen diamino tetra acético tri potásico

**EHRN:** Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido

**FDA:** Food and Drug Administration, en español: Administración de Medicamentos y Alimentos

**Ig:** Inmunoglobulina

**ISBT:** International Society of Blood Transfusion, en español: Sociedad Internacional de Transfusiones Sanguíneas

**LISS:** Low Ionic Strength Solution que significa en español, Solución de Baja Fuerza Iónica

**mg:** Miligramo

**ml:** Mililitro

**p.a.:** Para análisis o grado analítico

**PAD:** Prueba de Antiglobulina Humana Directa

**PAI:** Prueba de Antiglobulina Humana Indirecta

**PBS:** Buffer Fosfato Salino pH 6,9 a 7,2 +/- 0,2

**PFC:** Plasma Fresco Congelado

**PC:** Plasma Congelado

**PG:** Paquete Globular

**PEG:** Polietilenglicol

**rpm** : revoluciones por minuto

**SSFE**: Solución Salina Fisiológica Estéril

**STAT**: Proviene del latín *statim*, que significa “urgente” o “inmediatamente”

**UI**: Unidades Internacionales

**μl**: Microlitro

**μg**: Microgramo

## DEFINICIONES ADICIONALES EN FORMATO BREVE

**ACCIÓN CORRECTIVA:** actividad tomada para eliminar la causa de la no conformidad detectada u otra situación indeseable.

**ACCIÓN PREVENTIVA:** actividad tomada para eliminar la causa de una no conformidad potencial u otra situación potencial indeseable.

**AGEMED:** Agencia Estatal de Medicamentos y Tecnologías de Salud “AGEMED” para la regulación de medicamentos, reactivos, e insumos médicos del Estado Plurinacional de Bolivia.

**AGLUTINOSCOPIO:** o Rhesuscopio, es un equipo de laboratorio que sirve para examinar la reacción de aglutinación. Consiste en un visor que emite luz intensa cuyo brillo se disminuye al utilizar un vidrio opaco que permite observar con mayor claridad las reacciones de hemaglutinación producidas en los tubos de ensayo o en placas de vidrio o plástico. El equipo puede incluir un regulador de temperatura a 37°C o simplemente emitir luz.

**ALBÚMINA SERICA BOVINA: (ASB),** es una proteína extraída del suero bovino que es ampliamente usada en las técnicas de aglutinación, si el anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo es de la clase IgG (molécula monomérica), necesita el concurso de otros agentes que faciliten su acercamiento al antígeno en los eritrocitos, esta función es cumplida por la ASB que provoca un incremento en la constante dieléctrica del medio en el que están suspendidos los eritrocitos y una disminución del potencial zeta.

**ALELO:** resulta ser cada una de las formas alternativas que presenta un gen, que ocupa la misma posición en cada par de cromosomas homólogos, se diferencia en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

**ANTICUERPO:** inmunoglobulina resultante de una respuesta inmune a un antígeno propio o ajeno al individuo.

**AFÉRESIS:** es la técnica mediante la cual se separan los componentes de la sangre de un donante/paciente, mediante un equipo médico denominado separador celular, siendo seleccionados los necesarios y devueltos al torrente sanguíneo el resto de componentes.

**ALOANTICUERPO:** inmunoglobulina resultante de una respuesta inmune a un antígeno ajeno al individuo.

**ANTICUERPO IRREGULAR DE SIGNIFICACIÓN CLÍNICA:** inmunoglobulina plasmática poco frecuente prevalencia en donantes de sangre menor del 2% que puede causar enfermedad a través de diferentes mecanismos.

**CALIBRACIÓN:** operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas, obtenidas a partir de los patrones de medida y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una

indicación. Siendo el proceso de comparar los valores obtenidos por un instrumento de medición con la medida de un patrón de referencia o estándar.

**CAPA LEUCOPLAQUETARIA:** fracción sanguínea que contiene principalmente leucocitos y plaquetas, separada por centrifugación de una unidad de sangre total o de un tubo de ensayo.

**CLONA:** copia idéntica de un organismo, célula o molécula.

**CONCENTRADO DE PLAQUETAS:** unidad que contiene principalmente trombocitos suspendidos en plasma, hemocomponente sanguíneo preparado mediante fraccionamiento de una unidad de sangre fresca de una donación única.

**CONCENTRADO DE PLAQUETAS OBTENIDAS POR AFÉRESIS:** unidad que contiene trombocitos en suspensión obtenida por métodos de aféresis.

**CONTROL DE CALIDAD:** son las actividades y técnicas operativas desarrolladas para cumplir con los requisitos de calidad establecidos.

