



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE BANCO
DE SANGRE Y MEDICINA
TRASFUSIONAL
V SEMESTRE

María del Rosario Osorio Dáguer

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Directora programa de Bacteriología

Rosana de la Torre Barboza

**Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-
Cartagena**

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Elayne Flórez Julio

Eliana Buelvas Pereira

Revisión y corrección de estilo

Zarina Durango Herazo

Autor

María del Rosario Osorio Dáguer



TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN.....	4
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.....	5
PLAN DE TRABAJO.....	7
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES INDISPENSABLES EN LABORATORIO.....	8
PRÁCTICAS N°1. PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES.....	9
PRÁCTICAS N°2. GRUPOS SANGUÍNEOS, SISTEMA ABO.....	12
PRÁCTICAS N°3. DETERMINACIÓN DE RH.....	24
PRÁCTICAS N°4. DETERMINACIÓN DE OTROS SISTEMAS.....	35
PRÁCTICAS N°5. DETERMINACIÓN DE HEMOLISINAS Y AGLUTININAS.....	39
PRÁCTICAS N°6. PRUEBA ANTIGLOBULINA DE COOMBS.....	43
PRÁCTICAS N°7. PRUEBA DE COMPATIBILIDAD.....	49
PRÁCTICAS N°8. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ANTISUEROS.....	52
PRÁCTICAS N°9. AGLUTININAS FRÍAS O CRIOAGLUTININAS.....	57
PRÁCTICAS N°10. RASTREO DE ANTICUERPOS.....	60
BIBLIOGRAFÍA	



PRESENTACIÓN

El Manual de Banco de Sangre y Medicina Transfusional, contiene los elementos técnicos y científicos para la realización de una transfusión segura, cuyo valor terapéutico, salvo por determinadas posturas religiosas, es hoy incuestionable.

En la actualidad la práctica de la medicina transfusional ha sido más controlada y reglamentada por los estamentos gubernamentales a través del decreto 1571 de agosto de 1993 y / o Buenas Prácticas de Manufactura. Es importante que quienes trabajan en las distintas áreas en los bancos de sangre o en lo relacionado con la medicina transfusional posean los conceptos claros sobre las bases de la inmunología y hematología, que estén familiarizados con los más recientes avances que se producen en este campo, lo que lleva a minimizar riesgos que representa la transfusión de la sangre y sus derivados.

Se aplican diferentes estrategias entre las cuales las más importantes: normas de bioseguridad, control de calidad y el desarrollo de los diferentes métodos y técnicas necesarias para brindar a quien lo requiera un producto de calidad, se debe hacer correlación de los resultados y siempre buscar la explicación ante las discrepancias que se puedan presentar.

No se debe olvidar que los estudiantes en este proceso deben evaluarse, crear en ellos esa seguridad, valores éticos y morales, saber guardar el secreto profesional

El profesional de la Bacteriología en el ejercicio de su profesión es una persona capacitada para brindar a las personas una sangre y / o componentes de excelente calidad cuya finalidad es mejorar o lograr una mejor calidad de vida.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

1. Utilizar siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas y gafas etc. Nunca circular con ropa de calle y/o cambiarse de ropa dentro del Laboratorio.
2. Siempre respetar las señalizaciones de Bioseguridad.
3. Reportar siempre a su docente los accidentes ocurridos en el Laboratorio.
4. Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
5. Desechar con precaución Los elementos cortopunzantes como: agujas, lancetas y otros, para evitar lesiones, depositarlos siempre en el guardián.
6. Si padece lesiones exudativas o dermatitis debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
7. Utilice siempre dispositivos de pipeteo mecánico en el manejo de líquidos y reactivos, nunca bucal.
8. Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
9. Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del reactivo al que tenga acceso, conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
10. En caso de derrames neutralice, desinfecte y luego limpie el derrame con un material absorbente.
11. Nunca debe esterilizar material limpio con contaminado.
12. Utilizar adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente, si un equipo se contamina con una muestra



biológica, deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 7% y luego limpiarlo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

13. En caso de rompimiento de un tubo o derrame en la centrifuga apáguela inmediatamente y espere treinta minutos antes de abrirla para evitar la formación de aerosoles.
14. Al inicio y al final de una práctica de laboratorio o después de salpicaduras con sangre u otros líquidos corporales, las superficies de las mesas deberán ser descontaminadas con una solución de hipoclorito de sodio al 7%.
15. Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja.



PLAN DE TRABAJO

1. Antes de cada práctica, lea los procedimientos que se va a realizar y prepare e investigue el significado de las palabras que no conozca, y los aspectos teóricos correspondientes, y los materiales y/o muestras necesarios para la ejecución de la misma.
2. Marque los tubos y muestras del paciente que va a utilizar, lo mismo que identifique las pruebas a realizar.
3. Anote cuidadosamente sus resultados: el o los exámenes de la práctica, no solo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente sino también de sus propias observaciones, investigación y deducciones.
4. Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica.
5. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
6. Asegúrese de marcar adecuadamente las láminas, tubos etc.
7. Practique varias veces el procedimiento y en caso de dudas preguntar a su docente.
8. Anote y/o dibuje todo lo observado y los resultados obtenidos para una mejor realización del informe de laboratorio.
9. Al terminar limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los materiales usados en los sitios destinados para esto. No deje material contaminado en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.
10. Siempre utilice todas las normas de bioseguridad.



**MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES
INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS**

1. Lápiz de Cera o marcador cristalográfico.
2. Colores
3. Guantes desechables.
4. Mascarilla o tapabocas.
5. Gafas de protección.
6. Toalla pequeña
7. Muestra solicitada.
8. Portaobjetos
9. Papel absorbente
10. Guías de laboratorio previamente estudiadas.
11. Folder. Tema y # de la práctica a desarrollar, objetivos, materiales, procedimiento, resultados (Dibujos), conclusión personal y desarrollo de talleres.



PRÁCTICA: N° 1. PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES

I. INTRODUCCIÓN:

En una reacción antígeno anticuerpo es importante un equilibrio cuantitativo entre ambos componentes, para lograr una óptima reactividad. Así se advierte que con un exceso de anticuerpos se podría producir un fenómeno de bloqueo. Con relación al antígeno, es importante señalar que mientras más concentrada es la suspensión, más débil será la reacción, la mayoría de las pruebas, especifican que las suspensiones celulares deben estar entre el 2% al 5%.

II. OBJETIVOS

Objetivo General:

Capacitar al estudiante en la preparación de las diferentes suspensiones, utilizadas en el laboratorio de Banco de Sangre, para desarrollar las diferentes técnicas y garantizar un correcto resultado.

Objetivo Específico:

- ◆ Aplicar correctamente la fórmula en la preparación de las diferentes suspensiones.
- ◆ Identificar los materiales y reactivos utilizados en la práctica.
- ◆ Preparar suspensiones al 2%, 4%, 5%.

III. FUNDAMENTO

La aplicación correcta de la fórmula, permite preparar las suspensiones que se van a utilizar en las diferentes técnicas.



IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

Solución salina 0.9%.

Anti A.

Anti B.

Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.

Serofuge.

Tubos de centrifuga graduados.

Lápiz de cera o cinta de enmascarar.

Pipetas serológicas.

V. MUESTRA

Sangre coagulada o con anticoagulante.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Suspenda la cantidad deseada de sangre en 10 volúmenes de solución salina fisiológica 0.9%.
2. Mezcle suavemente por inversión (no tape el tubo con el dedo), tápelo con caucho o papel parafina.
3. Centrifugue por 1 minuto en la serofuge o en la centrífuga por 10 minutos a 4000 rpm.
4. aspire el sobrenadante, mezcle las células que está lavando.
5. Repita este procedimiento 3 veces.
6. aspire toda la solución salina sobrenadante y transfiera con una pipeta serológica la cantidad de células necesarias para la suspensión deseada al diluyente ya medido.
7. Enjuague la pipeta que uso para transferir, mezclando al mismo tiempo la suspensión.



FÓRMULA:

$$\text{VT: } \frac{\text{Volumen de células obtenidas} \times 100}{\% \text{ de células obtenidas}}$$

Luego: Volumen total – Volumen de células obtenidas = cantidad de solución salina que se debe adicionar.

Ejemplo: Preparar una suspensión al 4%, volumen de células obtenidas 0.1cc.

$$\text{VT: } \frac{0.1 \times 100}{4} = 2.5 \quad \text{de donde } 2.5 - 0.1 = 2.4 \text{ de Solución salina.}$$

Preparación de células A₁, A₂, B, O y AB (comercialmente)

Se toman células de especificidad conocida: A, B, O. que estén “Frescas” máximo de tres días de recolección, que no presente suero icterico, ni lipémico, ni hemolizado.

Se toma una porción: 0.1, 0.5, 1.0 CC según lo que desee preparar.

