



ASESORÍA JURÍDICA
BFV/PNB/RNU

1

APRUEBA RECOMENDACIONES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES ERITROCITARIOS, ELABORADO POR EL DEPARTAMENTO LABORATORIO BIOMÉDICO NACIONAL Y DE REFERENCIA. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE.

RESOLUCIÓN EXENTA N° 3270 18/12/2014

Santiago,

VISTOS: la providencia núm. 2579, de 19 de noviembre de 2014, de Jefa de Asesoría Jurídica; la providencia núm. 2619, de 17 de noviembre de 2014, de la Dirección de este Instituto; el memorándum núm. 66, de 10 de noviembre de 2014, del Departamento Laboratorios Biomédico Nacional y de Referencia y **TENIENDO PRESENTE:** lo dispuesto en la Ley Orgánica Constitucional de Bases Generales de la Administración del Estado; en la Ley Núm. 19.880, que establece bases de los procedimientos administrativos que rigen los actos de los órganos de la Administración del Estado; en los artículos 60 y 61 letra a) del Decreto con Fuerza de Ley Núm. 1, de 2005, que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado del Decreto Ley Núm. 2.763, de 1979 y de las Leyes Núm. 18.933 y Núm. 18.469; en el artículo 10 letra a) del Decreto Supremo Núm. 1.222, de 1996, de la misma Secretaría de Estado, que aprueba el Reglamento del Instituto de Salud Pública de Chile; en el Decreto Supremo Núm. 607 de 2014, del Ministerio de Salud; así como lo establecido en la Resolución Núm. 1.600, de 2008, de la Contraloría General de la República; y

CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que, a partir del X Taller Nacional para Centros de Sangre y Unidades de Medicina Transfusional, realizado en mayo de 2013 en el Instituto de Salud Pública de Chile, se recogieron las opiniones y sugerencias de los participantes, elaborándose en consecuencia, "recomendaciones para el procedimiento de detección e identificación de anticuerpos irregulares", las cuales fueron consensuadas con el Comité de Expertos PEEC del área de Inmunohematología, y están dirigidas a los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos.

SEGUNDO: Que, este documento entregará las directrices para la realización de una correcta detección e identificación de anticuerpos irregulares, a fin de contribuir a asegurar la calidad de estos estudios inmunohematológicos en cada institución.

TERCERO: Que, en consecuencia, y en mérito de lo expuesto, dicto la siguiente:

RESOLUCION:

1º APRUÉBANSE las **Recomendaciones Para La Detección E Identificación De Anticuerpos Irregulares Eritrocitarios**, elaboradas por el Departamento Laboratorios Biomédico Nacional y de Referencia del Instituto de Salud Pública de Chile, cuyo tenor es el siguiente:

OBJETIVO

El objetivo de estas recomendaciones es disponer de una metodología para la detección e identificación de anticuerpos irregulares contra antígenos eritrocitarios que contribuya a la obtención de resultados confiables y reproducibles.

ALCANCE

Estas recomendaciones aplican a los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos que realizan detección con o sin identificación de anticuerpos irregulares eritrocitarios en la sangre de donantes, pacientes y embarazadas.

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos irregulares corresponden a aquellos anticuerpos distintos a los anticuerpos naturales del sistema ABO, que pueden aparecer en respuesta a la exposición a un antígeno eritrocitario extraño (transfusión o trasplante), por incompatibilidad materno-fetal o sin un estímulo identificable. En algunos casos, su presencia se asocia a la exposición a antígenos ambientales, bacterianos o virales de características bioquímicas similares a los antígenos eritrocitarios. En nuestro país, los anticuerpos irregulares más frecuentemente encontrados en donantes de sangre son: anti-Le^a, anti-K y anti-E, mientras que en pacientes son: anti-D, anti-E y anti-K. Todos estos anticuerpos son capaces de provocar hemólisis *in vivo* y acortamiento en la sobrevivencia normal de los glóbulos rojos (Anexo 1).

