

	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04 Vigencia: 3 años
	CARACTERISTICA : APTr 1.2	Fecha Aprobación: Abril 2021
	PROCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	Fecha Termino Vigencia Abril 2024

PROTOCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES

HOSPITAL SANTA CRUZ
 Documento Original
 Fecha: 14 / 04 / 2021
 Calidad y Seguridad del Paciente

	NOMBRE	FECHA	FIRMA
Elaborado por:	María José Santana Valenzuela TM. Encargada Unidad de Medicina Transfusional	Abril 2021	
Revisado por:	Vanessa Cavieres Álvarez Tecnólogo Médico de atención de donantes	Abril 2021	
Aprobado por:	César Rodríguez Duque Jefe Laboratorio y UMT	Abril 2021	

Nota: Los documentos exhibidos en formato impreso o copia de ellos son documentos controlados.

	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04 Vigencia: 3 años
	CARACTERISTICA : APT _r 1.2	Fecha Aprobación: Abril 2021
PROTOCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES		Fecha Termino Vigencia Abril 2024

1.- OBJETIVOS


Procedimiento orientado a pesquisar anticuerpos irregulares, que pueden ser tanto aloanticuerpos, de tipo IgM como IgG, presentes en el suero o plasma de un paciente, utilizando para su detección un set de dos o tres glóbulos rojos (GR) grupo O de antigenicidad conocida, de manera que en conjunto posean los antígenos de importancia clínica, idealmente en estado doble dosis. Comprende al menos la fase antiglobulina humana (AGH).

2.- ALCANCE

Este procedimiento comprende desde el momento en que se recibe la orden de examen junto con la muestra del paciente, hasta que se ingresa el resultado de este estudio al libro de transfusiones y sistema informático del laboratorio clínico del Hospital Santa Cruz, emitiéndose finalmente el informe correspondiente. Cabe mencionar que se realiza este procedimiento a todas las embarazadas y a aquellos pacientes que van a ser transfundidos o posterior a este proceso.

3.- DEFINICIONES


- Anticuerpos Irregulares:** Son aquellos anticuerpos presentes en suero o plasma de un paciente o receptor, los cuales están dirigidos contra antígenos eritrocitarios de otros sistemas sanguíneos, distinto de los anticuerpos naturales del sistema ABO: anti A y anti B. estos anticuerpos pueden ser, según su tipo tanto IgM como IgG, y de acuerdo a su clasificación pueden ser aloanticuerpos o autoanticuerpos.
- Aloanticuerpos:** Son todos aquellos anticuerpos que están dirigidos contra antígenos eritrocitarios y que son diferentes de los naturales anti A y anti B. La inmunización a estos antígenos eritrocitarios con la consecuente aparición de estos aloanticuerpos, puede estar desencadenada por embarazo, transfusión previa, o por inyección deliberada de material inmunogénico (vacunas), e incluso en algunos casos el causante es desconocido.
- Autoanticuerpos:** Son todos aquellos anticuerpos cuya especificidad son antígenos eritrocitarios intrínsecos, es decir, que se encuentran presentes en sus propios glóbulos rojos, provocando una hemólisis autoinmune.
- Anticuerpo tipo IgM:** Inmunoglobulina pentamérica, cuyo peso molecular es de 900.000 D, su diámetro de 300 Å, posee capacidad aglutinante, capaz de activar complemento de forma total, puede actuar desde 4°C a 37°C, llamadas también anticuerpos fríos por esta razón. Representa el 4% de las Inmunoglobulinas totales.
- Anticuerpo tipo IgG:** Inmunoglobulina monomérica, cuyo peso molecular es de 150.000 D, su diámetro de 120 Å, no posee capacidad aglutinante, capaz de activar complemento de forma parcial, actúan a 37°C, llamadas también anticuerpos calientes por esta razón. Representa el 80% de las Inmunoglobulinas totales.