Se lavan las células 3 veces con solución salina al 0.9%.

Luego calculamos la suspensión.

NOTA: El control de calidad de estas se prueban con el respectivo antisuero. La suspensión debe ser del 2 al 4%.

1.3 Lectura e interpretación de las diferentes aglutinaciones:



4+: Botón sólido de eritrocitos, fondo claro.

3+: Grumo grande y varios muy pequeños o varios grumos grandes, fondo claro.

2+ Varios grumos de tamaño mediano, fondo claro.

1+ Grumos muy pequeños, como arenilla, fondo turbio.

NEGATIVO: ausencia de aglutinación o de grumos es una suspensión Homogénea.

HP Hemólisis parcial.

HT Hemólisis total.

VII. TALLER DE PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES

1. Aplicando la fórmula, como prepararía suspensiones al: 5%, 6%, 3% utilizando diferentes volúmenes de células obtenidas.
2. Que precauciones debe tener usted para la preparación de las células a y b para realizar la prueba inversa de la hemoclasificación.

PRÁCTICA N° 2. GRUPOS SANGUÍNEOS SISTEMA ABO

I. INTRODUCCIÓN

Los marcadores genéticos o carácter somático transmitidos de padres a hijos están representados por sustancias antigénicas localizadas en la membrana del eritrocito. En 1900 Landsteiner hizo público el descubrimiento del sistema de grupos sanguíneos ABO el demostró que los glóbulos rojos contenían por lo menos dos factores, designados como aglutinógenos A y B, con los cuales se podía explicar los cuatro grupos que existían y así postuló que cada persona podía tener uno de ellos A, B o O, el descubrimiento de un hematíe que poseía los dos antígenos A y



B fue publicado por Von Decastello y Stuille en 1902. Estos son producidos por la expresión de genes codominantes ubicados en los cromosomas 9 y el gen H en el cromosoma 19. Los antígenos del sistema ABO al momento del nacimiento no están completamente desarrollados esta se debe por la disminución de la concentración de la transferasa específica y por la carencia del sustrato H, el completo desarrollo de estos se da entre los 2 a 4 años de edad, hasta el fin de los años. Estos antígenos se encuentran localizados en los glóbulos rojos, plaquetas, células epiteliales, células amnióticas y otras sustancias, aunque en mayor cantidad en la membrana del glóbulos rojo.

Los anticuerpos son proteínas globulares que se unen a los antígenos. Estos se encuentran localizados en los macrófagos distribuidos por todo el organismo, se pueden originar por formación genética y por tolerancia inmunológica, estos pueden ser: naturales o salinos son aquellos anticuerpos completos, su estructura es un pentámero, reacciona en cualquier medio, son del tipo de IgM y fijan el complemento. Los inmunes son de tipo IgG, se producen en presencia de antígenos eritrocitarios extraños, puede ser por embarazos, transfusiones etc.

II. OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar los diferentes antígenos localizados en la membrana del hematíe y los anticuerpos presentes en el suero o plasma.

Objetivos Específicos:

- ◆ Identificar los diferentes grupos en base a los fundamentos teóricos.
- ◆ Reportar correctamente el grupo sanguíneo en los registros y al paciente.
- ◆ Identificar el subgrupo A₁ ó A₂.
- ◆ Hacer la correlación de la teoría con la práctica.



DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO O TIPIFICACIÓN ABO DE LOS GLÓBULOS ROJOS Y SUERO EN TUBO

I. FUNDAMENTO

Los antígenos específicos del grupo sanguíneo reaccionan frente a los anticuerpos específicos dando como resultado una reacción de aglutinación, así mismo el plasma y el suero contienen aglutininas naturales que reaccionan con los antígenos presentes en las células de especificidad conocida.

II. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- ◆ Tubos de 10 o 12 x 75 mm.
- ◆ Gradillas.
- ◆ Pipetas Pasteur o de transferencia.
- ◆ Centrífuga serológica o serofuge.
- ◆ Lámparas.
- ◆ Suero comercial anti A mono o policlonal.
- ◆ Suero comercial anti B mono o policlonal.
- ◆ Suero comercial anti AB (opcional).
- ◆ Células A₁, A₂, B y O.

III. MUESTRA

Coagulada o sin anticoagulante, por una adecuada técnica de flebotomía.

IV. PROCEDIMIENTO

1. Marque los tubos de 10 x 75 mm así: A, A₂, (opcional) B, AB a, b.
2. Centrifugue la muestra.
3. Dispense 2 gotas de suero o plasma en estudio a los tubos marcados a y b.



4. Agrego una gota de células (a, b,) previamente preparadas a cada tubo marcado.
5. Haga una suspensión de las células de la muestra en estudio ya sea: con el mismo plasma o realice una suspensión con solución salina en tubo aparte que quede con una concentración del 2 al 4%,
6. Adicione 1 gota de esta suspensión de las células en los tubos A, B, AB y Rh.
7. Agregue 1 gota de cada antisuero en el tubo correspondiente.
8. Dispense 1 gota de solución salina a los tubos marcados A, B, AB.
9. Mezcle suavemente el contenido de cada tubo y centrifugue a 3.400 rpm por 15 segundos.
10. Suavemente re suspender el botón de células para observar la presencia o ausencia de aglutinación contra un fondo blanco bien iluminado.
11. Observe el sobrenadante para evidenciar hemólisis.
12. Leer, interpretar y registrar los resultados en formatos apropiados. Comparar los resultados de la prueba con los obtenidos en el suero. Recuerde la aglutinación informarla por cruces.

LECTURA E INTERPRETACIÓN:

La lectura se realiza observando si se ha presentado en los tubos aglutinación y / o hemólisis.

POSITIVA: Hay presencia de aglutinación o hemólisis o de las dos formas.

NEGATIVA: No hay presencia de aglutinación o de hemólisis.



INTERPRETACIÓN:

GRUPO SANGUINEO	Anti A	Anti B	Anti AB	Células A	Células b	AUTO CONTROL
A	+	-	+	-	+	-
B	-	+	+	+	-	-
AB	+	+	+	-	-	-
O	-	-	-	+	+	-

Resultado e informe:

FECHA	NOMBRE Y APELLIDO	ANTI A	ANTI B	ANTI AB	ANTI D	CEL a	CÉL b	GRUPO SANG.	SUB GRUP O A	VARI ANT Du
FEB 7-05	JAIME ANTONIO PAEZ POLO	3+	3+	3+	2+	0	0	AB POSITIVO		

DISCREPANCIAS ENTRE LA PRUEBA GLOBULAR Y PRUEBA SÉRICA EN EL ABO.

Cuando los resultados entre ambas pruebas no concuerdan, existe discrepancia y esta debe ser investigada.

Las discrepancias en la determinación del sistema ABO son el resultado de:

1. Errores técnicos.
2. Problemas inherentes a las células.
3. Problemas inherentes al suero.



ERRORES TÉCNICOS:

- Material sucio.
- Contaminación bacteriana.
- Contaminación de reactivos. Suero y/o células.
- Proporción incorrecta de la relación células a suero.
- Exceso o falta de centrifugación.
- Falta de adición de reactivos y sueros.
- Uso incorrecto de la temperatura de incubación.
- Pérdida de actividad de los reactivos.
- Empleo inadecuado de reactivos y células.
- Presencia de hemólisis total, no identificada, conduce a lecturas falsas negativas.
- Incorrecta identificación de las muestras, falta de anotación de los resultados.
- Errónea interpretación de los mismos.

PROBLEMAS INHERENTES A LAS CÉLULAS:

- Cuando las células están suspendidas en su propio suero, un exceso de proteínas, presencia de proteínas anormales, gelatina de Wharton (en sangre del cordón), o de macromoléculas que pueden causar la formación de rouleaux, simulan aglutinación.
- Si el paciente es A o B y ha sido transfundido recientemente con glóbulos rojos O.
- El paciente puede presentar problemas de auto-sensibilización marcada y los glóbulos rojos estar fuertemente sensibilizados. Fenómeno de poliaglutinación, causado por defectos genéticos o adquiridos de la membrana de los glóbulos rojos.



- Subgrupos débiles de A o de B.
- En pacientes con infecciones a gérmenes Gram. negativos (E. coli) o con carcinoma de colon, recto, cuello uterino, próstata, pacientes del grupo sanguíneo A, pueden adquirir características de grupo B (antígeno B adquirido).

PROBLEMAS INHERENTES AL SUERO:

- Presencia de anticuerpos irregulares, fríos, que reaccionan con otros antígenos presentes en los hematíes A o B usados en la prueba inversa. Entre los más frecuentes encontrados están: Anti I, Anti A₁ en el suero de personas A₂ y A₂ B, Anti P₁, anti Lea, M, etc.
- En disglobulinemias, debido a la presencia de altas concentraciones de fibrinógeno, de proteínas anormales, o de hipergammaglobulinemias que pueden formar rouleaux.
- Ausencia de anticuerpos o títulos muy bajos de Anti A o Anti B se presentan en: Recién nacidos, lactantes, hipogammaglobulinemias, en ancianos y desnutridos.

