

Protocolo específico de técnicas: GRUPO SANGUÍNEO Y ANTIGLOBULINA HUMANA MANUAL

Servicio: Hematología y Hemoterapia. Servicio de Transfusión

Fecha de entrega: 16 de Junio de 2009

Destinatario: Técnicos de laboratorio y Facultativos del Servicio de transfusión

Reg: PCM PT 012

CONTROL DE MODIFICACIONES		
DESCRIPCION	Nº Versión	Fecha Edición
Creación: Servicio de Hematología y Hemoterapia: Virginia Quirós Redondo	1	16 de Junio de 2009

Revisado: Servicio de Hematología y Hemoterapia Fecha: 4 de Mayo de 2009 Firma	Aprobado: Comisión de Hemoterapia Fecha 05/11/09 Firma
---	--

INDICE:

DATOS GENERALES

- 1.1 Aplicación
- 1.2 Fundamento
- 1.3 Especificaciones de la muestra
- 1.4 Reactivos y otros materiales requeridos
- 1.5 Equipamiento requerido
- 1.6 Finalización del trabajo

DETERMINACIÓN GRUPO SISTEMA ABO

- 2.1 Alcance
- 2.2 Responsabilidades
- 2.3 Fundamento
- 2.4 *Prueba hemática: en tubo*
 - 2.4.1 Material requerido
 - 2.4.2 Técnica
 - 2.4.3 Interpretación
- 2.5 *Grupo y Rh hemático en porta (para bolsas de CH)*
 - 2.5.1 Material requerido:
 - 2.5.2 Técnica
 - 2.5.3 Interpretación
- 2.6 *Grupo sérico o inverso*
 - 2.6.1 Material requerido
 - 2.6.2 Técnica
 - 2.6.3 Interpretación
- 2.7 Indicadores de calidad
- 2.8 Introducción en el Sistema Informático

DETERMINACIÓN GRUPO SISTEMA RH

- 3.1 Alcance
- 3.2 Responsabilidades
- 3.3 Fundamento
- 3.4 Material requerido
- 3.5 Técnica
- 3.6 Interpretación
- 3.7 Determinación del antígeno D débil, Du
- 3.8 Indicadores de calidad
- 3.10 Introducción en el Sistema Informático

DISCREPANCIA DEL GRUPO SÉRICO HEMÁTICO

- 4.1 Causas de discrepancia en el tipaje sérico y hemático
- 4.2 Estudio básico
 - 4.3 Estudio avanzado: confirmación de subgrupo débil de A o B, Adsorción y Elusión

DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN MENORES DE 4 MESES SUBGRUPOS SANGUÍNEOS

6.1 Interpretación

6.2 Subgrupo A2 con anti-A1

PRUEBA DE LA ANTIGLOBULINA HUMANA DIRECTA

7.1 Alcance

7.2 Responsabilidades

7.3 Fundamento

7.4 Material requerido

7.5 Técnica

7.6 Interpretación

7.7 Indicadores de calidad

7.8 Introducción en el Sistema Informático

8. ANTICUERPOS IRREGULARES O ANTIGLOBULINA HUMANA INDIRECTA (TEST COOMBS INDIRECTO)

Alcance

Responsabilidades

Fundamento

Material requerido

Técnica

Interpretación

Indicadores de calidad

Introducción en el Sistema Informático

DATOS GENERALES

1.1 Aplicación

Las técnicas manuales de determinación de grupo y antiglobulina se utilizan cuando los métodos automatizados no funcionan o pueden originar retrasos en caso de situación de extrema urgencia. También pueden utilizarse como comprobación de otras técnicas o para estudios especiales como discrepancias de grupo o interferencia con anticuerpos clínicamente no significativos

1.2 Fundamento:

Todas las reacciones determinadas en estas pruebas se basan en la identificación de antígenos, sobre el hematíe y anticuerpos, generalmente en el suero o plasma, que son clínicamente significativos para valorar las pruebas y compatibilidad sanguínea.