La heterogeneidad de los anticuerpos, en cuanto a su tipo, clase de inmunoglobulina, temperatura de reacción, tipo de

hemólisis asociada, su capacidad de activar complemento, entre otras características, hacen que la pesquisa e identificación de ellos, deba hacerse de una manera estandarizada y controlada. La detección e identificación de anticuerpos irregulares habitualmente se realiza mediante técnicas de aglutinación en tubo, en columna o en microplaca, con etapas a temperatura ambiente, 37°C y antiglobulina humana. En algunas ocasiones y de acuerdo a condiciones observadas en cada laboratorio, se puede realizar análisis a 4°C frente a la sospecha de crioaglutininas. Cuando se detecta la presencia de un aloanticuerpo, se debe determinar su especificidad mediante la identificación y la consiguiente deducción de su significado clínico, empleando un enfoque sistemático descrito en el algoritmo (Anexo 2).

ABREVIACIONES Y DEFINICIONES

a) Abreviaciones:

- ACD: Ácido cítrico, citrato, dextrosa.
- CE: Comunidad Europea
- CI: Centrifugación Inmediata
- EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.
- FDA: Food and Drug Administration
- GR: Glóbulos Rojos
- LISS: Solución de Baja Fuerza Iónica
- NISS: Solución Salina de fuerza iónica normal
- PA: Prueba Autóloga
- PBS: buffer fosfato salino pH 6.9 a 7.2
- SAGH: Suero Antiglobulina Humana
- TAD: Test Antiglobulina Humana Directa
- TAI: Test Antiglobulina Humana Indirecta

b) Definición de conceptos

- Aloanticuerpo: anticuerpo producido en un individuo que está dirigido contra antígenos eritrocitarios que él carece, presentes en otro individuo de su misma especie.
- Autoanticuerpo: anticuerpo producido en un individuo que está dirigido contra antígenos que expresan sus propios eritrocitos.
- Identificación básica de anticuerpos irregulares: procedimiento del laboratorio de inmunohematología que permite identificar la especificidad de la mayoría de los anticuerpos eritrocitarios de importancia clínica, detectados en el TAI. Involucra el uso de células panel de identificación básico y técnico con potenciadores de reacción (suero antiglobulina humana poliespecífico y solución LISS), que permiten determinar la especificidad de anticuerpos únicos o algunas mezclas de anticuerpos.

DESARROLLO

I. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

a) Muestras

Suero o plasma obtenido a partir de sangre total sin o con anticoagulante (EDTA, ACD), respectivamente, de acuerdo a las especificaciones del fabricante del método o reactivo que utiliza. El uso de plasma podría impedir la detección de anticuerpos irregulares que se revelan solamente por la presencia de complemento adherido a los eritrocitos. Para estudios automatizados se requiere plasma y en tests manuales es deseable el uso de suero. Las muestras para estudio deben ser almacenadas a 4°C y las pruebas deben ser realizadas en el menor tiempo posible, no excediendo las 72 horas desde su obtención.

b) Reactivos

- Células Panel para detección de anticuerpos irregulares: sets comerciales de 2 o 3 frascos y en concentración adecuada para cada tipo de técnica. Ej. Tubo: 2-4%, Columna: 0,8-1%. Estas células deben tener certificación de fabricación ISO 13485 o estar aprobadas por organismos (FDA, CE), sobre su capacidad de detectar anticuerpos clínicamente significativos, debiendo expresar al menos los siguientes antígenos: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Le^a, Le^b, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a y Jk^b. El laboratorio debiese disponer de reactivos con expresiones homocigotas para los antígenos D, C, E, S, s, Fy^a, Fy^b, Jk^a y Jk^b.
- En los sets de dos células, uno de los frascos debe ser R1/R1 y el otro R2/R2, en los sets de tres células, el tercero debe ser r/r.
- Suero Antiglobulina Humana: tipo poliespecífico, apropiado para cada tipo de técnica (incorporado en los sistemas de aglutinación en columna o en presentaciones para su utilización en tubos).
- LISS: de acuerdo a la estandarización del reactivo o a las recomendaciones del fabricante (incorporado en los sistemas de aglutinación en columna o en presentaciones para su utilización en tubos).
- Suero AB inerte: plasma convertido en suero y calentado a 56°C por 1 hora.
- Suero fisiológico tamponado, PBS o solución diluyente recomendada para la técnica utilizada.