SOLUCIÓN A LAS DISCREPANCIAS:

- Repetir el procedimiento.
- Utilizar suspensión de los glóbulos rojos lavados.
- Correr un autocontrol si este es positivo la prueba no es válida.
- Se puede incubar los glóbulos rojos a 4 °C. Hacer un eluido.
- Detectar en los grupos sanguíneos la sustancia A, B, H en saliva siempre y cuando el individuo sea secretor.
- Averiguar la historia clínica del individuo para ver si existe una modificación del antígeno A por acción de la enzima microbiana de acetilasa. (antígeno B adquirido).



MÉTODO EN PLACA O TIPIFICACIÓN ABO DIRECTA

I. Procedimiento:

1. Colocar 1 gota de anti-A en un portaobjeto de vidrio, limpio y rotulado.
2. Colocar 1 gota de anti-B en otro portaobjeto de vidrio limpio y rotulado.
3. Colocar 1 gota de anti-AB en un tercer portaobjeto limpio y rotulado (opcional)
4. Agregar 1 gota de la suspensión de glóbulos rojos en estudio (en solución salina, suero o plasma bien mezclada). Consultar inserto.
5. Mezclar cada preparación con un palillo en un área de 20 x 40 mm aproximadamente.
6. Rotar manualmente cada lámina por 2 minutos, no apoyar en superficie caliente.
7. Leer, interpretar y registrar los resultados de las reacciones en todos los portaobjetos.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

POSITIVO: La aglutinación fuerte de los glóbulos rojos en presencia de cualquier anticuerpo ABO. Las reacciones positivas muestran 3+ de aglutinación

NEGATIVO: La presencia de una suspensión uniforme (o) de glóbulos rojos.

NOTA: Las muestras con reacciones débiles o dudosas deben reevaluarse con un método en tubo.

DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO POR TÉCNICA DE GEL

I. Fundamento:



El principio del método se basa en la técnica de gel descrita por, Y. Lapierre para la detección de las reacciones de aglutinación de los hematíes. La aglutinación se produce al entrar en contacto los eritrocitos con los anticuerpos correspondientes. La tarjeta DG gel es un soporte de plástico constituido por 8 micro túbulos. Cada micro tubo está formado por una columna y una cámara de dispersión/incubación. La tecnología de micro tipificación en gel se basa en la separación por tamaño de los eritrocitos aglutinados, durante un proceso de centrifugación en un gel poroso. Los eritrocitos van perdiendo elasticidad en sus membranas de forma que los aglutinados grandes quedan atrapados en la zona superior y los pequeños quedan distribuidos a lo largo de la columna.

II. Material, reactivo y equipo

- Pipeta automática 10 ul, 50ul, 1 ml.
- Puntas de pipeta desechable.
- Tubos de vidrios.
- DEG sol.
- Centrifugas para tarjetas DG gel.
- Hematíes de reactivos para grupo inverso.
- Placa de gel Reactivo de gel sol.

III. Muestra:

- Células rojas de donador o paciente.

IV. Procedimiento



1. Preparar una suspensión de hematíes al 5 % de DG sol. Asegurar la re suspensión de Isohematíes antes de utilizar. Anadir en cada micro túbulo indicados 10 ul de una suspensión de hematíes al 5%.
2. Determinación del grupo sérico.-homogenizar los hematíes reactivos A1/B- dispersar el microtúbulo N /a1 50 ul de hematíes reactivos A1 en un microtúbulo N/b50 ul de hematíes reactivos B.-añadir suero o plasma.
3. Centrifugar en centrifuga para DG sol.
4. Leer los resultados.

RESULTADOS

NEGATIVO: Banda de hematíes al fondo de la columna, resto de la columna sin aglutinados.

POSITIVO:

+/- Escasos aglutinados de pequeño tamaño de la columna.

1+ Algunos aglutinados pequeños en la columna.

2+aglutinados pequeños en la columna o mediano a lo largo de la columna.

3+Banda superior de aglutinado.

4+Banda de aglutinados en la parte superior de la columna.

DP Doble población (doble banda de hematíes, en el fondo y en la parte superior.

Tarjetas en gel para la hemoclasificación.



PRÁCTICA: SUBGRUPOS DE A:

I. INTRODUCCIÓN:

Las personas cuyo grupo sanguíneo sea A deben realizarles la determinación de los subgrupos de A, debido a que la mayoría de las personas son A₁.

Aproximadamente un 20% de estas personas de los grupos sanguíneos A y AB tienen el A₂, pero pueden presentarse casos de que el individuo no contenga ninguno de los dos antígenos, entonces se dice que es un A débil.

Para la determinación de los subgrupos encontramos las lectinas, son proteínas de los receptores específicos existentes en las plantas (habitualmente en las semillas), y en los animales invertebrados (caracoles, cangrejos) y vertebrados inferiores (huevos de peces), que no siendo anticuerpos actúan como ellos.

Existen numerosas lectinas tales como: *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus*, *Vicia graminia*, *Dolichus biflorus* etc. Tan solo algunos de ellas son útiles para el banco de sangre dentro de estas tenemos: Lectina anti H de *Ulex europaeus* aglutinan los eritrocitos del grupo O.



II. FUNDAMENTO:

La lectina Anti A₁ es preparada de semillas de Dolichus biflorus, esta Lectina aglutina las células A₁ y A₁B, pero no aglutinará células del grupo A₃ ó A₂ B u otros subgrupos de A.

III. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

- Lectina Anti A₁.
- Anti A.
- Solución salina isotónica 0.9%.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Lápiz de cera.
- Goteros de vidrio.

IV. MUESTRA

Sangre coagulada.

V. PROCEDIMIENTO:

Se recomienda leer las instrucciones de las casas comerciales.

1. Prepare una suspensión al 2% en solución salina de los hematíes en estudio, puede lavarlos una vez, o haga una suspensión en su propio suero. (ver inserto)
2. En un tubo de ensayo añada 1 gota de la suspensión de eritrocitos a 1 gota de lectina anti A₁ en un tubo de ensayo de 12 x 75mm debidamente marcado.
3. Mezcle por rotación.



4. Incube de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente, o a 37 °c.
5. Centrifugue por 15 segundos en la serofuge a 3500 rpm.
6. Remueva suavemente los eritrocitos sedimentados.
7. Observe aglutinación macroscópica.

Interpretación:

AGLUTINACIÓN: Es considerado como A₁

NO AGLUTINACIÓN: Es considerado como A₂.

SI EL GRUPO SANGUÍNEO ES AB, SE LE REALIZA LA DETERMINACIÓN DEL SUBGRUPO DE A:

- SI HAY AGLUTINACIÓN SE INFORMA COMO A₁ B
- SI NO HAY AGLUTINACIÓN SE INFORMA COMO A₂B

VI. TALLER DE GRUPOS SANGUÍNEOS

Definir:

Eluido, elución y eluato, es posible presentar ejemplos para una mejor comprensión y correlación.

PRÁCTICA N°3: DETERMINACIÓN DE RH (D).

I. INTRODUCCIÓN:

La existencia del factor Rh fue reconocida por primera vez a través de dos descubrimientos: Levine y Stetson en 1939, encontraron un anticuerpo en el suero de una paciente que tuvo una reacción transfusional hemolítica al transfundirle



sangre de su esposo. La transfusión fue necesaria para compensar la pérdida de sangre debido al parto del niño que nació muerto.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar los diferentes antígenos que se encuentran en la membrana del hematíe utilizando los diferentes reactivos y técnicas propias para tal fin

Objetivos Específico

- Identificar la presencia o ausencia del antígeno D en la membrana del hematíe.
- Adquirir habilidad en el desarrollo de técnica e interpretar los resultados haciendo un análisis de acuerdo a la teoría.
- Reportar los diferentes resultados.

III. MÉTODO O TIPIFICACIÓN RH EN PLACA O PORTAOBJETO

IV. FUNDAMENTO

Los antígenos Rh reaccionan por aglutinación frente a los antisueros específicos. Todas las personas son clasificadas como Rh presente (Rh+) o ausente (Rh -), dependiendo de la presencia o ausencia del antígeno Rh o D en la membrana del glóbulo rojo.

V. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

- Albúmina bovina al 22 – 30%-
- Antisuero Anti RH o D. (ver inserto).
- Placas porta-objetos bien limpios y secos.



- Goteros bien limpios y secos.
- Lápiz de cera.
- Palillos de madera.
- Tubos de ensayo de 12x75 mm.

VI. MUESTRA

Glóbulos rojos procedentes de sangre coagulada, anticoagulada o por punción en estudio.