1.3 Especificaciones de la muestra

Un tubo de EDTA de 5 ml y un tubo de suero sin gel de 10 ml

1.4 Reactivos y otros materiales requeridos:

Anti-suero anti-A, anti-B, Anti-D (IgG + IgM de dos casas comerciales (si estuviese disponible))

Células comerciales , A, B y O conocidas

Tubos de cristal de 3 ml y base cóncava

Pipeta tipo Pasteur

Descripción de reactivos pendiente del concurso

1.5 Equipamiento requerido:

Centrífuga de inmunohematología

1.6 Finalización del trabajo

El almacenaje de muestras y su conservación se realizará según está indicado en el procedimiento Utilidades y otras funciones.

Para la eliminación de residuos no se precisa de precauciones especiales.

DETERMINACIÓN GRUPO SISTEMA ABO

2.1 Alcance:

TEL del Servicio de Transfusión

2.2 Responsabilidades

Facultativo/ TEL.

2.3 Fundamento:

La determinación del grupo sanguíneo debe incluir la prueba hemática (sobre el propio hematíe con sueros conocidos) y la sérica (enfrentando el suero del paciente con hematíes conocidos)

2.4. Prueba hemática: en tubo

Material requerido:

Hematíes del paciente (tubo de EDTA).
Antisueros comerciales anti-A, anti-B y anti-AB.
Pipeta Pasteur

Técnica:

Rotular 4 tubos: A, B, AB y albúmina
Diluir los hematíes al 5%.
Añadir 2 gotas de anti-A en un tubo (Tubo A), 2 gotas de anti-B en otro tubo (tubo B) y 2 gotas de anti-AB en el 3º tubo (tubo AB).
Poner una gota de la suspensión de estos hematíes diluidos al 5% en cada uno de los tubos.
Mezclar suavemente y centrifugar 30 segundos.
Observar si se ha producido aglutinación moviendo suavemente el tubo

Interpretación:

Las reacciones con los reactivos de anticuerpos ABO son generalmente de 3+ y 4+
Se leen los resultados de la aglutinación en cada uno de los tubos:

Agglutinación resultante de enfrentar hematíes de un cierto grupo con anti-sueros comerciales:

Suero comercial Hematíes pac.	Anti-A	Anti-B	ANTI-AB
Grupo O	No aglutina	No aglutina	No aglutina
Grupo A	Aglutina	No aglutina	Aglutina
Grupo B	No aglutina	Aglutina	Aglutina
Grupo AB	Aglutina	Aglutina	Aglutina

Grupo y Rh hemático en porta (para bolsas de CH):

Material requerido:

Hematíes procedentes de bolsas (CH), recogidas en SAG-manitol.
Anti-suero anti-A, anti-B y anti-D comerciales

Técnica:

Colocar en una placa de cristal limpia ó placa de grupos, dos gotas de los siguientes anti-sueros respectivamente: anti-A, anti-B y anti-D, en cada pocillo (evitar que se mezclen).

Añadir una gota de sangre total del paciente, donante a estudiar o de las bolsas procedentes del CTM a cada pocillo con anti-suero

Mezclar las gotas de sangre con los anti-sueros respectivos, utilizando un palillo distinto en cada caso y balancear o rotar la placa hasta que aparezca la aglutinación.

Leer la aglutinación macroscópicamente y anotar los resultados. (ver interpretación en tubo)

Interpretación:

La aglutinación se considera un resultado positivo. Ver interpretación en tubo.

Grupo sérico o inverso:

Material requerido:

Suero o plasma del paciente. El suero del paciente se obtiene centrifugando el tubo de suero sin gel a 3000 rpm durante 10' en la centrifuga de tubos

Centrifuga de tubos

Hematíes comerciales A1 y B.

Pipeta automática

Técnica:

Rotular 3 tubos: HA, HB y autocontrol (AC)

Colocar en cada tubo 2-3 gotas del suero del paciente a estudiar.

Añadir 1 gota de hematíes A1 en el tubo HA, 1 gota de hematíes B en el tubo HB y 3 gotas de hematíes propios a estudiar.

Mezclar suavemente y centrifugar durante 30 segundos a 1500 rpm.

Leer la presencia de aglutinación.