	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04 Vigencia: 3 años
	CARACTERISTICA : APTr 1.2	Fecha Aprobación: Abril 2021
	PROTOCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	Fecha Termino Vigencia Abril 2024

- **Complemento:** dentro de la respuesta inmune inespecífica de tipo humoral se encuentra el sistema del complemento, el que está constituido por moléculas termolábiles presentes en el individuo, implicadas en la defensa frente a infecciones y células tumorales, potenciando la inflamación y la fagocitosis; actúa produciendo la lisis de células y microorganismos.
- **Poliaglutinación:** Fenómeno atípico en el cual los GR son aglutinados por sueros humanos de adultos ABO compatibles, pero no por sueros de recién nacidos. En algunas instancias los GR son aglutinados por suero autólogo, pero esto no es común.
- **Panaglutinación:** Fenómeno que se produce por la presencia de gelatina de Wharton o de un anticuerpo producido por bacterias, que causa aglutinación con todas las células a las que se enfrenta incluyendo las propias del individuo, por lo tanto son también autoaglutininas; las panaglutininas no tienen especificidad y además no producen hemólisis.
- **Roleaux:** Aglomeración de los glóbulos en forma de “pilas de monedas”, debida a infusión de dextran, fibrinógeno, o a las concentraciones de proteínas plasmáticas especialmente del tipo alfa-globulinas presentes en el plasma del paciente.
- **SAGH:** Suero antiglobulina humana (reactivo).
- **PBS:** Buffer fosfato salino.

4.- RESPONSABLES

- **Técnico paramédico (TP):** Están encargados de la recepción de la solicitud de transfusión u orden de examen junto con la muestra, preparación de la hoja de protocolo de trabajo y la centrifugación de la muestra.
- **Tecnólogo médico (TM):** Es el encargado de la ejecución de la técnica, interpretación de resultados, registros e ingreso de resultados al programa informático del laboratorio con su respectiva validación. El TM encargado de transfusiones o el TM de hematología es el responsable de supervisar el cumplimiento de cada una de las etapas antes mencionadas garantizando el cumplimiento de los estándares de calidad definidos por el MINSAL.

	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04 Vigencia: 3 años Fecha Aprobación: Abril 2021 Fecha Termino Vigencia Abril 2024
	CARACTERISTICA : APTr 1.2	
	PROCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	

5.- DESARROLLO

Al realizar esta técnica, es posible detectar anticuerpos irregulares (aloanticuerpos), y en forma paralela, autoanticuerpos.

Dado que los anticuerpos tienen distintas características, se hace necesaria la utilización de diferentes temperaturas y medios de reacción.

El tipo de muestra requerida para este procedimiento es sangre total con o sin anticoagulante (EDTA).

Es posible desarrollar esta técnica en diferentes soportes (tubo y gel).

5.1 Detección de aloanticuerpos


Es la técnica que pesquisa aloanticuerpos presentes en el suero o plasma del paciente, para lo cual se utilizan GR OI y OII comerciales, puesto que estos GR poseen en conjunto, de manera conocida y controlada, todos los antígenos de importancia clínica, hacia los cuales están dirigidos los anticuerpos que eventualmente podría presentar el paciente en su plasma.

5.1.1 Técnica en gel manual:

- Centrifugar la muestra de sangre total para utilizar plasma o suero.
- La suspensión de GROI y GROII está al 0.8% y son comerciales listo para su uso.
- Rotular dos columnas de un gel de Coombs con las siglas OI y OII y el número correlativo de la muestra (últimos números del código del sistema informático de laboratorio)
- Agregar 50 ul de la suspensión preparada de GROI y GROII en las columnas correspondientes.
- Depositar 25 ul del suero o plasma del paciente en estudio en cada uno de las columnas mencionadas anteriormente.
- Incubar el gel a 37 °C por 15 minutos, centrifugarlos y leer los resultados
- En el caso que de positivo una detección de anticuerpos irregulares se puede solicitar detección de autoanticuerpos o estudio de amplitud térmica.

5.1.2 Técnica en gel automatizada:

- Se debe utilizar el equipo Swing que es el pipeteador de muestras.
- En el computador al lado del equipo se debe abrir el icono que dice USUARIO.
- Se abrirá el programa y en la parte inferior se debe presionar COVER o F11, para abrir la tapa del equipo swing.
- Se deben cargar las muestras, las células OI y OII y las tarjetas liss coombs con los códigos de barra visibles (todo sin tapa y con los geles descubiertos de la lámina), luego cerrar la tapa.
- Luego se debe presionar START o F2, para que comience.
- El equipo va a leer los códigos de barra de las muestras y se le debe asignar la prueba test de Coombs indirecto, luego presionar Validate o F2, posterior a eso te pregunta si está asignado de forma correcta y se debe presionar YES.