c) Técnicas

Los métodos de detección disponible son: hemaglutinación en tubo, adhesión de eritrocitos en fase sólida (microplaca) y hemaglutinación en columnas. En los dos últimos métodos se dispone de sistemas semiautomatizados y automatizados, a

diferencia del método en tubo que corresponde a una técnica manual.

d) Procedimiento

1. Identificar las muestras a estudiar y centrifugarlas de acuerdo al tiempo estandarizado en la centrífuga, para obtener suero o plasma.
2. Verificar que los reactivos estén vigentes y que tanto reactivos como equipos cumplan con los parámetros definidos en el control de calidad del laboratorio de inmunohematología. Las células panel deben utilizarse a la concentración definida por el fabricante para realizar la técnica.
3. Para cada muestra a procesar se deben realizar en forma independiente las siguientes reacciones, utilizando volúmenes de suero o plasma y suspensión de glóbulos rojos de acuerdo a la técnica empleada: (ver tabla 1).

Tabla 1

Tubo, columna o microplaca	Suero o Plasma	Glóbulos Rojos	Utilidad
Reacción I	Muestra en estudio	Panel I (R ₁ /R ₁), en concentración adecuada a la técnica usada	Detección de anticuerpos irregulares dirigidos hacia antígenos presentes en el Panel I
Reacción II	Muestra en estudio	Panel II (R ₂ /R ₂) en concentración adecuada a la técnica usada	Detección de anticuerpos irregulares dirigidos hacia antígenos presentes en el Panel II
Reacción III	Muestra en estudio	Panel III (r/r) en concentración adecuada a la técnica usada	Detección de anticuerpos irregulares dirigidos hacia antígenos presentes en el Panel III (opcional)
PA	Muestra en estudio	Muestra en estudio en concentración adecuada a la técnica usada	Determinación de presencia de alo y/o autoanticuerpo

4. Mezclar y centrifugar de acuerdo a la calibración para lectura de aglutinación de la centrífuga, o a los tiempos y revoluciones establecidas por el inserto de la técnica utilizada.
5. Observar en busca de aglutinación y/o hemólisis, de acuerdo a la técnica de lectura automatizada que recomiende el fabricante o técnica manual estandarizada en el laboratorio.
6. Registrar los resultados obtenidos en intensidad de cruces, de acuerdo a la tabla de reacción del Anexo 3.
7. Dependiendo de la técnica utilizada, el procedimiento debe asegurar que se cumplan las distintas etapas de lectura propias de la técnica:

- **Tubo:** Se recomienda realizar en medio de LISS-Coombs por su mayor sensibilidad que el medio NISS. La lectura se puede realizar en tres etapas, permitiendo diferenciar anticuerpos que actúan en salino a temperatura ambiente, en salino a 37°C y con SAGH, permitiendo inferir la clase de inmunoglobulina (IgM y/o IgG) y la temperatura óptima a la cual son activas.

- **Agglutinación en columna:** la lectura se realiza en una etapa, permitiendo detectar principalmente los anticuerpos clínicamente significativos, pero no estableciendo la clase de inmunoglobulina y la temperatura óptima a la cual son activas. También es posible detectar anticuerpos de clase IgM que presentan amplio rango térmico.

- **Adhesión de eritrocitos en fase sólida:** uno de los componentes de la reacción antígeno-anticuerpo es inmovilizado en pocillo (fase sólida) a la que se adiciona antígeno/anticuerpo libre (muestra) y el punto final de la reacción se evidencia por la adición de eritrocitos que pueden ser parte de la reacción antígeno-anticuerpo o se pueden usar como células indicadoras.

e) Interpretación

Ejemplos de reacciones que pueden observarse en detección de anticuerpos irregulares y su complemento con otras metodologías se muestran en la siguiente tabla: ver tabla 2.