**CONTROL DE CALIDAD EXTERNO:** es la evaluación realizada periódicamente por un proveedor de ensayos de aptitud reconocido por una entidad de acreditación, de los análisis o ensayos que efectúa un establecimiento y que tiene por objeto verificar que las técnicas, reactivos, procedimientos e interpretación de los resultados son los correctos.

**CONTROL DE CALIDAD INTERNO:** el proceso que tiene por objeto, a través de pruebas realizadas cada vez que se efectúa un análisis o ensayo o conjunto de ensayos de la misma técnica, para detectar y corregir errores eventuales.

**CRIOPRECIPITADO:** hemocomponente que contiene la fracción crioglobulínica del plasma, obtenida por centrifugación de una donación única y concentrado a un volumen final de 10 a 20 ml. Contiene una porción importante de factor VIII (80 a 120 UI), Factor von Willebrand (40 a 70%), fibrinógeno (aproximadamente 250 mg) factor XIII (20 a 30%) y fibronectinas presentes en el plasma.

**EFEECTO PROZONA:** fenómeno debido al exceso de anticuerpos presentes en muestras de suero no diluido o a bajas diluciones, que hace que se formen preferentemente complejos antígeno-anticuerpo que impiden que se observe aglutinación.

**EFEECTO POSTZONA:** fenómeno debido al exceso de antígenos presentes en muestras de hematíes suspendidos erróneamente de manera muy concentrada, originando que no se formen suficientes complejos antígeno-anticuerpo para ser evidenciados, el exceso de antígenos los enmascara, dando falsos negativos.

**EDTAK<sub>3</sub>:** Solución de sales de sodio y potasio del ácido etilen diamino tetra acético.

Las sales se comportan como poderosos anticoagulantes ya que inhiben la participación del ion calcio en la cascada de la coagulación de la sangre. Es el anticoagulante ideal en Inmunoematología debido a su accesibilidad y costo de los tubos de ensayo que ya incluyen el anticoagulante (tubos con tapa lila), ya que no afecta la morfología, en este caso la membrana de los hematíes donde se ubican los antígenos de grupo sanguíneo.

**ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO:** es un trastorno sanguíneo en la que una madre produce anticuerpos durante el embarazo que atacan los glóbulos rojos de su propio feto, cuando la madre y el bebé tienen tipos de sangre diferentes.

**ESPECIFICIDAD:** capacidad de una prueba de laboratorio para identificar solo a los verdaderos positivos. En el caso de Inmunoematología, cuando se habla de especificidad de un reactivo

hemoclasificador significa que dicho reactivo debe reaccionar aglutinando únicamente contra aquellas células para las cuales fue fabricado y no con otras.

**ESTERILIZACIÓN:** procedimientos físicos o químicos para eliminar o inactivar microorganismos viables. Implica la eliminación o muerte de todos los microorganismos que contiene un objeto o sustancia.

**EVENTO DE RIESGO:** suceso imprevisto o de realización insegura que podría llevar a un resultado adverso.

**EXANGUINOTRANSFUSIÓN:** procedimiento terapéutico que consiste en cambiar la sangre de una persona, sustituyéndola por sangre proveniente de donantes cuyos eritrocitos y plasma conserven todas sus propiedades terapéuticas. El recambio de un volumen sanguíneo determinado, es llevado a cabo en pequeñas fracciones, bajo estricta técnica estéril y monitoreo de los signos vitales del paciente.

**FECHA DE CADUCIDAD O LÍMITE DE VIGENCIA:** el último día en que las unidades de sangre, componentes sanguíneos, los materiales, las sustancias y los reactivos se consideran viables o útiles.

**FIBRONECTINA:** glicoproteína adhesiva presente en forma soluble en plasma e insoluble en la matriz extra celular de la mayoría de los tejidos. La concentración de esta proteína en plasma es de aproximadamente 300 +/- 100 ug/mL.

136

**HEMÓLISIS:** Desintegración o disolución de los hematíes, con liberación consiguiente de la hemoglobina.

**IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS:** proceso diseñado para conocer la especificidad de uno o varios anticuerpos.

**INMUNOGLOBULINA:** proteína presente en el plasma, de mayor peso molecular que la albúmina, que actúa como anticuerpo.

**INSERTO:** información escrita dirigida al usuario, que acompaña al reactivo y que incluye la información del fundamento de la utilización del mismo, la composición y su preparación, el tipo de muestra que se requiere, la técnica que se debe seguir, la interpretación de los resultados, las limitaciones del procedimiento y la bibliografía.

Se debe realizar una lectura detallada del inserto del reactivo donde está descrita la técnica, para su cabal comprensión, debiendo seguir rigurosamente todas las instrucciones que deben estar claramente descritas para lograr resultados confiables, con la calidad esperada.