	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04
	CARACTERISTICA : APTr 1.2	Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	Fecha Aprobación: Abril 2021 Fecha Termino Vigencia Abril 2024


- g) Se debe identificar el tipo de muestra que utilizaras, luego presionar Validate o F2
- Muestra centrifugada
 - Muestra con sangre total
 - Solo plasma
- h) Luego te presenta los reactivos, que necesita para realizar esa prueba. Si están ingresados todos se debe apretar CONTINUE o F2.
- i) Finalmente el equipo leerá los códigos de barras de los reactivos es decir Tarjetas y células OI y OII y comenzara a trabajar.
- j) Una vez que el pipeteador termina arrojará una alarma sonora y es en ese momento se debe presionar COVER para abrir la tapa y retirar las tarjetas.
- k) Se deben llevar las tarjetas a incubar 15 minutos a 37°C.
- l) Posterior a la incubación se debe utilizar el equipo Saxo que centrifugará y leerá las tarjetas.
- m) Para la utilización del equipo saxo se debe utilizar el icono MAESTRO, ahí solicitara usuario y clave para acceder.
- n) Después del ingreso, se debe seleccionar el icono saxo (segundo icono).
- o) Se abrirá una pestaña con 4 opciones, en este caso se selecciona la opción LECTURA AUTOMATICA.
- p) Se deben ingresar las tarjetas al equipo mostrando el código de barra al lector (ubicación parte superior derecha) y cerrar la tapa
- q) Presionar la opción leer y consultara si quieres centrifugar las tarjetas o solo leer, en este caso se debe presionar SI.
- r) Posterior a 10 minutos el equipo arrojará las fotografías donde se podrán interpretar los resultados.

Interpretación de la técnica en gel:

- Se considera positivo una detección de aloanticuerpos si se observa en el cuerpo de algunas de las columnas aglutinación de GR fuera del precipitado en su base. Para saber si la naturaleza del aloanticuerpos es IgM se debe hacer una prueba de centrifugación inmediata en tubo.
- La ausencia de aglutinación se considera como ausencia de aloanticuerpos, teniendo presente que podría existir alguno, cuyo antígeno al cual está dirigido no estuviese presente en los GR OI y GROII, utilizadas como células testigo o reactivo.
- Las muestras que correspondan a transfusiones en las que se detecten aloanticuerpos, deben enviarse al Centro de Sangre de Valparaíso para su identificación.

5.2 Control de calidad de la técnica

El control de calidad para esta técnica se debe realizar semanalmente, se debe utilizar un control de calidad comercial que tiene anticuerpos irregulares.

	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04
	CARACTERISTICA : APTr 1.2	Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	Fecha Aprobación: Abril 2021 Fecha Término Vigencia Abril 2024

6.- REVISION Y CONTROL DE CAMBIOS

Deben quedar los registros de los cambios realizados al documento con fecha, el tipo de cambio (ejemplo flujograma) y su aprobación


Revisión	Fecha	Cambios
Versión 01	Diciembre 2015	Anexo 2 y Anexo 3
Versión 02	Marzo 2018	Actualización de contenido
Versión 03	Abril 2021	Actualización de contenido

7.- REFERENCIAS

- Manual de procedimientos operacionales estandarizados POE –BS HSFdo
- Orientaciones para centros de sangre y UMT – MINSAL, 2006
- Estándares en inmunohematología, documentos de trabajo de la Comisión Nacional de Sangre y Tejidos – 2009.
- Manual de inmunohematología y banco de sangre – Escuela Tecnología Médica Universidad de Talca – 2010
- Manual Técnico AABB – 2005
- Glosario de términos MINSAL, 2009

8.- DISTRIBUCIÓN

- Unidad de Medicina Transfusional
- Dpto. de Calidad y Seguridad del Paciente.

	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04
	CARACTERISTICA : APTr 1.2	Vigencia: 3 años
	PROCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	Fecha Aprobación: Abril 2021 Fecha Termino Vigencia Abril 2024

9.- ANEXOS

Anexo N°1

INSTRUCTIVO MANEJO DE CENTRIFUGAS

Técnica en tubo


La centrifuga ALC 42 CM para la centrifugación de las muestras, posee dos velocidades fijas (SPEED); high y low, en este caso se debe utilizar la high y el tiempo para ambas puede variar de minuto a minuto, (TIMER), para centrifugar las muestras se deben fijar 4 minutos.