VII. PROCEDIMIENTO EN PLACA

1. Colocar 1 gota de anti-D en un portaobjeto de vidrio, limpio y rotulado.
2. Colocar 1 gota del reactivo de control en otro portaobjeto (1 gota de albúmina).
3. Agregue 2 gotas de una suspensión de glóbulos rojos en estudio.
4. Mezcle con un palillo de madera.
5. Rotar manualmente la placa, observe por 2 minutos si se presenta o no aglutinación.

NOTA: Se utiliza albúmina bovina para control negativo.

Si la preparación de glóbulos rojos con albúmina al 22% presenta aglutinación, la prueba no se puede interpretar.

La desecación en los bordes de la preparación, no se debe confundir con aglutinación.



INTERPRETACIÓN:

POSITIVO: Aglutinación significa presencia del factor Rh.

NEGATIVO: No aglutinación significa ausencia del factor Rh.

DETERMINACIÓN EN TUBO:

I. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

Albúmina bovina al 22 – 30%-

Antisuero Anti RH o D. (ver inserto).

Lápiz de cera ó marcador de vidrio.

Tubos de ensayo de 12x75 mm.

Serofuge.

Pipetas.

II. MUESTRA:

Glóbulos rojos procedentes de sangre coagulada, anticoagulada o por punción en estudio.

III. Procedimiento

1. Prepare una suspensión de los glóbulos rojos en estudio al 2 – 5 % en su propio suero, plasma (o salina de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial).
2. En dos tubos debidamente identificados y marcados así: Paciente y Control Negativo.
3. Al tubo marcado paciente adicione: 1 gota de Anti D y 1 gota de muestra del paciente.



4. Al tubo marcado Control negativo: 1 gota de Albúmina bovina y 1 gota de sangre del paciente.
5. Mezcle suavemente los tubos.
6. Centrifúgelos por 15 segundos en serofuge.
7. Disgregue suavemente el botón de células rojas sedimentadas.
8. Observe aglutinación con ayuda óptica, registrar los resultados de la prueba y el control.

INTERPRETACIÓN:

POSITIVO: Hay aglutinación presente en el tubo que contiene el antisuero y ausente en el que contiene albúmina.

NEGATIVO: Hay ausencia de aglutinación en ambos tubos.

NOTAS:

1. Dejar los test a temperatura ambiente ó a 37°C por largo tiempo da resultados falsos.
2. Si los resultados son dudosos ó si el control de albúmina es positivo, examine la muestra con solución salina a ver si aglutina, excepto cuando se sospecha de enfermedad hemolítica del recién nacido debido al anti Rh.

DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO DÉBIL O VARIANTE (DU).

I. INTRODUCCIÓN

Los antígenos débiles del antígeno D, son aquellos que no alcanza a desarrollarse, o hay un defecto del antígeno de este sistema. Es primordial que a todas las personas Rh negativas se les realice la prueba, ya que puede tenerla débilmente expresada.



La persona que arroje un resultado Du + se considera dadores Rh positivos pero como receptores Rh negativos.

Esta prueba se determina a:

- Mujeres embarazadas Rh negativo en el primer trimestre de su embarazo.
- Recién nacidos Rh negativos.
- Personas clasificadas Rh negativo donantes o receptores.

II. Fundamento:

El fenotipo puede ocurrir por diversas causas genéticas, que hace que el antígeno Rh_o se manifieste débilmente demandado para su detección una técnica especial.

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPO

- Antisueros:
- Anti Rh.
- Suero anti-humano de Coombs.
- Solución salina 0.9%.
- Albúmina bovina al 22-30%.
- Tubos de ensayo limpios.
- Lápiz de cera, cinta para marcar.
- Goteros.
- Gradillas.
- Serofuge.
- Baño serológico.



IV. MUESTRA

Sangre coagulada o anticoagulada.

V. PROCEDIMIENTO

Si la prueba directa con anti D se realiza en tubo, puede emplearse el mismo tubo, si las instrucciones de la casa comercial así lo señalan. En este caso, si el resultado original es negativo, se procede a partir del paso 6.

1. Marcar dos tubos como D (paciente) y control negativo.
2. Adicionar:
3. Al tubo marcado como paciente (D) 1 gota de Anti D y 1 gota de suspensión de células rojas en estudio (2 – 5%) en solución salina.
4. Al tubo marcado como Control negativo 1 gota de albúmina bovina y 1 gota de células rojas en estudio (2 – 5%) en solución salina.
5. Centrifugar por 15 segundos y leer. Si el resultado es negativo.
6. Incubar a 37°C durante 15 - 30 minutos. Según especificaciones del fabricante.
7. Centrifugar a 3.500 rpm durante 15 segundos.
8. Re suspender suavemente cada botón celular, examine si hay aglutinación con ayuda óptica.
Si hay aglutinación en el tubo de la prueba con anti D y no en el tubo control el resultado es D positivo. Y no realice la fase siguiente con el suero de Coombs.
9. Si el resultado es negativo, (ausencia de aglutinación) o las células muestran una aglutinación dudosa, lávelas 3 o 4 veces con abundante solución salina y decantándola completamente en el último lavado.
10. Adicionar: Suero de Coombs 1 gota a cada tubo.
11. Mezclar y centrifugar 15 segundos.



12. Re suspender suavemente cada botón celular, examinar si hay presencia de aglutinación y anotar el resultado. Si hay aglutinación en el tubo de prueba con anti D, el resultado es D positivo.
13. Si el resultado es negativo, adicione: 1 gota de células sensibilizadas con IgG, a cada tubo.
14. Centrifugar por 15 segundos, se debe observar aglutinación ++, en este punto refleja la presencia de suero antiglobulina libre y confirma que la reacción era realmente Negativa.

NOTAS: Las células control de Coombs son Glóbulos rojos O positivos sensibilizados con Anti-D. Si se presenta aglutinación en cualquier fase de la prueba en el tubo control, no se puede realizar la lectura.

INTERPRETACION:

- Si el test es positivo y el control es negativo, el individuo tiene la expresión débil del antígeno D o variante Du.
- Si el control es positivo el test no tiene valor.
- Si el test y el control son negativos, el donador de sangre puede llamarse Rh negativo.

NOTAS:

- Las personas con la expresión débil del Antígeno D o Du positivo son consideradas como donantes positivos pero como receptores negativos.
- Un paciente con una prueba de Coombs directa positiva puede ser clasificado erróneamente como Du, por eso es necesario ante este caso hacer un control con células que no estén sensibilizadas. Se realiza una prueba de Coombs directa y debe dar negativa.



CAUSAS DE ERROR:

Falsos negativos:

- Demora en leer el resultado.
- Resuspensión las células con fuerza.
- Poca centrifugación.

Falsos positivos:

- No mezclar bien.
- Exceso centrifugación.
- Rouleaux. Hay que distinguir el rouleaux se dispersa con solución salina, cuando existe una aglutinación No se dispersa.

DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS SISTEMA RH (AG C, C, E, E)

I. INTRODUCCIÓN

Los antígenos C, c, E, e, representan el producto de un par de genes alelos. Los individuos que carecen de uno de estos antígenos poseen el alelo en doble dosis, pudiendo ser inmunizados por el antígeno ausente y formar el correspondiente anticuerpo. La transfusión y el embarazo son las vías frecuentes de inmunización y los anticuerpos anti c, anti E y anti e son detectados con relativa frecuencia en forma aislada o en combinación con anticuerpos pertenecientes a otros sistemas. El anti C es un anticuerpo de baja frecuencia en personas Rh positivas.

II. FUNDAMENTO



Detectar los antígenos del CDE en la membrana del hematíe, previene inmunización en los receptores.

III. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

- Anti C.
- Anti E.
- Anti c.
- Anti e.
- Solución salina fisiológica 0.9%.
- Tubo de ensayo de 12x75 mm.
- Lápiz de cera.
- Goteros de vidrio.
- Serofuge.
- Baño serológico.

IV. MUESTRA

Sangre coagulada o anticoagulada lo más fresca posible.

V. PROCEDIMIENTO

1. Prepare una suspensión de células del paciente en solución salina 0.9% al 2 – 4%. (ver inserto).
2. En un tubo de ensayo de 12 x 75 mm, debidamente identificado y marcado de acuerdo al antígeno a investigar (Anti C, c, E, e)

Coloque:

1 gotas del antisuero correspondiente.



1 gota de la suspensión de células 2 – 4% del paciente.

3. Mezcle suavemente y centrifugar por 15 segundos.
4. Observe hemólisis o aglutinación.
5. Gradúe la aglutinación: O, 1 +, 2 +, 3 +, 4 +, si es positiva, el eritrocito posee el Antígeno en cuestión.
6. Incube a 37°C por 15 a 30 minutos en baño serológico (ver inserto) si el resultado es negativo.
7. Centrifugue en serofuge por 15 segundos.
8. Disgregue suavemente el botón celular.
9. Observe aglutinación con ayuda óptica.