Los insertos deberán estar en idioma español, en caso de estar en otro idioma las casas proveedoras de reactivos deberán proveer la traducción pertinente.

Al momento de realizar las especificaciones técnicas se deberá aclarar que será obligatorio presentar las copias traducidas más los insertos originales.

**ISO 9001:** Es una norma internacional que se aplica a los sistemas de gestión de calidad (SGC) y que se centra en todos los elementos de administración de calidad con los que una empresa debe contar para tener un sistema efectivo que le permita administrar y mejorar la calidad de sus productos o servicios. Esta norma se actualiza cada determinado tiempo, la actual versión es la 2015.

**HAPLOTIPO:** es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos.

**LISS:** Viene de las palabras en inglés, Low Ionic Strength Solution, es un reactivo utilizado para reducir la fuerza iónica del medio de reacción en los procedimientos de detección e identificación de anticuerpos y en las pruebas de compatibilidad. La presencia de este reactivo refuerza la interacción antígeno-anticuerpo durante la incubación.

**MUESTRA:** alícuota de sangre, plasma, suero o de un producto extraída del conjunto por métodos que permitan considerarla como representativa del mismo, empleada para fines de diagnóstico, comprobación o investigación, no utilizable para fines terapéuticos.

**PAQUETE GLOBULAR:** hemocomponente que contiene mayoritariamente glóbulos rojos, obtenidos por fraccionamiento de una unidad de sangre total de una donación única, de un donante de sangre.

**PLASMA FRESCO CONGELADO:** hemocomponente que se obtiene tras la centrifugación de una unidad de 450 ml de sangre total, en las seis a ocho horas que siguen a su obtención. Tiene un volumen que oscila entre 200-250 ml. Puede almacenarse hasta un año a - 30° C. Contiene los factores lábiles de la coagulación Factores V, VII y VIII.

**PLASMA CONGELADO:** hemocomponente que solo contiene los factores estables de la coagulación, se obtiene del Plasma Fresco Congelado vencido o de una unidad de Sangre Total procesada a partir de las 8 horas de extraída hasta su caducidad y a partir de la remoción del Crioprecipitado, también denominado este último como Plasma carente de Crioprecipitado.

**PROCESO:** es un conjunto de actividades mutuamente relacionadas o que interactúan, las cuales transforman elementos de entrada en resultados.

**PROCEDIMIENTO:** es una forma específica para llevar a cabo una actividad o un proceso. Cuando se tiene un proceso que tiene que ocurrir en una forma específica, y se detalla cómo sucede, se tiene un procedimiento.

**PRUEBA DE COOMBS DIRECTO:** análisis que permite detectar anticuerpos, complemento, o ambos, adheridos a la membrana del eritrocito "in vivo", mediante el uso del Reactivo de Coombs (anti Inmunoglobulina humana G).

**PRUEBA DE COOMBS INDIRECTO:** análisis que permite detectar en suero o en plasma anticuerpos específicos unidos "in vitro" contra algún antígeno de fenotipo conocido de la membrana del eritrocito, mediante el uso anticuerpos contra la gammaglobulina humana IgG, (suero de Coombs).

**REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES:** productos registrados y autorizados por el Ministerio de Salud a través de la Agencia de Medicamentos AGEMED, que se utilizan para la tipificación de la sangre por medio de la identificación de antígenos de los eritrocitos.

**ROULEAUX:** término médico que describe un aspecto anómalo de los hematíes cuando se observan al microscopio. Consiste en que los glóbulos rojos se apilan unos con otros formando una agrupación que recuerda por su forma a una pila de monedas en presencia de hiperviscosidad de la sangre.

En Inmunohematología este fenómeno puede ocasionar que el reactivo Rhesus Control presente un resultado falso positivo, situación que invalidaría la prueba de hemoclasificación.

**SANGRE TOTAL:** el tejido hemático tal y como se obtiene en una sesión de extracción, obtenida de un donante de sangre y que se ha suspendido en una solución anticoagulante.

**SENSIBILIDAD:** capacidad de una prueba de laboratorio para detectar verdaderos reactivos o verdaderos positivos.

**SERVICIOS DE SANGRE:** nombre genérico que se le asigna al conjunto de los servicios involucrados en los procesos asociados a la Medicina Transfusional: Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión, cuyo objetivo es asegurar la autosuficiencia de sangre y sus componentes para la población boliviana en forma oportuna, segura, eficiente y con los máximos estándares de calidad disponibles.