Técnica en gel.

En la técnica de geles solo se utiliza la centrifugación para lectura (esta técnica suprime los lavados). La centrifugación de geles se efectúa en la centrifuga para geles, a los tiempos y velocidades estandarizados por el proveedor (BIO-RAD), que está grabado en el programa de la centrifuga (10 minutos a **1800 rpm**).

Para esto se disponen los geles siguiendo el principio básico de contrapesar las cargas en forma opuesta, y apretando el botón **START** para echar a andar la centrifugación.

Una vez que la centrifuga se ha detenido, se abre directamente presionando antes el botón **STOP/OPEN**.

 Hospital Santa Cruz Cruz del Sur - Cochabamba	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04
	CARACTERISTICA : APT _r 1.2	Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	Fecha Aprobación: Abril 2021 Fecha Termino Vigencia Abril 2024

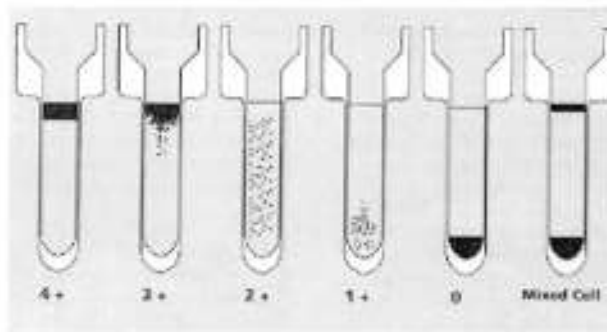
Anexo N°2


INSTRUCTIVO LECTURA E INTERPRETACION DE REACCIONES DE AGLUTINACION

- La fuerza de la reacción de aglutinación se debe informar en cruces siguiendo un patrón estándar,
- Score es la suma de un valor numérico que se le asigna al grado de fuerza o potencia de la reacción de aglutinación.
- Es muy importante para todos los métodos en tubo la técnica de lectura de "agitar y girar". Si no hace esto puede significar que se pierdan los subgrupos débiles y las reacciones de campo mixto. En cambio la técnica en gel la lectura es más sencilla y simple.
- Es recomendable y puede ayudar en los laboratorios de poca luz que se utilice una fuente de luz para ambas lecturas.
- Es importante reconocer y no pasar por alto e informar la presencia de un campo mixto o de hemolisis por su relevancia clínica.

Técnica en gel

- 1) 4+ GR aglutinados en la parte alta de gel
- 2) 3+ 80% de los GR en el tercio superior de la columna
- 3) 2+ 80% de los GR en los dos tercios superiores de la columna
- 4) 1+ 80% de GR en los dos tercios inferiores de la columna
- 5) Negativo (-) 100% de los GR en el fondo
- 6) CM, campo mixto



	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04 Vigencia: 3 años Fecha Aprobación: Abril 2021 Fecha Termino Vigencia Abril 2024
	CARACTERISTICA : APTr 1.2	
	PROTOCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	

Anexo N°3

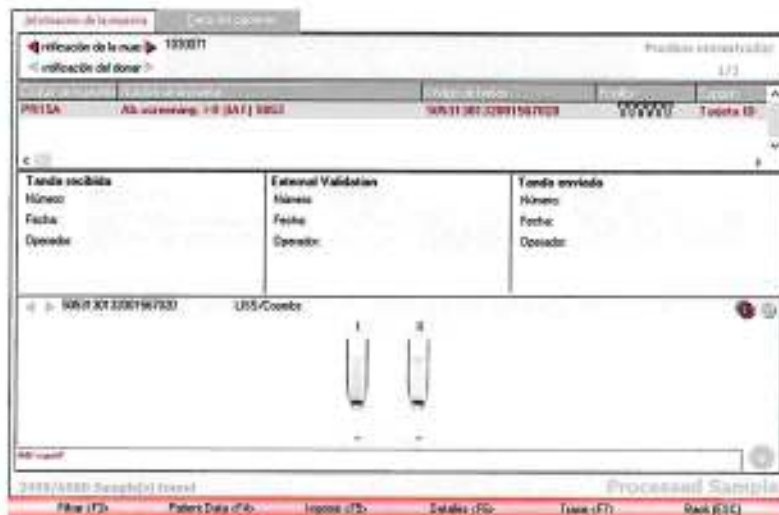
**INSTRUCTIVO
REGISTRO DE RESULTADOS**


Los resultados deben ser registrados en la PLANILLA GRUPOS SANGUINEOS - TCD – TCI – PA o leídos en el equipo saxo, donde queda el respaldo fotográfico.