Tabla 2

Reacción Panel I	Reacción Panel II	PA	TAD	Resultado de Detección de Anticuerpos	Interpretación
+	+	0	0	Positivo	Aloanticuerpo
0	+	0	0	Positivo	Aloanticuerpo
+	0	0	0	Positivo	Aloanticuerpo
0	0	0	0	Negativo	Ausencia de Anticuerpos
+	+	+	+/0	Positivo	Autoanticuerpo + Aloanticuerpo
0	0	+	+/0	Positivo	Autoanticuerpo/Crioaglutinina

0 = No hay reacción de aglutinación

+ = Aglutinación de cualquier intensidad (4+, 3+, 2+, 1+)

f) Informe de resultados

La denominación recomendada para el informe del resultado de este estudio es:

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES: positivo; negativo (según corresponda al paciente o donante estudiado).

En caso de ser positivo, se recomienda registrar las alternativas posibles de especificidades de los anticuerpos detectados de acuerdo al panel utilizado. Se adjunta en Anexo 4, propuesta de registro de resultados.

II. IDENTIFICACIÓN BÁSICA DE ANTICUERPOS IRREGULARES

a) Muestras

La identificación de anticuerpos irregulares debe realizarse con muestras sanguíneas con las mismas características definidas en este documento para la Detección de Anticuerpos Irregulares, en su punto I.a). Para el estudio de mezclas de anticuerpos complejos o múltiples, es fundamental disponer necesariamente de los glóbulos rojos de la muestra para realizar estudios de fenotipificación, autocontrol o TAD.

La solicitud de examen que acompaña a la muestra debe incluir al menos la identificación completa del paciente (nombre con dos apellidos), fecha, procedencia, edad, sexo, pertenencia a alguna etnia, historial médico con especial énfasis en historia transfusional reciente, embarazos, patologías asociadas, consumo de algún medicamento, etc., lo que será de utilidad en el proceso de identificación de anticuerpos e interpretación de resultados.

b) Reactivos

Células Panel para identificación de anticuerpos irregulares: El panel básico de identificación generalmente presenta entre 8 a 11 frascos de células con diferentes especificidades antigénicas. Existen estos paneles de células en presentaciones de hasta 16 tipos glóbulos rojos de distintos donantes. La elección del tipo de panel debe ser realizada en base a las características del laboratorio, el tipo de pacientes que atiende y las estadísticas de los casos estudiados en el curso de un año, es deseable que el laboratorio construya tablas con la prevalencia de las especificidades identificadas durante el año. El panel debe permitir que se identifiquen claramente las especificidades de los aloanticuerpos más prevalentes en la población y de mayor importancia clínica (Anexo 1). Debe verificarse y considerarse las siguientes características básicas del panel de identificación:

- Presentar especificidades para los siguientes antígenos: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Le^a, Le^b, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a y Jk^b.
 - Poseer al menos dos células panel que presenten y dos células panel que carezcan de los antígenos señalados en el punto anterior. En la tabla de trabajo (Anexo 5) se puede observar que los antígenos e y k no cumplen esta regla, por lo que se debe incorporar al análisis, las células del panel de detección de anticuerpos irregulares, logrando así cumplir esta regla.
 - Disponer de células con doble dosis (homocigotas) especialmente de los antígenos Jk^a, Jk^b, S, s, Fy^a, y Fy^b, ya que estos antígenos se expresan más débilmente cuando los genes involucrados están en forma heterocigota.
 - Poseer células rr (cde/cde) en el panel y que entre ellas expresen los antígenos K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, M, S, s, de preferencia al estado homocigoto, de manera de poder evidenciar la presencia de ellos junto al anti-D, dada la frecuencia de este anticuerpo.
 - Verificar que el inserto de especificación del reactivo y la tabla de trabajo que vienen con el panel, coincidan con el número de lote del reactivo. Este punto es muy importante al momento de querer interpretar los resultados.
 - Las células panel no deben utilizarse más allá de la fecha de expiración indicada por el fabricante.
 - Cada laboratorio de acuerdo a su realidad (frecuencia de anticuerpos irregulares, características étnicas de la población que atiende, entre otras), debe definir al momento de su compra, características especiales del panel a utilizar.
- Suero Antiglobulina Humana: Ver punto Ib) de Detección de anticuerpos irregulares.
 - LISS: de acuerdo a la estandarización del reactivo o a las recomendaciones del fabricante, en caso de ser usado para esta metodología (incorporado en los sistemas de aglutinación en columna o en presentaciones para su utilización en tubos).
 - Suero fisiológico tamponado, PBS o solución diluyente recomendada para la técnica utilizada.