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD:** serie de actividades coordinadas que se llevan a cabo sobre un conjunto de elementos para lograr la calidad de los productos o servicios que se ofrecen al cliente, es decir, es planear, controlar y mejorar aquellos elementos de una organización que influyen en el cumplimiento de los requisitos del cliente y en el logro de la satisfacción del mismo.

**SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA ESTÉRIL TAMPONADA CON BUFFER FOSFATO:** es un diluyente isotónico constituido por solución salina (al 0,75 - 0,9%) tamponada con fosfato utilizada sistemáticamente para preparar suspensiones de células. Las sales contenidas en estos líquidos de suspensión proporcionan un medio isotónico para mantener la integridad y viabilidad de las células. Además, un valor de pH fisiológico (de 6,8 a 7,4) puede ser importante para mantener la viabilidad. También se pueden utilizar solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2) y solución salina (al 0,9%) para los pasos de enjuague y lavado en diversos procedimientos de laboratorio. El cloruro sódico proporciona protección osmótica a las células. Además, los fosfatos suministran un pH fisiológico estable que también es importante para el mantenimiento de la viabilidad de las células.

## **ANEXO EDITORIAL**

### **ELABORACIÓN**

Dra. Ericka Lucía Machicao Carrasco  
COORDINADORA GENERAL PNS/DGSS/VMSyP/MS

Dra. Ana Alicia Rodríguez Bertón  
PROFESIONAL TÉCNICA PNS/DGSS/VMSyP/MS (2016 - 2017)

Dra. Lissete Bautista Machicado  
TÉCNICA MÉDICA PNS/DGSS/VMSyP/MS

Dra. Melina Carpio Corrales  
MÉDICA PNS/DGSS/VMSyP/MS (2016 - 2017)

Lic. Joaquín Gironda Apuri  
TÉCNICO ESTADÍSTICO PNS/DGSS/VMSyP/MS

### **VALIDACIÓN**

#### **- SERVICIOS DEPARTAMENTALES DE SALUD, SEDES**

Dr. Juan José Amador Arze  
RESPONSABLE DE MEDICINA TRANSFUSIONAL - SEDES LA PAZ

Dra. Fátima Guzmán Peña  
PROGRAMA DEPARTAMENTAL DE SANGRE SEGURA - SEDES SANTA CRUZ

Dra. Romina Peredo Ardaya  
PROGRAMA DEPARTAMENTAL DE SANGRE - SEDES BENI

Dra. Jovanna Ordoñez Claire  
RESPONSABLE DE MEDICINA TRANSFUSIONAL - SEDES CHUQUISACA

#### **- SOCIEDAD BOLIVIANA DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA**

Dr. Ignacio Alurralde Juárez  
PRESIDENTE

#### **- SERVICIOS DE SANGRE DE LA RED NACIONAL DE SANGRE**

Dra. María Luisa Patón Aguilar  
DIRECTORA BANCO DE SANGRE LOCAL EL ALTO

Dra. Sara Aruquipa Cerrogrande  
SERVICIO DE TRANSFUSIÓN - HOSPITAL COREA EL ALTO

Dra. Ingrid Guachalla Morón  
SERVICIO DE TRANSFUSIÓN - HOSPITAL ARCO IRIS LA PAZ

Dr. Mario Aldo Chávez Ramos  
JEFE DE LABORATORIO - HOSPITAL LUÍS URÍA DE LA OLIVA CAJA NACIONAL  
DE SALUD LA PAZ

Dra. Tatiana Camacho Chávez  
RESPONSABLE DE INMUNOHEMATOLOGÍA - BSRD SANTA CRUZ

Dra. Enriqueta Rojas Méndez  
SERVICIO DE TRANSFUSIÓN HOSPITAL UNIVERSITARIO JAPONÉS - SANTA CRUZ

Dra. Ximena Pérez Chacón  
SERVICIO DE TRANSFUSIÓN DE GUARACACHI CAJA PETROLERA DE SALUD SANTA CRUZ

Dra. María Luisa Herrera Rivera  
DIRECTORA BSRD - COCHABAMBA

Dra. Dely del Carmen Vedia Rendón  
RESPONSABLE DE INMUNOHEMATOLOGÍA BSRD - COCHABAMBA

Dra. Carla Alarcón Suarez  
SERVICIO DE TRANSFUSIÓN  
HOSPITAL MATERNO INFANTIL BOLIVIANO JAPONÉS TRINIDAD-BENI

Dra. Diana Duchén Reynaga  
DIRECTORA BSRD - CHUQUISACA

Dra. Shirley Lenz Gonzales  
JEFA DE LABORATORIO BSRD - CHUQUISACA

Dra. Edith Colque Ninaja  
JEFA DE LABORATORIO BSRD - ORURO