Interpretación:

Hematíes comerciales Suero del paciente	HEMATÍES A1	HEMATÍES B
Grupo A	No aglutina	Aglutina
Grupo B	Aglutina	No aglutina
Grupo AB	No aglutina	No aglutina
Grupo O	Aglutina	Aglutina

En la prueba sérica las reacciones entre el suero del paciente y las células comerciales son más débiles.

Indicadores de calidad:

Vienen determinados en el procedimiento de control de calidad de reactivos y técnicas

Introducción en el Sistema Informático:

Introducir los datos en PROGESA

DETERMINACIÓN GRUPO SISTEMA RH

3.1. Alcance:

TEL de BS .

3.2. Responsabilidades

Facultativo / TEL .

Fundamentos:

Se basa en una reacción antígeno-anticuerpo. El objetivo es determinar el antígeno D correspondiente al grupo ABO. En sujetos con autoanticuerpos o proteínas séricas anormales los reactivos con alto contenido en proteínas pueden originar resultados no válidos. Por tanto, se hace necesario la utilización del control Rh.

3.4 Material requerido:

Tubo de EDTA. Hematíes del paciente diluidos al 2-5%.

Suero anti-D comercial. Se hará si se dispone de ello con 2 anti-D de dos casas comerciales distintas

Pipeta Pasteur

Técnica:

Rotular 2 tubos: uno rotulado Anti-D y otro control

Haced suspensión hematíes al 2-5% en salino

Colocar dos gotas de anti-D en un tubo.

Colocar dos gotas de control Rh (albúmina) en otro tubo.

Añadir una gota de la suspensión de hematíes al 2-5% en cada tubo.

Mezclar suavemente y centrifugar 45 segundos en centrifugadora a 1500rpm

Resuspender el botón suavemente y leer.

Interpretación

Anti-sueros Comerciales Hematíes del pac.	Anti-D	Control Rh
Grupo Rh Pos.	Aglutina	No aglutina
Grupo Rh Neg.	No aglutina	No aglutina
Resultado no valorable	Aglutina	Aglutina
Resultado no valorable	No aglutina	Aglutina

El control Rh positivo invalida el grupo Rh. La no aglutinación con anti-D y con el control no se considerará negativa hasta hacer el Du.

Las positivities suelen ser de 2+ o mayores. Positividades de 1+ o más débiles deben confirmarse con la determinación de Du

Determinación del antígeno D débil , Du:

El antígeno Du es un antígeno D de expresión débil detectable únicamente por el test de ANTIGLOBULINA INDIRECTA, por tanto hay que seguir las siguientes indicaciones:

Colocar 3 gotas de anti-D en un tubo debidamente rotulado (D), y 2 gotas de albúmina en otro tubo rotulado para autocontrol (AC)

Añadir 2 gotas de suspensión de hematíes al 5% en salino

Mezclar e incubar 15 minutos a 37°C

Resuspender suavemente y lavar 3 veces en solución salina (poner 1 minuto en la centrífuga para cada lavado) .Decantar totalmente el salino en el último lavado

Añadir 2 gotas de antiglobulina humana.

Centrifugar 30 segundos a 1500 rpm

Resuspender y observar la presencia de aglutinación

NOTA: A efectos prácticos las personas Du positivas son consideradas si son donantes como D positivas y si son receptoras como D negativas.

Aunque de cualquier manera se hará constar de forma clara en su determinación de grupo Du positivo.

El Du se hará con anti-D de dos casas comerciales si se dispone de ello, siendo la técnica la misma.

Indicadores de calidad

Vienen determinados en el procedimiento de control de calidad de reactivos y técnicas.

Expresión e introducción de resultados en el Sistema Informático

Se hará en el programa PROGESA de banco de sangre.

DISCREPANCIA DE GRUPO SÉRICO Y HEMÁTICO:

Causas de discrepancia en el tipaje sérico y hemático

Cuando hay discrepancias entre el tipaje directo y el inverso es importante determinar la causa de la discrepancia antes de transfundir al paciente con un determinado tipo de hematíes.