INTERPRETACIÓN:

- La aglutinación de los hematíes por el antisuero anti-C, Anti- c, Anti- E, Anti- e. Indica la presencia del antígeno correspondiente en la membrana del glóbulo rojo.
- La no aglutinación de los hematíes por los antisueros mencionados indica la ausencia del antígeno correspondiente.

Ejemplo: se obtuvo el siguiente resultado

¿Cuál sería el fenotipo y genotipo del paciente?

D C c E e

O o + o +

Fenotipo: d c c e e

Genotipo: dce / dce T. de Wiener: rho / rho

VI. TALLER



1. Si usted, después de realizar una tipificación del Rh tiene 2 minutos para la lectura, que puede pasar si la muestra se seca.
2. Porque se considera que en la investigación del antígeno D débil es un Coombs Indirecto. Justifíquelo.

PRÁCTICA 4: DETERMINACIÓN DE OTROS SISTEMAS

I. INTRODUCCIÓN

Además de los antígenos del sistema ABO y Rh, otra gran variedad (aproximadamente 400) pueden ser detectados en la membrana del glóbulo rojo humano, por la estrecha relación entre ellos se han clasificado como sistemas, algunos están presentes en todas las personas se conocen como públicos, otros de baja incidencia son privados. En general, todos han sido reconocidos por el descubrimiento de un anticuerpo producido secundariamente a múltiples transfusiones o embarazos.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer y manejar los conceptos y técnicas que le permitan detectar los diferentes sistemas que se encuentran en la membrana del hematíe ya que pueden estar presentes en las reacciones transfusionales.

Objetivos Específicos

- Identificar los diferentes sistemas.
- Adquirir habilidad en el desarrollo de la técnica.
- Analizar e interpretar los resultados.



III. FUNDAMENTO

Detectar los antígenos de otros sistemas presentes en la membrana del glóbulo rojo cuando adicionamos diferentes antisueros específicos.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPO

- Antisueros: Según la técnica a desarrollar.
- Solución salina 0.9%.
- Albúmina bovina al 22-30%.
- Tubos de ensayo limpios.
- Lápiz de cera, cinta para marcar.
- Goteros.
- Gradillas.
- Serofuge.
- Baño serológico.

V. MUESTRA

Sangre coagulada o anticoagulada.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Antisueros a emplear: Anti Fy^a Anti Fy^b, Anti K, Anti k, Anti Jk^a, Anti Jk^b.
2. En tubos de Khan, adicionar:
3. 2 gotas de cada uno de los antisueros a cada tubo debidamente marcado.
4. 1 gota de eritrocitos lavados y suspendidos del 2 – 4%.
5. Incubar 30 minutos a 37°C.
6. Centrifugar durante 15 segundos, observar aglutinación.



7. Lavar 3 veces con solución salina 0.9%.
8. Decantar muy bien el sobrenadante en el último lavado.
9. Adicionar 2 gotas de suero de Coombs.
10. Centrifugar durante 15 segundos.
11. Observar aglutinación, graduar la aglutinación, si es Positiva el eritrocito posee el Antígeno en cuestión.

NOTA: Para el control de los sistemas Rh, Kell, Kidd y S los eritrocitos deben estar suspendidos en Albúmina 22%.

Antisueros: Anti M, Anti N, Anti S

1. En tubos de Khan adicionar:
2. 2 gotas de cada uno de los antisueros.
3. 1 gota de eritrocitos lavados y suspendidos del 2 – 4%

Antisueros Anti – M y Anti - N

1. Incubar 15 segundos a temperatura ambiente.
2. Centrifugar durante 15 segundos.
3. Observar aglutinación.
4. Graduar la aglutinación, si es Positiva, el eritrocito posee el Ag en cuestión.

Antisueros Anti-S

1. Incubar 30 minutos a 37°C. Centrifugar y observar aglutinación.
2. Lavar tres veces con SS 0.9%, decantar bien el sobrenadante en el último lavado.
3. Adicionar dos gotas de suero de Coombs.
4. Centrifugar 15 segundos.



5. Graduar la aglutinación, si es Positiva, el eritrocito posee el Ag S.

NOTA: Para los antígenos M y N y los sistemas Lewis y P se elabora un control de eritrocitos suspendidos es S.S.

Antisuero Lewis (Ags Le^a, Le^b)

1. Antisueros a usar: Anti – Le^a, Anti – Le^b.
2. En tubos de Khan, adicionar:
3. 2 gotas de cada uno de los Antisueros.
4. 1 gota de eritrocitos lavados y suspendidos del 2 – 4%.
5. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar por 15 segundos.
7. Observar aglutinación. Graduarla, si es positiva, el eritrocito posee el Ag en cuestión.

Antisuero P (Ag P₁)

1. En un tubo de Khan, adicionar:
2. 1 gota de antisuero: Anti – P₁.
3. 1 gota de eritrocitos lavados y suspendidos del 2 – 4%.
4. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar por 15 segundos.
6. Observar aglutinación, graduarla, si es positiva, el eritrocito posee el Antigeno en cuestión.

Antisuero H (Ag H)

1. Lectina a emplear: Anti – H (Ulex europeans).
2. En tubo de Khan, adicionar:
3. 2 gotas de lectina anti – H.



4. 1 gota de eritrocitos lavados y suspendidos del 2 – 4%
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar por 15 segundos.
7. Observar aglutinación, graduarla, si es positiva, el eritrocito posee el Antígeno en cuestión.

PRÁCTICA 5: DETERMINACIÓN DE HEMOLISINAS Y AGLUTININAS.

I. INTRODUCCIÓN

Las hemolisinas son anticuerpos antieritrocitarios que actúan en dos fases: Lisis por frío y calor, se fijan a los glóbulos rojos en frío y producen la hemólisis a 37°C; se les conoce como anticuerpos bifásicos. Esta prueba se le realiza al paciente que ha sido clasificado previamente como O para clasificarlo como donante universal y poder proteger a los receptores A, B, AB que va a recibir sangre del grupo O.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Comprender las orientaciones con el fin de que al detectar en el suero de los donantes la presencia de anticuerpos. Correlacione mejor cada situación que se le presente en su práctica profesional.

Objetivo Específico

- Identifique correctamente la hemólisis en una prueba.
- Correlacione el resultado de las dos pruebas.
- Registre los datos obtenidos.



III. MÉTODO: PRUEBA DE HEMOLISINAS

IV. FUNDAMENTO

Las hemolisinas A y B presentes en el suero del donante reaccionan con los antígenos eritrocitarios A y B necesitando para ello la presencia del complemento que solo existe en el suero fresco sin inactivar y a temperatura de 37°C.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Solución salina isotónica 0.9%
- Células A, suspendidas al 2 – 4% en salina.
- Células B, suspendidas al 2 - 4% en salina.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Serofuge.
- Baño serológico 37°C
- Lápiz de cera.
- Goteros.

VI. MUESTRA

Suero fresco, sin inactivar.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Marque 2 tubos así:
2. a: Adicione al tubo (a) 3 gotas de suero fresco del paciente sin diluir y 2 gotas de células (a) al tubo.
3. b: Adicione al tubo (b) 3 gotas de suero fresco del paciente sin diluir y 2 gotas de células (b) al tubo.
4. Mezcle bien e incube a 37°C de 10 a 15 minutos.



5. Examine el sobrenadante observe si hay hemólisis; Un color rosado o rojo en el sobrenadante indica presencia de hemolisina en el suero.

INTERPRETACIÓN:

Si hay hemólisis en los tubos a o b, la unidad es inadecuada para receptores de grupo sanguíneo, diferente al grupo O.

DETERMINACIÓN DE LAS AGLUTININAS

I. FUNDAMENTO

Las aglutininas presentes en el suero del donante del grupo O reaccionan con los glóbulos rojos específicos que contienen el antígeno produciendo la aglutinación por lo tanto, el contenido de Anti A y Anti B de la sangre de grupo O debe ser menor de 1:50.

II. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Células rojas A frescas.
- Células rojas B frescas.
- Solución salina 0.9%.
- Tubos limpios.
- Lápiz de cera.
- Goteros o pipetas.
- Serofuge.

III. MUESTRA:

Suero o plasma de Grupo O.



IV. PROCEDIMIENTO

1. Prepare una suspensión de los glóbulos rojos a y Glóbulos rojos b al 2% - 4%.
2. Diluya el suero o plasma del grupo O 1:50 en solución salina 0.9% (1 gota de suero del paciente más 49 gotas de solución salina mezcle bien).
3. Marque los tubos de ensayo así:
4. Tubo a: Adicione 2 gotas del suero diluido 1:50 y células a.
5. Tubo b: Adicione 2 gotas del suero diluido 1.50 y células b.
6. Mezcle y centrifugue en serofuge por 15 segundos.
7. Disgregue suavemente el botón celular.
8. Observe si existe aglutinación.

