DISTRIBUCIÓN:	
DEPARTAMENTO	**RESPONSABLE**
Dirección	Jefe de la Unidad de Calidad
Hematología	Jefe de la Unidad de Hematología
Enfermería	Coordinadora de Enfermería

SUMARIO DE MODIFICACIONES		
REVISIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
A	29/01/07	Primera edición

PREPARADO	REVISADO Y APROBADO
Nombre: Marga Alcover Cargo: Coordinadora de Enfermería Fecha: 29/01/07	Nombre: Joan Bargay Cargo: Jefe de Unidad de Hematología Fecha: 29/01/07

La documentación del Sistema de Gestión de la Calidad se encuentra en la Intranet de Hospital Son Llàtzer. Existe una única copia papel autorizada y controlada en poder del Coordinador de Calidad, por lo que cualquier otro documento papel se considerará copia no controlada.

1 Técnica en tubo:

(método en Liss/Coombs)

MATERIAL: tubos de hemólisis (12 x 75 mm)
Pipetas Pasteur
Baño maria o incubador a 37ºC
Centrífuga de inmunohematología

MUESTRA: suero o plasma

REACTIVOS: panel comercial de hematíes de fenotipo conocido en suspensión al 3% (se recomienda un mínimo de tres células distintas) (p.e. *Surgiscreen* de Ortho Diagnostic)
Solución de bajo contenido iónico (Liss) potenciadora de anticuerpos
Solución salina isotónica
Antiglobulina humana (IgG + C3d) poliespecífica (suele estar coloreada en verde)
Hematíes Coombs-control

PROCEDIMIENTO

1. Se rotulan tres tubos de hemólisis con las iniciales del paciente y los números 1, 2 y 3, respectivamente.

2. Usando una pipeta Pasteur depositar en cada tubo **2 gotas del suero** o plasma del paciente.

3. Añadir a cada tubo **1 gota de la suspensión de hematíes** correspondiente (1, 2 y 3).

4. Añadir a cada tubo la **solución Liss potenciadora** de anticuerpos en la proporción recomendada por cada casa comercial:
   2 gotas si se usa marca Ortho
   4 gotas si se usa marca Biotest

5. **Incubar** a 37 ºC durante **10 minutos.**

6. **Centrifugar** los tres tubos **1 minuto** (1.000 r.p.m.).

7. Observar posible hemólisis (resultado positivo)

8. **Lectura:** Resuspender las células mediante una agitación suave y examinar la presencia de aglutinación (ver lectura de aglutinación en tubo). (resultado positivo).

Si el resultado es negativo proseguir:

9. **Lavar los hematíes por 4 veces** con solución salina isotónica, centrifugando cada vez un mínimo de 2 minutos. Decantar completamente el sobrenadante tras el último lavado.

10. Añadir a cada tubo **2 gotas de antiglobulina humana** .

11. Mezclar y **centrifugar 1 minuto**.

12. **Lectura**: Resuspender las células mediante una agitación suave y examinar la presencia de aglutinación (ver lectura de aglutinación en tubo). (resultado positivo).
Si el resultado es negativo proseguir:

13. A todos los tubos con resultado negativo (ausencia de aglutinación) añadir **1 gota de hematíes control-Coombs**.

14. Mezclar y **centrifugar 1 minuto**.

15. **Lectura:** Comprobar que se ha producido aglutinación. Una ausencia de hemaglutinación con los hematíes control-Coombs invalida la prueba. (ver más adelante posibles causas).

16. Anotar los resultados en la *Hoja de Trabajo.*

INTERPRETACIÓN

1. El escrutinio es negativo si:
   1) no existe hemólisis en el paso 7
   2) no existe aglutinación en paso 8
   3) no existe aglutinación en paso 12
   4) se produce aglutinación en paso15

2. La falta de aglutinación en el paso 15 obliga a repetir la prueba. Ello puede ocurrir por no haberse añadido la antiglobulina en el paso 10 o por no haberse efectuado correctamente los lavados del paso 9.
3. Al anotar los resultados positivos debe indicarse la intensidad de la aglutinación (4, 3, 2 o 1 cruz)
4. En caso de escrutinio positivo anotar también los resultados en una de las Hojas de Fenotipos que acompañan al panel eritrocitario
5. Todo escrutinio positivo obliga a realizar una *Identificación de anticuerpos* (consultar ficha correspondiente)
6. En caso de aglutinación en los tres tubos realizar un autocontrol (repetir el procedimiento usando suspensión al 3% de hematíes del paciente) y una investigación de *Crioaglutininas* (consultar ficha correspondiente).

OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS

- Las recomendaciones 1, 3, 5 y 6 de la Técnica en gel son aplicables también a la técnica en tubo.
- Para la lectura puede ayudarse de una lupa o del microscopio óptico (objetivo x4 o x 10 = 40 o 100 aumentos)

2 Técnica en gel:

DEFINICION

Se determina la presencia o ausencia de los antígenos de los sistemas de grupo sanguíneo: Kell, Duffy, Lewis, etc… en la superficie de los hematíes del paciente.

MATERIAL: pipeta automática de 25 lambdas.
Incubador para tarjetas de gel.
Centrífuga para tarjetas de gel.