PLANILLA GRUPOS SANGUINEOS - TCD - TCI - PA

Fecha: _____

Nombre Paciente	N° Peticion	Anti - A	Anti - B	Anti - AB	Anti - O	Du	GR A	GR B	TCD	TCI		PA	Resultado ABOR - TCD - TCI PA
										Cal. I	Cal. B		



	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04
	CARACTERISTICA : APT _r 1.2	Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	Fecha Aprobación: Abril 2021 Fecha Termino Vigencia Abril 2024

Anexo N°4

INSTRUCTIVO DETECCION DE AUTOANTICUERPOS (PRUEBA AUTOLOGA)

Detección de Autoanticuerpos (Prueba Autóloga):

Si los resultados de la detección de aloanticuerpos resulta positiva, se debe descartar el hecho de que se trate de un autoanticuerpo realizando una prueba autóloga (PA). Esta técnica detecta autoanticuerpos presentes en el suero o plasma del paciente, que aglutinan contra sus propias células y en general, por estar dirigido frecuentemente contra antígenos comunes, ante cualquier célula que se le enfrente. Por tanto, para su detección se utilizan los GR de la muestra y el suero o plasma de la misma.

Técnica en gel:


- a) Centrifugar la muestra de sangre total a estudiar
- b) Preparar una suspensión de los GR de la muestra en estudios al 1% en LISS
- c) Rotular 1 columna de un gel de Coombs con la sigla PA y adicionar 50 ul de GR de la muestra en estudio al 1% en LISS
- d) Adicionar 25 ul del suero o plasma en del paciente en estudio
- e) Incubar a 37°C durante 15 minutos, luego centrifugar según lo estandarizado, leer los resultados, interpretar y leer en lector de tarjetas.
- f) Si el resultado es positivo se debe realizar estudios de amplitud térmica

Interpretación de la técnica:

- Resultados negativos indican ausencia de autoanticuerpos
- Resultados positivos en:

En tubo

- Fase salina (CI): Roleaux, aglutininas frías o autoanticuerpos tipo IgM, problemas de Poliaglutinacion (asociado a los GR) y problemas de Panaglutinacion (asociados al suero o plasma)
- Fase 37°C: autoanticuerpos IgM de amplitud térmica.
- Fase SAGH: presencia de autoanticuerpos IgG y/o fracciones del complemento adheridas al glóbulo rojo.

	CODIGO: HSC- UMT-03	Versión: 04
	CARACTERISTICA : APT _r 1.2	Vigencia: 3 años
	PROCOLO DETECCIÓN ANTICUERPOS IRREGULARES	Fecha Aprobación: Abril 2021 Fecha Termino Vigencia Abril 2024

Anexo N°5

INSTRUCTIVO ESTUDIOS DE AMPLITUD TERMICA

Técnica que es útil en la detección e identificación de anticuerpos que se unen a antígenos solo a 37°C, que es la temperatura de importancia clínica. Por tanto, la técnica consiste en realizar las técnicas antes vistas, estrictamente a 37°C.

Muestra:

Suero o plasma del paciente en estudio, mantenido a 37°C en incubador.

Reactivos:

Técnica en gel

Gel de Coombs

LISS

GR OI y OII comerciales.

Técnica.

En gel:

- Incubar a 37°C por 5 a 10 minutos, tubos con una pequeña porción de suero o plasma en estudio, otro con GR OI y OII al 1% en LISS y un gel de Coombs
- Agregar 50 ul de los GR OI y OII al 0.8% en LISS a cada columna del gel de Coombs identificada y luego 25 ul del suero o plasma en estudio sin sacar del incubador.
- Incubar a 37°C por 15 minutos
- Leer rápidamente bajo las condiciones establecidas