INTERPRETACIÓN:

Positiva: Aglutinación, títulos mayores 1:50 (donante no puede usarse en grupos diferentes de O).

Negativa: No aglutinación, títulos menores de 1:50.

NOTA:

Para que la sangre del grupo sanguíneo O del donante pueda ser transfundida a un recién nacido de grupo A, B, AB el resultado de estas dos pruebas: hemolisinas y aglutininas debe ser negativo.



PRÁCTICA 6: PRUEBA DE ANTIGLOBULINA O DE COOMBS.

I. INTRODUCCIÓN

La prueba de Coombs o de la antiglobulina fue aplicada por primera vez a los procedimientos de determinación de grupos sanguíneos por Coombs, Mourant y Race en 1945.

Los sueros antiglobulina suelen obtenerse inyectando gammaglobulina humana purificada al conejo para obtener suero antiglobulina humana, otros conejos son inyectados con componentes purificados del complemento C3, para producir anticuerpos específicos contra ellos (anti c3 con actividad anti -C3 y contra otros determinantes de C3), dando lugar a distintos tipos de suero antiglobulina humana (SAG). Los poliespecíficos contienen anticuerpos frente a la inmunoglobulina humanas (IgG y a componentes del complemento C3). Los SAG monoespecificos son aquellos que reaccionan frente a un solo anticuerpo.

La prueba de Coombs se utiliza para detectar anticuerpos incompletos tipo IgG, los cuales se adhieren a la superficie del hematíe y a los anticuerpos de las células adyacentes.

II. OBJETIVOS

Objetivo General:

Correlacionar la práctica con la teoría para que comprendan el fundamento de esta prueba que es de mucha utilidad en la EHRN.

Objetivos Específicos:

- Identificar las diferentes fases que comprende la prueba.
- Conocer la utilidad del suero de Coombs.



- Correlacionar la técnica con la teoría.

III. FUNDAMENTO

Los eritrocitos recubiertos con anticuerpos atípicos o irregulares reaccionan por aglutinación frente a suero antiglobulina humano (anti-anticuerpos). El suero de Coombs puede tener además anticuerpos contra otros determinantes antigénicos presentes en ciertos componentes o fracciones que integran el llamado sistema complemento.

IV. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS

- Potenciador.
- Suero antihumano de Coombs.
- Antisuero anti Rh o D.
- Solución salina fisiológica 0.9%
- Células control negativo. (O neg)
- Células control positivo. (O pos)
- Pipetas serológicas de 1cc, 5cc, 0.1cc, 0.2cc.
- Tubos de ensayo de 10x75 o 12x75mm.
- Cinta de enmascarar.
- Serofuge.
- Baño María 37°C.

COOMBS DIRECTO:

I. FUNDAMENTO

Demostrar in vivo la sensibilización de los glóbulos rojos.

II. PROCEDIMIENTO



1. Prepare una suspensión de glóbulos rojos a examinar, lavados 4 veces al 5% en solución salina fisiológica.
2. Marque 3 tubos así:

	Paciente	Control +	Control -
Suspensión de células del paciente	2 gota		
Células O positivas al 2% lavadas		2 gotas	2 gotas
Anti D diluido 1:4 (1gota Rh+3 albúmina)		1 gota	
potenciador o solución salina			1 gota
Suero de Coombs	1 gota	1 gota	1 gota

3. Incube por 15 minutos a 37 °C.
4. Centrifugue.
5. Disgregue el botón y lea macroscópicamente por aglutinación.
6. Si la lectura no da aglutinación, adicionamos 1 gota de células sensibilizadas, centrifugamos y leemos, debe dar positivo ++ la aglutinación.

RESULTADOS:

Aglutinación: Positivo

Ausencia de Aglutinación: Negativo.

INTERPRETACIÓN: Resultados positivos en el paciente nos indica la presencia de Glóbulos rojos “in vivo” con anticuerpos.

NOTA:

Si el Coombs directo es positivo es necesario hacer el procedimiento con un reactivo C3d y otro IgG para saber la causa de la sensibilización.



INDICADO EN:

- En todos los casos de anemia o ictericia del recién nacido.
- Estudio de sangre en los pacientes con anemias hemolíticas.
- Detectar los anticuerpos fijados a la membrana del glóbulo rojo.
- Hemólisis inducida por drogas.
- Reacciones aloinmunes contra eritrocitos recientemente transfundidos.

METODO: Coombs Indirecto

I. FUNDAMENTO

Reacción In vitro, entre un anticuerpo presente en el suero y un antígeno presente en la membrana de unos eritrocitos conocidos.

II. PROCEDIMIENTO

1. Se rotulan 3 tubos

	Paciente	Control +	Control -
Suero del paciente	2 gotas		
Células O positivas al 2% al 4%	2 gotas	2 gotas	
Anti D diluido 1:10 en solución salina 0.9% (1 gota de Anti D + 9 de solución salina)		1 gota	
Células reactivas O negativas al 2%			1 gota
Potenciador			1 gota

2. Mezclar e incubar a 37 °c en baño de María por 30 minutos o menos de acuerdo al potenciador utilizado.



3. Centrifugar por 15 segundos, observar si hay aglutinación o hemólisis, debe estar negativa.
4. lavar 3 o 4 veces con SS 0.9%, decantar bien el sobrenadante en el último lavado.
5. Agregar suero de Coombs 1 gota a cada tubo, incubar por 5 minutos a 37°C.
6. Centrifugar por 15 segundos en la serofuge y leer e informar el resultado.
7. Si el resultado es negativo, añadir a los tubos negativos una gota de células sensibilizadas con IgG, mezclar y centrifugar, debe dar positivo 2+.

RESULTADOS:

Aglutinación: Positivo.

Ausencia de Aglutinación: Negativo.

INTERPRETACIÓN:

Resultados positivos nos indica la presencia de anticuerpo en el suero del paciente.

NOTA: Si la prueba de Coombs directa e indirecta arrojan resultados positivos se debe realizar una cuantificación.

INDICADO EN:

- Detección e identificación de anticuerpos.
- Determinar la presencia de un antígeno específico.
- Cuando los hematíes son de composición antigénica desconocida y en el suero no sabemos si existen anticuerpos inesperados contra los antígenos eritrocitarios.

Células control de Coombs



I. PROCEDIMIENTO

Marcamos un tubo y le adicionamos:

1. 1 gotas de anti D.
2. 5 gotas de solución salina.
3. 5 gotas de células O Rh positiva.
4. Mezcle bien.
5. Incube a 37°C por una hora, agitando cada 15 minutos.
6. Lave de 4 a 5 veces las células decantando completamente la solución salina 0.9% en el último lavado.
7. Prepare una suspensión de las células al 5% con solución salina 0.9%.

Control de las células sensibilizadas con IgG:

Tomamos 1 gota de células sensibilizadas.

1 gota de suero de Coombs.

Centrifugue y lea, debe dar la lectura ++ (2 cruces) de aglutinación.

NOTA:

Estas células sensibilizadas se utilizan siempre que se emplee el Suero de Coombs en una prueba, y el resultado haya sido negativo.

II. TALLER DE ANTIGLOBULINA

1. Analizar el fundamento de la prueba desde la teoría, esquematizarlo.
2. Existe alguna relación de la prueba de antiglobulina directa o indirecta con la expresión débil de Ag D.



3. Como explica usted que a una prueba negativa utilicemos células sensibilizadas y nos dé una prueba.

PRÁCTICA N° 7: PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD

I. INTRODUCCIÓN

Fueron introducidas por Hectoen en 1907 para detectar incompatibilidad ABO. Estudios realizados han permitido conocer mucho mejor los sistemas de grupos sanguíneos e idear nuevos métodos para la detección de anticuerpos. Los estudios preliminares en la selección de sangre para la transfusión son la tipificación ABO y RH y las de tipificación del donante y el receptor por separado. Las pruebas son el estadio final en que los glóbulos rojos del donante y el suero del receptor se prueban directamente juntos en la prueba en tubo en unas condiciones que permitan que los antígenos y el anticuerpo tengan todas las oportunidades razonables de interactuar y producir un resultado demostrable.

Los resultados positivos, es decir, la aglutinación o hemólisis de los hematíes que están reaccionando, indica incompatibilidad, mientras que los resultados negativos indican compatibilidad.

II. OBJETIVOS

Objetivo General:

Comprender y manejar los principios de la técnica y su aplicabilidad en la prueba.

Objetivos Específico

- Analizar el resultado de cada prueba.
- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de la técnica.



- Diferenciar las dos pruebas.