c.- Técnicas

Existen técnicas manuales, semiautomatizadas y automatizadas, en tubo, columna y microplaca.

d.- Procedimiento

- Rotular la muestra a investigar y centrifugarla de acuerdo al tiempo estandarizado en la centrífuga para obtener suero o plasma.

2. Verificar que los reactivos estén vigentes y que tanto reactivos como equipos cumplan con los parámetros definidos en el control de calidad del laboratorio de inmunohematología. Las células panel deben utilizarse a la concentración definida para la técnica a realizar en el inserto del fabricante.
3. Verificar que la hoja de trabajo del panel de identificación está disponible y su número de lote corresponde al del reactivo que se utilizará.
4. Para cada muestra a procesar, se deben efectuar tantas reacciones de acuerdo al número de células panel básico utilizado en el laboratorio: ver tabla 3.

Tabla3

Tubo, columna o microplaca	Suero o Plasma	Glóbulos Rojos	Utilidad
Reacción 1	Muestra en estudio	Panel 1 en concentración adecuada a la técnica usada	Detectar reacción de acuerdo al fenotipo del Panel 1
Reacción 2	Muestra en estudio	Panel 2 en concentración adecuada a la técnica usada	Detectar reacción de acuerdo al fenotipo del Panel 2
Reacción 3	Muestra en estudio	Panel 3 en concentración adecuada a la técnica usada	Detectar reacción de acuerdo al fenotipo del Panel 3
Reacción n*	Muestra en estudio	Panel "n" en concentración adecuada a la técnica usada	Detectar reacción de acuerdo al fenotipo del Panel "n"
PA	Muestra en estudio	Muestra en estudio en concentración adecuada a la técnica usada	Determinación de presencia de alo y/o autoanticuerpo

*n: número de células del panel utilizadas en la identificación

5. Mezclar y centrifugar de acuerdo a la calibración de la centrífuga para lectura, o a los tiempos y revoluciones establecidas por el fabricante.
6. Observar en busca de aglutinación y/o hemólisis, de acuerdo a la técnica de lectura automatizada o manual que recomiende el fabricante.
7. Registrar los resultados obtenidos en intensidad de cruces, de acuerdo a la tabla de reacción del Anexo 3.
8. Dependiendo de la técnica definida en sus protocolos, debe asegurarse de cumplir con las distintas etapas de lectura que se requieren:
 - **Tubo:** la lectura realizada en las tres etapas, puede permitir diferenciar la detección de anticuerpos que actúan a temperatura ambiente, a 37°C y con SAGH. Además, la lectura y el registro de las intensidades en cruces pueden orientar a la especificidad de un solo anticuerpo o a una mezcla de ellos.
 - **Agglutinación en columna:** la lectura se puede realizar en una etapa, permitiendo detectar los anticuerpos clínicamente significativos, pero no permite establecer la clase y la temperatura a la cual ellos son activos. El análisis de las intensidades en cruces puede orientar a la especificidad de un solo anticuerpo o a una mezcla de ellos.

e.- Interpretación

La asignación de la identificación de anticuerpos irregulares, debe realizarse a través de la interpretación del registro de los resultados de las reacciones señaladas en la tabla de trabajo (Anexo 5). Es importante verificar que ella corresponda al lote de panel celular que se haya utilizado. A continuación se señala un ejemplo de identificación básica de anticuerpos irregulares con especificidad anti-S:

1. Identificar y registrar adecuadamente la intensidad de cruces para cada célula panel, lo cual puede orientar a la especificidad del o los anticuerpos en la muestra.
2. Proceda a descartar aquellas especificidades de anticuerpos para las cuales el estudio muestra un resultado negativo (descarte por reacciones negativas) con células de expresión homocigota. En la figura se deben analizar las células 1, 3, 8, 10 y 11. La célula 1 permite descartar las especificidades D, C, e, M, s, k, P1, Le^b y Jk^b (tachado azul); la célula 3 permite descartar las especificidades E, c, N, Le^a, Fy^b (tachado rojo); la célula 8 no descarta especificidades adicionales; la célula 10 descarta la especificidad Jk^a (tachado verde); la célula 11 descarta la especificidad Fy^a (tachado negro). Este análisis no permitió excluir las especificidades S y K.

Cel	Rh					MNS				Kell		P	Lewis		Duffy		Kidd		Cel	Resultado			
	D	C	E	c	e	M	N	S	s	K	k	P1	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b		TA	37C	AHG	CC
1 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	1		0	✓	
2 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	2		2+		
3 R ₂ R ₂	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	3		0	✓	
4 r'r	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	4		2+		
5 r''r	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	5		2+		
6 rr	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	6		2+		

7 rr	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	7			2+	
8 R ₀ r	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	8			0	✓
9 rr	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	9			2+		
10 rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	10			0	✓
11 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	11			0	✓	
PA																		PA					

3. Proceda a comparar el patrón de reacciones (positivas y negativas) de su columna de resultados con las columnas para la especificidad S y K. El patrón de reacción en esta etapa permite descartar la especificidad K, ya que la célula 10 positiva para Kell presenta reacción negativa.

Cel	Rh					MNS				Kell		P	Lewis		Duffy		Kidd		Cel	Resultado			
	D	C	E	c	e	M	N	S	s	K	k	P1	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b		TA	37C	AHG	CC
1 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	1			0	✓
2 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	2			2+	
3 R ₂ R ₂	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	3			0	✓
4 r'r	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	4			2+	
5 r'r	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	5			2+	
6 rr	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	6			2+	
7 rr	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	7			2+	
8 R ₀ r	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	8			0	✓
9 rr	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	9			2+		
10 rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	10			0	✓
11 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	11			0	✓
PA																			PA				

- La especificidad probable del anticuerpo es anti-S, lo cual se debe demostrar por la ausencia del antígeno S en el fenotipo de los glóbulos rojos.
- Cuando no es posible identificar los anticuerpos en una muestra a través del panel básico, se deben utilizar técnicas adicionales (fenotipo eritrocitario, panel enzimático, elución-adsorción) o derivar a laboratorio de Referencia para completar estudio.

f.- Informe de resultados

La denominación recomendada es:

IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES: anti-D, anti-K, anti-Fy^b (según corresponda al paciente o donante estudiado).

Aspectos a considerar en la identificación de anticuerpos

- El suero o plasma del paciente debe ser analizado por la misma técnica que se usó en la detección del anticuerpo. La inclusión de glóbulos rojos del paciente puede ser útil en el reconocimiento de anticuerpos dirigidos contra antígenos de alta frecuencia o la presencia de autoanticuerpos.
- La especificidad del anticuerpo sólo se debe asignar cuando es reactivo con al menos dos células panel que tienen el antígeno y no reactivo con al menos dos células panel que carecen del antígeno. Siempre que sea posible, la presencia de anti-Jk^a, -Jk^b, -S, -s, -Fy^a, y -Fy^b debe excluirse usando células que tengan expresiones homocigotas del antígeno relevante.
- Se debe utilizar un suero control anti-D débil ($\leq 0,1$ UI / ml) para asegurar la eficacia del procedimiento, incluyendo la expresión antigénica sobre células panel.
- Cuando una especificidad de anticuerpos ha sido identificada, es esencial que la presencia de otros anticuerpos clínicamente significativos no sean omitidos. Anticuerpos múltiples sólo se pueden confirmar por la elección de las células panel negativas para la especificidad reconocida, pero positivas para otros antígenos capaces de producir anticuerpos clínicamente significativos. El conocimiento de los fenotipos del paciente puede ayudar en la selección de células para el proceso de identificación y exclusión.