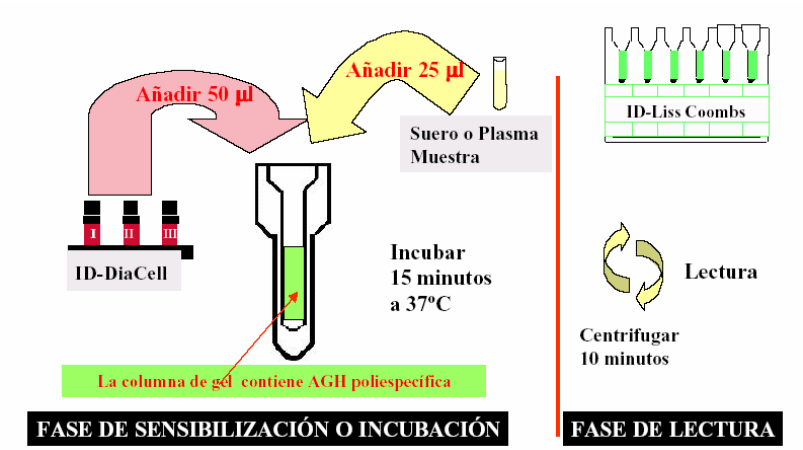
MUESTRA: suero o plasma

REACTIVOS: tarjeta Liss/Coombs de Dia-Med*:* microcolumnas I-II, III.
Panel eritrocitario *Dia-Med* (hematíes en suspensión al 0,8%)
Viales I-II-III: hematíes sin tratar

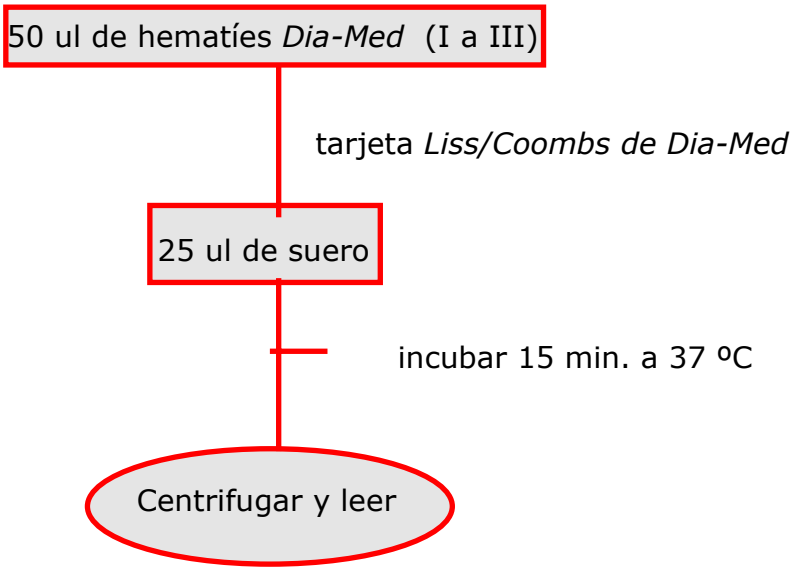
PROCEDIMIENTO

1. Rotular una tarjeta Liss/Coombs de Dia-Med con los datos del paciente.
Destapar los tres pocillos.
2. Depositar 50 lambdas (1 gota) de cada vial de hematíes del panel eritrocitario, en el pocillo correspondiente de la tarjeta (del I al VI).
3. Añadir a cada pocillo **25 lambdas** del suero o plasma de la sangre a investigar.
4. Incubar durante 15 minutos a 37 ºC en la incubadora DiaMed.
5. Centrifugar durante 10 minutos.
6. Leer los resultados y anotarlos en la *Hoja de Trabajo*.

(Ver ficha de lectura de resultados en tarjetas DiaMed)



	P. COOMBS INDIRECTO a 37 °C		P. ENZIMÁTICA (papaina) a 37 °C	
Resuspender los hematíes	Células I - II - III		Células Ip - IIp - III p	
	Identificar correctamente los microtubos.			
Añadir los hematíes al microtubo	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
	+	+	+	+
Añadir suero o plasma	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Incubar 15 minutos	a 37ºC			
	Centrifugar 10 minutos			
	Leer			



INTEPRETACIÓN

1. Prestar atención a la posible presencia de hemólisis en el sobrenadante (falso negativo)
2. En caso de aparecer reacción positiva en alguno de los microtubos debe anotarse la intensidad (en número de cruces) en la casilla correspondiente de la *Hoja de Trabajo* (ver la ficha de lectura de tarjetas DiaMed).
3. En caso de reacción positiva deben también anotarse los resultados en una de las hojas de fenotipos que acompañan al panel eritrocitario. Anotar también el nombre, grupo sanguíneo del paciente y fecha.
4. Toda prueba positiva obliga a la realización de una Identificación de anticuerpos.

OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS

1. Dejar que todas las muestras y reactivos adquieran la temperatura ambiente antes de ser usados.
2. Es aconsejable preincubar las tarjetas a 37ºC antes de ser usadas.
3. Homogenizar las suspensiones de hematíes antes de utilizarlas (invertir los frascos varias veces y vaciar-llenar la pipeta incorporada al tapón)
4. Dispensar el suero mediante la pipeta-dispensadora DiaMed, apoyando la punta en la pared del pocillo para añadir la muestra.
5. Para la obtención del suero el coagulo debe estar bién centrifugado (mínimo 10 minutos a 3.000 r.p.m.).
6. La muestra de plasma o suero debe ser reciente. Si se conserva en nevera a 2-8ºC puede demorarse hasta 48 horas. Si va a transcurrir más tiempo entre la extracción de la muestra y la realización del escrutinio se recomienda mantenerla congelada a -20ºC.