III. MÉTODO: Prueba Cruzada Mayor y Menor

IV. FUNDAMENTO

Los anticuerpos irregulares presentes en el suero del receptor o dador se detectan, por combinación de técnicas poniéndolas a reaccionar in vitro frente a determinantes antigénicos presentes en los glóbulos rojos del dador o del receptor, utilizando varias fases o medios con diferentes temperaturas de incubación.

V. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS

- Potenciador.
- Suero antihumano de Coombs
- Solución salina fisiológica 0.9%
- Pipetas serológicas de 1cc, 5cc, 0.1cc, 0.2cc.
- Tubos de ensayo de 10x75 ó 12x75mm.
- Cinta de enmascarar.
- Gradilla.
- Baño María 37c
- Serofuge.

VI. MUESTRA

Sangre coagulada del receptor y sangre del donante.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Se marcan 3 tubos con marcador y/o cinta de enmascarar preferiblemente.
2. Se prepara suspensiones de glóbulo rojo del donante y receptor.



FASE SALINA

	Prueba mayor > BBB / 2345	Prueba menor < BBB / 2345	Autocontro l BBB / BBB
Suero del paciente	4 gotas de suero		4 gotas
Células rojas del paciente		1 gota de células	1 gota de células
Suero del donante		4 gotas de suero	
Células rojas del donante	1 gota de células		

3. Centrifugue por 15 segundos. Observe presencia de hemólisis, resuspenda suavemente el botón y deslice el contenido por las paredes, en busca de aglutinación, si el resultado es negativo o sea no hay presencia de aglutinación y / o hemólisis se continua con la técnica.

FASE PROTÉICA

4. Agregue 1 gota de albúmina bovina u otro potenciador a cada tubo.
5. Incube por 30 minutos a 37 °C si es albúmina, si es otro potenciador seguir indicaciones de la casa comercial. Lea igual que antes, si el resultado da negativo continúe con la siguiente fase.

FASE DE COOMBS

6. Lave los tubos 4 veces con solución salina al 0.9%, decante en el último lavado todo el sobrenadante. Agregue posteriormente una gota de suero antihumano



de Coombs. Centrifugue 15 segundos a 3.500 rpm. y lea por aglutinación y hemólisis.

7. Si la prueba es negativa adicionar a cada tubo una gota de células sensibilizadas o control de Coombs, observar la aglutinación, debe dar como mínimo 2 +.

INTERPRETACIÓN:

- Aglutinación o Hemólisis: indica Incompatibilidad debido a anticuerpos irregulares.
- No aglutinación o No Hemólisis: Compatibilidad.
- El autocontrol debe ser negativo.

NOTA:

- Si en fase salina observa aglutinación, reconfirme el grupo del dador y del receptor, si son correctos repita la prueba.
- Si en la fase proteica y de Coombs sucede lo mismo, realice prueba de Coombs directa e indirecta.
- Recuerde que solamente se cruza la sangre total, glóbulos rojos y plasma.

VIII. TALLER DE PRUEBAS CRUZADAS

1. De acuerdo a la técnica que se va a desarrollar, usted que haría si observa aglutinación en cada una de las fases.
2. Qué harías si estás trabajando y en una urgencia te toca entregar sangre de urgencia....que alternativas, o determinaciones podrías tomar.

PRÁCTICA N° 8: CONTROL DE CALIDAD DE LOS ANTISUEROS

I. INTRODUCCIÓN



La calidad, en todos los aspectos de la asistencia y los servicios, es el principal objetivo de los Bancos de Sangre. A través de los años muchas actividades diferentes han sido incorporadas a los manuales de procedimientos para asegurar la calidad de la unidad de sangre entera o de componentes, control de calidad de los reactivos, procedimientos de mantenimiento de equipamiento y documentación de investigaciones de errores y accidentes.

II. OBJETIVO

Objetivo General:

Manejar los principios de la técnica y su aplicabilidad en lo referente al control de calidad de los reactivos con el fin de brindar resultados confiables.

Objetivo Específico:

- Analizar el resultado de cada prueba.
- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de la técnica.
- Realizar una inspección visual a los antisueros en busca de precipitados, partículas, formación de gel o hemólisis.

III. MÉTODO: Especificidad

IV. FUNDAMENTO

Es la propiedad por la cual el antisuero produce una reacción fuerte de aglutinación o hemólisis al combinarse con los glóbulos rojos que poseen el antígeno específico.

V. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS

- Anti A.
- Anti B.
- Anti D.



- Anti AB.
- Solución salina 0.9 %
- Tubos de ensayo.
- Gradillas.
- Pipetas.
- Serofuge.
- Baño serológico.

MÉTODO: Anti A y Anti B

I. PROCEDIMIENTO PARA LOS ANTI A Y ANTI B

1. Preparar diluciones 1:32 de cada antisuero (Anti A, Anti B) de la siguiente forma:
31 gota de solución salina 0.9% más una gota del respectivo antisuero.
2. Marcar 4 tubos como: 1, 2, 3, 4. o a/A, a/B, b/A, b/B
3. Adicionar a los tubos marcados 1 y 2 una gota de anti A diluido.
4. Adicionar a los tubos marcados 3 y 4 una gota de anti B diluido.
5. Adicionar a los tubos 1 y 3 dos gotas de células a reactivas.
6. Adicionar a los tubos 2 y 4 dos gotas de células b reactivas.
7. Incubar 5 minutos a 37°C, centrifugar por 15 segundos y leer por aglutinación o hemólisis.

INTERPRETACIÓN:

- Aglutinación o Hemólisis: positivo.
- No aglutinación o no hemólisis: negativo.
- Deben dar positivos los tubos marcados: 1 (a/A) y 4 (b/B).

NOTA:



- Si no se presenta aglutinación o hemólisis en los tubos 1 y 4 debe repetir la prueba.
- Verifique que las células utilizadas son las correctas. Al igual que los reactivos diluidos corresponden a los adicionados en cada uno de los tubos.

Especificidad del anti D

a. Procedimiento

1. Preparar una dilución del Anti D 1:10 (1 gota de Anti D más 9 gotas de albúmina).
2. Preparar células reactivas O positivas y O negativas al 4%.
3. Marcar dos tubos como: control positivo y control negativo.
4. Adicionar al tubo marcado como Control positivo 1 gota de células reactivas O positivas.
5. Adicionar al tubo marcado como Control negativo 1 gota de células reactivas O negativo.
6. Luego adicionar a cada tubo 1 gota de Anti D diluido.
7. incubar a 37 °c por 5 minutos, centrifugar por 15 segundos y leer.

INTERPRETACIÓN:

- Aglutinación: positivo.
- No aglutinación: negativo.
- Control Positivo: debe dar positivo.

NOTA:

- Si no se presenta aglutinación en tubo Control positivo se debe repetir la prueba.



- Verifique que las células utilizadas son las correctas.

Avidez

II. Fundamento

Es la velocidad en la cual un anticuerpo aglutina cuando se une a un antígeno.

Es el tiempo comprendido desde que se mezclan el antisuero y las células hasta que la aglutinación se observa con claridad.

La avides depende de:

- De la fuerza antigénica de los glóbulos rojos.
- Temperatura.
- Concentración de las suspensiones de los glóbulos rojos.

III. Procedimiento:

Realizar hemoclasificaciones directas en lámina a las células A, B y determinar el tiempo en que tarda en aparecer la aglutinación.

Potencia

Se mide como la fuerza del anticuerpo en el reactivo, para esto se realiza una titulación y la definimos como el proceso por el cual se determina la concentración de un antisuero.

I. Procedimiento:

1. Marcar 10 tubos así: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512.
2. Agregar en todos los tubos excepto el primero cincuenta ul de solución salina.
3. Adicionar al primero y al segundo cincuenta ul de antisuero al que se le va a medir la potencia. (Anti A, Anti B, Anti D).
4. Utilizando la pipeta pasar cincuenta ul del segundo tubo al tercero, luego del ul



5. Adicionar células reactivas al 4% que contengan el antígeno correspondiente. (células A, B, Rh positivas)
6. Mezclar cada tubo y centrifugar por 15 – 30 segundos.
7. Al terminar la centrifugación observar el sobrenadante para ver la presencia de hemólisis.
8. Re suspender los botones celulares y observar aglutinación.
9. Informar hasta la dilución en que se observe aglutinación.

INTERPRETACIÓN

POSITIVO: Aglutinación y / o hemólisis

NEGATIVO: Una suspensión uniforme de glóbulos rojos.

NOTA:

El límite aceptable para el Anti A y Anti B es de 1 / 256, para Anti D es 1 / 128.

PRÁCTICA N° 9: AGLUTININAS FRÍAS O CRIOAGLUTININAS

I. INTRODUCCIÓN

Algunos anticuerpos reaccionan más eficientemente con los antígenos eritrocitarios a temperaturas menores de 32°C, por lo cual son denominados anticuerpos fríos. Autoanticuerpos de esta categoría se pueden producir en dos síndromes clínicos, los cuales se identifican según las propiedades funcionales del autoanticuerpo envuelto. Ellos son: el síndrome de anticuerpos fríos y la hemoglobinuria paroxística al frío.