- Cuando se ha identificado un anticuerpo, los glóbulos rojos del paciente deben ser fenotipados para establecer la ausencia del antígeno (s) correspondiente a la especificidad de los anticuerpos identificados. Se deben utilizar controles apropiados, es decir, antígeno positivo (heterocigoto) y antígeno negativo.

III. CONTROL DE CALIDAD

a) Control de Calidad Interno:

Seguir los procedimientos de control de calidad recomendados por los fabricantes de reactivos y equipos. Cada laboratorio debe realizar control de calidad en las siguientes situaciones:

- Control negativo: utilizar un suero AB inerte estandarizado, como muestra en estudio. Debe dar un resultado negativo.
 - Control positivo: utilizar un suero con anticuerpos irregulares de clase IgG, como muestra en estudio. Debe presentar una intensidad de reacción de 2+ (anti-D débil ($\leq 0,1$ UI / ml)) con alguno de los glóbulos rojos utilizados en el test. Este reactivo control debe ser de origen humano y estandarizado por el encargado de calidad del laboratorio.
 - Control de lavado o Células Control Coombs (se usa sólo en técnicas en tubo y cuando el resultado de la detección en la etapa AGH es negativa): Corresponde a GR sensibilizados con cantidades bajas de IgG, de manera que ellos son capaces de revelar el suero AGH que queda libre, en aquellos test que muestran un resultado negativo. Este reactivo control debe dar un resultado positivo.
- b) **Control de calidad de cada nuevo lote de reactivos:** corresponde a la verificación para asegurar la conformidad con los criterios utilizados. Cualquier reactivo que no cumpla con las especificación requeridas para los test, no se debe utilizar.
- Tomar al azar uno o dos frascos de reactivos a verificar del nuevo lote como mínimo y examinarlos por inspección visual, en cuanto a corroborar que el volumen y la etiqueta señalan aspectos específicos del reactivo, N° de lote y fecha de vencimiento con un plazo adecuado a las necesidades del servicio. Además verificar presencia del inserto que especifica características, modo de uso y control de calidad.
 - Evaluar en el laboratorio de Inmunohematología sus características en cuanto a actividad, especificidad, sensibilidad y potencia, según corresponda. Si estos reactivos han sido evaluados por una entidad de referencia, deben solicitarse los resultados y verificar la coherencia con el N° de lote, marca y fecha de vencimiento del reactivo en uso.
 - Los paneles de identificación deben presentar para los anticuerpos simples por lo menos dos tipos de células positivas y tres negativas, o una positiva y siete negativas para permitir identificar con un valor de p de 0,05.
 - Se recomienda controlar al azar una o dos expresiones antigénicas heterocigotas (fenotipar) de las células de detección e identificación.
- c) **Con cada nueva técnica o tecnología:** además de probar los reactivos como se describen anteriormente, es conveniente realizar junto a este nuevo método, si es posible, en paralelo con el método que se estaba usando, de acuerdo al protocolo de verificación implementado en el laboratorio. Incluyendo al menos 10 muestra de sueros con anticuerpos irregulares positivos (almacenadas en serotecas), para evaluar reproducibilidad y concordancia de los resultados. Esa semana de prueba puede utilizarse también como etapa de inducción y capacitación del personal que utilizará la nueva técnica o tecnología. En esta etapa es imprescindible la participación del proveedor para la entrega de información, asesoría y capacitación. Esto deberá asegurar que el método es apto para su uso rutinario.

Especificaciones de los reactivos

Suero Antiglobulina humana - poliespecífico (SAGH)

a) Inspección visual

- Etiqueta debe contener información sobre: el nombre del producto, el número de lote (serie), la fecha de vencimiento, las condiciones de almacenamiento y nombre del fabricante o su logo.
- Inserto del producto debe aportar los mismos detalles que los señalados en la etiqueta, pero explicitando el método recomendado para su uso, los controles de calidad a aplicar, los diluyentes recomendados etc., que pueden ser necesarios, además de cualquier limitación o advertencias en el uso de ese reactivo. Debe incluir también detalles de la composición del reactivo, advertencias de bioseguridad, y aportar detalles para su uso seguro.