Causas de discrepancias ABO en el tipaje directo e inverso

. Reactividades adicionales o inesperadas en el tipaje directo:

Antígenos adquiridos

Agglutinaciones no específicas

Hematíes poliaglutinables

Transfusión reciente

Receptor de médula ósea

Hematíes sensibilizados (cuando se hace la prueba con albúmina)
. Reactividades adicionales o inesperadas en el tiraje indirecto.
Otro anticuerpo con reactividad en la centrifugación inmediata Autoanticuerpo Transferencia pasiva de anticuerpos por transfusión reciente o tratamiento con hemoderivados (incluido IG) Rouleaux Subgrupos (especialmente del grupo A)
. Falta de reactividad esperada en el tipaje directo:
Antígenos alterados por enfermedad(leucemia) Transfusión de gran volumen de GR del grupo O Quimera Antígeno de subgrupo débil que reacciona débilmente con el reactivo anti-A o anti-B
. Falta de reactividad esperada en el tipaje indirecto:
Quimera Paciente transplantado Deterioro de la expresión antigénica de los hematíes reactivos durante su almacenamiento Hipogammaglobulinemia. Neonato (la expresión antigénica ABO es muy débil o ausente en los primeros 3-6 meses de vida)

Estudio básico:

Repetir la determinación en el tubo inicial, utilizando hematíes lavados

Revisar los reactivos

Si persiste la discrepancia obtener una nueva muestra de sangre, y repetir la prueba utilizando hematíes lavados.

Efectuar un test de antiglobulina directo sobre los hematíes del problema para ver si existe un anticuerpo.

Efectuar un test de anticuerpos irregulares por si la existencia de uno de ellos fuera la causa del problema

Enfrentar y leer aglutinación del suero problema con hematíes A1, A2, B O1 , O2 , O3 , O cordón y hematíes autólogos a temperatura ambiente y tras una hora de incubación en frío a 4°C. Con esta prueba se pueden detectar anticuerpos fríos y anti-A1

Enfrentar los hematíes problema con anti-A, o anti-B (dependiendo del caso). Incubar los hematíes durante 30 minutos, con el antisuero comercial que corresponda, a temperatura ambiente y a 4°C. Testar paralelamente hematíes del grupo O como control.

Siempre que exista este problema hay que ponerlo en conocimiento del hematólogo.

Estudio avanzado: confirmación de subgrupo débil de A o B, Adsorción y Elución

Lavar 1 ml de células del paciente 3 veces en salino. Retirar todo el sobrenadante del último lavado

Añadir 1 ml de anti-A o anti -B, según se sospeche, a las células lavadas.

Mezclar e incubar una hora a 4°C, mezclar ocasionalmente durante la incubación.

Centrifugar 2 min., y retirar todo el sobrenadante.

Transferir las células a un tubo limpio.

Lavar las células 8 veces con salino (10 ml), a 4°C. Recoger el sobrenadante del último lavado, para testar en paralelo con el eluido.

Realizar un eluido de Lui con las células del paciente, según se describe en el Procedimiento de técnicas de estudios especiales.

Centrifugar 5 minutos a 3500 rpm y pasar el eluido a un tubo limpio

Testar el eluido en paralelo con el sobrenadante del último lavado enfrentando con tres células conocidas del grupo sospechado y 3 células conocidas de grupo O.

Añadir 2 gotas del eluido o sobrenadante a cada tubo rotulado y una gota de células de cada tipo, examinar la aglutinación después de centrifugación inmediata y tras 15 minutos de incubación a 37°C y leer en Coombs

La presencia de anti-A o anti-B en el eluido con el sobrenadante negativo indica presencia del antígeno sospechado, además las células O deben ser negativas .Si fueran positivas habría que pensar en otro anticuerpo. Si el sobrenadante da positivo los lavados no fueron adecuados y la prueba no puede considerarse válida

Toda la prueba puede ser procesada con células A o B como control.

NOTA: Actualmente si hay una discrepancia sero-hemática se avisará al hematólogo ya que de momento no se dispone de reactivos para realizar eluido...

DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN MENORES DE 4 MESES.

Hacer sólo la prueba hemática usando técnica en tubo

No hacer prueba sérica: en el niño no están bien desarrolladas las aglutininas anti-A y anti-B. Las aglutininas que presente el bebé pueden ser de origen materno.