II. OBJETIVOS



Objetivo General

Manejar el principio básico de la prueba y su aplicabilidad en la práctica profesional.

Objetivos Específicos

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de la técnica.
- Analizar el resultado de cada prueba.

III. FUNDAMENTO

Determinar la presencia de anticuerpos fríos en la muestra de sangre de una persona.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Solución salina 0.9%
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Lápiz, marcador o cinta para enmascarar.
- Pipetas serológicas de 0.1 ml
- Pipetas serológicas de 0.2 m.m
- Hielo, agua fría.

V. MUESTRA

Sangre coagulada.

VI. PROCEDIMIENTO CUALITATIVO

1. Separe los glóbulos rojos del suero, de la muestra a examinar.
2. Lave los glóbulos rojos 3 veces con solución salina isotónica y suspéndalo al 4% también en solución salina 0.9%
3. En tubo de ensayo de 12 x 75 m.m. coloque dos gotas de suero a examinar.



4. Agregue dos gotas de la suspensión glóbulos rojos de la misma muestra.
5. Enfríelos por una hora en nevera a temperatura entre 4° - 10°c
6. Centrifúgelos en la serofuge por 15 segundos.
7. Disgregue suavemente el botón celular y lea por aglutinación, con ayuda óptica.

RESULTADOS:

AGLUTINACIÓN: Presencia de aglutininas frías.

NO AGLUTINACIÓN: Ausencia de aglutininas frías.

NOTA:

- Si el resultado nos indica que no hay presencia de aglutininas frías, el enfriamiento se prolonga por 24 horas y se sigue igual que con los pasos 6 y 7.
- Si el resultado nos indica la presencia de aglutininas frías, hay que cuantificarlas.

VII. PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO

1. Marcar 10 tubos así: 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512.
2. Agregar en todos los tubos excepto el primero 0.1 ul de solución salina.
3. Adicionar al primero (1) y al segundo (1/2), 0.1 ul de suero al que se va a examinar.
3. Utilizando la pipeta pasar 0.1 ul del segundo tubo al tercero, luego del tercero al cuarto y así sucesivamente hasta el tubo número diez.
4. Adicionar 0.1 ul de las células o suspensión de glóbulos rojos, de la misma muestra.
5. Continúe con los pasos 5, 6 y 7 de la técnica cualitativa.
6. La lectura se hace del último tubo al primero.



7. Observe la máxima dilución en que haya aglutinación, informando positiva hasta la dilución tal.

NOTA:

- Si hay aglutinación en el tubo 1 / 256, debe repetirse la prueba con doble cantidad de tubos.

INTERPRETACIÓN:

- Títulos inferiores a 32 no tienen significado clínico.
- Pacientes con anemia hemolítica por anticuerpos fríos (títulos de 128 y hasta 500.000).

VIII. TALLER CRIOAGLUTININAS

1. Investigar enfermedades asociadas a anticuerpos fríos.

PRÁCTICA N°10: RASTREO DE ANTICUERPOS IRREGULARES (RAI)

I. INTRODUCCIÓN

Los aloanticuerpos inesperados son anticuerpos (diferentes a los anti A o anti B) que reaccionan con antígenos que están ausentes de la membrana de los hematíes del individuo que los produce.

La producción de estos anticuerpos por parte del individuo ocurre por la isoimmunización con hematíes (que posee el o los antígenos) a través de embarazos o transfusiones.



La normatividad en Colombia para los bancos de sangre establece que se debe investigar la presencia de anticuerpos inesperados en el suero de todos los donantes y receptores de sangre.

II. OBJETIVO

Objetivo General

Manejar el principio básico de la prueba y su aplicabilidad en la práctica profesional.

Objetivo Específico

- Analizar el resultado de la prueba.
- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de la técnica.
- Realizar una inspección visual a los antisueros en busca de precipitados, partículas, formación de gel o hemólisis.

III. FUNDAMENTO

El principio de la prueba se basa en la capacidad del suero del individuo de aglutinar y / o hemolizar células cuya composición antigénica es conocida en cuanto a los antígenos más importantes en inmunohematología..

IV. REACTIVO, MATERIALES Y EQUIPOS

- Células pantalla I y II.
- Albúmina bovina al 22% u otro potenciador.
- Suero antiglobulina poliespecífico.
- Células sensibilizadas o control de Coombs.
- Solución salina fisiológica 0.9%.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 m.m.
- Lápiz, marcador o cinta para enmascarar.



- Pipetas serológicas de 0.1 ml.
- Pipetas serológicas de 0.2 ml.

V. MUESTRA

Sangre fresca coagulada: Suero del paciente.

VI. PROCEDIMIENTO

Seguir las instrucciones de la casa comercial que vienen en los insertos de la técnica.

RESULTADOS:

AGLUTINACIÓN O HEMOLISIS: positiva.

NO AGLUTINACIÓN: negativa.

INTERPRETACIÓN

- La aglutinación de las células I Y II en cualquier fase o la hemólisis en las fases de salina o potenciador indica la presencia de anticuerpos inesperados en el suero analizado.
- La ausencia de aglutinación o hemólisis en todas las fases de la prueba indica que el suero investigado no posee anticuerpos inesperados detectables contra los antígenos presentes en las células pantallas I y II.

FALSOS NEGATIVOS

- Inadecuado almacenamiento de los reactivos o las muestras.
- Inadecuado tiempo y temperatura de incubación.
- Disminuir la relación suero / células (2 a 1).



- Demora en la interpretación o en los lavados puede ocasionar que el anticuerpo se disocie del antígeno.

FALSOS POSITIVOS O NEGATIVOS

- Contaminación bacteriana, química, o de otra índole de las muestra y / o reactivos utilizados en la prueba.
- Inadecuado tiempo y velocidad de centrifugación.

FALSOS POSITIVOS

- Cuando en el suero de la persona se encuentren presentes anticuerpos contra los elementos preservantes de las células.

GUÍA DE TRABAJO EN EL LABORATORIO RESOLVERLA EN LAS DIFERENTES PRÁCTICAS Y CONSIGNARLA EN SU PORTAFOLIO

OBJETIVO GENERAL:

Brindar al estudiante un espacio de análisis para que describa de manera coherente los inconvenientes, debilidades y fortalezas encontrados en la práctica del laboratorio, de igual forma los aportes que esta le brinda a su conocimiento y en su quehacer diario como profesional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ◆ Buscar solución oportuna a los inconvenientes encontrados en cada práctica.



- ◆ Analizar los resultados obtenidos y hacer una correlación clínica.
- ◆ Realizar el informe escrito de cada práctica realizada en su portafolio.

ANALICE Y RESPONDA

- 1- ¿Considera usted que esta Práctica le servirá de apoyo diagnóstico? Por qué.
- 2- ¿Qué discrepancia y/o falsos positivos y falsos negativos pudieron intervenir en la realización de la técnica? Menciónelos. ¿Cómo podría corregirlo, explíquelo?
- 3- De acuerdo a los resultados obtenidos en su práctica haga su interpretación y correlación clínica.
- 4- Usted como futuro bacteriólogo considera que se debe mejorar algún aporte para la realización de la práctica en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

DUEÑAS, Rivera Víctor Hugo. El Banco de Sangre. Primera edición, Universidad del Valle. 2003.

Decreto 1571 de agosto 1993, Sangre segura, Instituto Nacional de Salud. Y Buenas Practicas de manufacturas.

ROJAS, William. Inmunología, 13^a edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. 2004.

GOLDSBY, Richard y otros. Inmunología. 5^a edición. McGraw Hill. México 2004.



McKENZIE, Shrllyn B. Hematología clínica, segunda edición, Manual Moderno, México. 2000.

WOOD, Marie E. Secretos de Hematología y Oncología, segunda edición, McGraw-Hill, México. 2000.

Cortez, B. Armando “ABC de la Medicina Transfusional”, Editorial Universidad del Valle 2000.

Cortez, B. Armando “Mejoramiento de la calidad en bancos de sangre”, Editorial Universidad del Valle 2002.

Cortez, B. Armando “ISO 9000 y buenas prácticas de manufacturación en bancos de sangre”, Editorial Universidad del Valle 2001..

Manual Técnico de Bancos de Sangre AABB 12ª edición 2003 traducción al español.

Revista Medicina Transfusional “Al Día” (ACOBASMET). Volumen, 1, 2, 3,4 año 2016.

Rodríguez Moyado H, Quintanar García E. Mejía Arregui M. El banco de sangre y la medicina transfusional. Editorial Panamericana 2004.

<https://www.minsalud.gov.co/...Nuevo/DECRETO%20%201571%20DE%201993.pdf>



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 1319

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