SUBGRUPOS SANGUÍNEOS

Existen formas diferentes de los antígenos A y B que reaccionan débilmente con los antisueros convencionales pero pueden ser más evidentes con anti-AB que procede de personas del grupo O y hace la reacción más intensa. El subgrupo más frecuente es el A2 que reacciona con Anti-A, pero no con anti-A1. Otros grupos débiles de A ó B son mucho más raros y requieren estudios complejos.

Interpretación:

Nunca se asignará un grupo hasta que esté resuelta la discrepancia

El hematólogo debe de ser informado siempre

En caso de dudas o precisar transfusión se utilizará el grupo O

Subgrupo A2 con anti-A1

El subgrupo A2 tiene una frecuencia del 20% dentro de las personas con grupo A ó AB. La identificación de A1 ó A2 no tiene ninguna relevancia clínica y no se realiza de rutina. Algunos subgrupos A2 además producen anti-A1; este anticuerpo no tiene significación clínica pero puede simular una discrepancia de grupo.

Ante una persona del grupo A ó AB que reacciona, generalmente de forma débil, con células A1 debemos saber si estamos ante una A2 ó A2B. Para ellos:

Prepara 2 tubos rotulados con Anti-A y Anti-A1

Dispensar 2 gotas de cada antisuero a su tubo correspondiente

Añadir una gota de hematíes del paciente diluidos al 5% en salino, en cada tubo

Centrifugar 20 segundos y observar si se ha producido aglutinación moviendo suavemente el tubo.

El paciente reaccionará con Anti-A , pero será negativo con anti-A1

Además el suero del paciente aglutinará células comerciales A1 pero no A2. Esta prueba completa el estudio.

Estos pacientes no precisan un tratamiento especial para transfusión pero si el anticuerpo es reactivo en caliente y en tarjeta puede interferir con la prueba cruzada y es necesario coger la sangre compatible.

PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA DIRECTA: TEST DE COOMBS DIRECTO

7.1. Alcance:

TEL de ST.

7.2. Responsabilidades

Facultativo / TEL.

7.3. Fundamento

Determinar la existencia de anticuerpos o proteínas del complemento unidos “in vivo” al hematíe. Se realizará en estudio de anemia hemolítica autoinmune (AHAI), enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), hemólisis inducida por fármacos y en reacciones transfusionales aloinmunes. Se realiza en todo recién nacido.

El anticuerpo pegado al hematíe IgG reacciona con el suero de Coombs anti-IgG

Material requerido:

Hematíes del paciente extraídos preferiblemente en EDTA, para evitar la activación del complemento.

Sueros de Coombs poliespecífico (contiene anti IgG y anti C3d).

Hematíes sensibilizados con IgG (control de Coombs)

Pipeta Pasteur

Técnica:

Preparar una suspensión de hematíes del paciente al 2-5 % con suero salino fisiológico 0.9% (no hace falta usar pipeta para la dilución, añadir salino hasta obtener un color frambuesa).

Con una pipeta Pasteur limpia añadir una gota de la suspensión celular preparada a un tubo

Llenar el tubo con solución salina isotónica; centrifugar a alta velocidad (2500 rpm 1 a 2 minutos) y decantar. Realizar este lavado 3 veces como mínimo (6 veces si es sangre procedente de cordón umbilical)

Decantar completamente tras el último lavado.

Poner una gota de esta dilución en un tubo y dos gotas de suero de antiglobulina humana poliespecífica.

Mezclar y centrifugar durante 30-45" segundos a 1500 rpm.

Resuspender las células totalmente agitando suavemente y examinar macroscópicamente si existe aglutinación

Si el test ha sido negativo: incubar el tubo 5 minutos a temperatura ambiente, recentrifugar y leer macroscópicamente. Mirar al microscopio los resultados negativos macroscópicos.

Si el test es negativo añadir a cada tubo una gota de hematíes sensibilizados con IgG (Coombs control). Centrifugar 30 segundos y leer. Tiene que dar positivo; si diera negativo, hay que repetir desde el principio la técnica.

Interpretación:

El resultado es positivo si aparece aglutinación o hemólisis.

La fuerza de la aglutinación es importante y se gradúa en intensidad de uno a cuatro cruces:

++++: Un solo botón

+++ : dos o tres fragmentos gruesos

++ : Más de tres fragmentos, claros pero más pequeños.

+ Múltiples fragmentos pequeños.

+/- : Positividad débil que desaparece con la agitación o que es dudosa. Puede precisarse mirando al microscopio.

Una prueba positiva significa que hay Inmunoglobulinas fijadas en la superficie eritrocitaria.

Si el paciente es adulto: Se ha de continuar el estudio de Anemia Hemolítica, previa consulta con el hematólogo

Si el paciente es un Recién Nacido: Estudiar el suero de la madre para identificar el anticuerpo responsable.

Indicadores de calidad

Vienen determinados en el procedimiento de control de calidad de reactivos y técnicas.

Expresión e introducción de resultados en el Sistema Informático

Se hará en el programa PROGESA de banco de sangre. **ANTICUERPOS IRREGULARES O ANTIGLOBULINA HUMANA INDIRECTA (TEST COOMBS INDIRECTO)**

8.1. Alcance:

TEL de ST.

8.2. Responsabilidades

Facultativo / TEL.

8.3 Fundamento:

Con esta prueba pretendemos identificar anticuerpos existentes en el suero o plasma de un donante o paciente.

Material requerido:

Suero o plasma del paciente
Hematíes comerciales 1, 2 y 3
Albúmina al 22%
suero de Coombs
Centrífuga
Incubadora
Pipeta Pasteur

Técnica:

Utilizar suero o plasma del paciente. El suero debe de estar limpio y sin hemólisis. Hay que evitar coágulos o restos de fibrina. La muestra debe de ser extraída dentro de los tres días previos a la determinación.

Etiquetar los tubos como 1,2 y 3 respectivamente (se utilizarán tantos tubos como tipos de células tengamos para esta clase de estudio, en nuestro caso son tres). Añadir dos gotas del suero problema a cada tubo

Añadir 1 gota (3 ó 4 gotas si es Surgiscreen 0.8% lavadas una vez en salino) de hematíes 1,2 y 3 a cada tubo respectivamente. Mezclar con suavidad.

Centrifugar 20 segundos y observar la presencia o no de aglutinación, o de hemólisis. A esta prueba se le denomina SALINO A 22°C

Añadir a cada tubo 2 gotas de albúmina al 22%, o una gota de albúmina al 30%. Mezclar con suavidad.

Centrifugar 45 segundos y observar la presencia o no de aglutinación, o de hemólisis. Esta prueba se denomina ALBÚMINA INMEDIATA O EN FRÍO.

Incubar 30 minutos a 37°C y centrifugar después 45 segundos.

Leer el resultado como en los apartados anteriores. Esta prueba se denomina ALBÚMINA EN CALIENTE O A 37°C.

Lavar 3 veces con salino isotónico los hematíes, decantando totalmente el salino en el último lavado.

Añadir 2 gotas de suero de Coombs a cada tubo. Centrifugar 30 segundos y leer como en los apartados anteriores (agitar suavemente y examinar

macroscópicamente). Las células deben de estar totalmente resuspendidas antes de puntear la reacción. Esta prueba se denomina FASE DE COOMBS.

Si la lectura es negativa comprobar con hematíes sensibilizados para suero de Coombs.

Interpretación:

El resultado es positivo si aparece aglutinación o hemólisis.

Esta prueba es la base de la prueba cruzada y cuando es negativa en todas sus fases se denomina compatible

Indicadores de calidad

Vienen determinados en el procedimiento de control de calidad de reactivos y técnicas.

Expresión e introducción de resultados en el Sistema Informático

Se hará en el programa PROGESA de banco de sangre.

PRUEBA CRUZADA

La prueba de anticuerpos irregulares o antiglobulina humana indirecta (test coombs indirecto) es la base de la prueba cruzada y cuando es negativa en todas sus fases se denomina compatible.

Se realiza igual que la antiglobulina humana indirecta pero en vez de utilizar hematíes comerciales se usan hematíes de la bolsa que se quiere cruzar con el plasma o suero del paciente.