Todos los reactivos no-celulares deben estar libres de hemólisis, precipitados, partículas o formación de gel.

b.- Sensibilidad:

- No debe presentar hemólisis o aglutinación después de una incubación con suero fresco inerte y compatible, como en una prueba de compatibilidad, usando las siguientes células no sensibilizadas: 2 células A, 2 células B, 2 células O.
- Se deben obtener reacciones positivas con:
 - Glóbulos rojos RhD positivos (preferiblemente R1r) sensibilizadas con un débil anti-D (0,1 UI/ml o 20 nanogramos/ml)
 - Glóbulos rojos recubiertos con C3b y C3d.
- Reacciones negativas se deben obtener
 - Con las mismas células, pero no sensibilizadas con anti-D ni complemento.

c.- Potencia:

Obtener el mismo título o más alto, sin prozona, que el obtenido con una "solución de potencia mínima" o un AHG con licencia al día (FDA o CE), usando glóbulos rojos RhD positivos recubiertos con un anti-D de 0,1 UI/ml o 20 nanogramos/ml (reacción de 2+ en SAGH).

Es útil tener un pequeño panel de anticuerpos débiles (1+ a 2+) de especificidad conocida por ej. anti-Fya además de un anti-D, para utilizar tanto en estudios de especificidad como potencia.

Solución salina de baja fuerza iónica (LISS)

Aspecto; sin turbidez, ni partículas. No hemolizar, ni causar aglutinación de las células.

	Salino	LISS
pH	6.6-6.8	6.6-6.8
Conductividad mS/cm	15-18	3.4-4.0
Osmolaridad mOsmol/kg		285-305

El LISS se puede utilizar de dos maneras: suspendiendo los glóbulos rojos de prueba en LISS (1,5 - 2%) o agregando un volumen igual de la solución de LISS al suero y utilizando glóbulos rojos suspendidos en salino (3%). Las células suspendidas en LISS no se deben conservar más de 24 horas para ser usadas.

Control de Calidad Externo:

Los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos del país que realizan esta determinación deben participar en algún programa de evaluación externa de la calidad, para que en conjunto con el control de calidad interno, se asegure la calidad de la detección e identificación de anticuerpos irregulares eritrocitarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Association of Blood Banks. *AABB Standards for Blood Bank and Transfusion Services*, 25th ed., Bethesda, Maryland, 2008.
- Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom, 7th edition 2005.
- Harmening DM, *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*, 6th ed., 2012.
- Ministerio de Salud de Chile. *Orientaciones para Centros de Sangre y Unidades de Medicina Transfusional*, MINSAL, 2007.
- Roback JD, editor. *AABB Technical Manual*, 17th ed., Bethesda, Maryland, 2011.

ANEXO 1

Características de los anticuerpos irregulares de significancia clínica y sus frecuencias en donantes y pacientes en dos Servicios de Sangre chilenos durante los años 2011-2013.

Sistema Sanguíneo	Anticuerpo	Reactividad				Asociado a		Frecuencias			
		4°C	22°C	37°C	AGH	EHRN	RHT	Donantes ¹		Pacientes ²	
								n	%	n	%
MNS	Anti-M	Mayoría	Mayoría		Raro	Raro	27	7.9	13	3.4	
	Anti-N	Mayoría	Mayoría		Raro	Raro	4	1.2	1	0.3	
	Anti-S		Mayoría		Mayoría	Sí	4	1.2	10	2.6	
	Anti-s				Mayoría	Sí	1	0.3			
	Anti-U				Mayoría	Sí					
P1PK	Anti-P1	Mayoría	Mayoría			No	Raro	2	0.6	2	0.5
Rh	Anti-D		Algunos	Algunos	Mayoría	Sí	Sí	51	15.0	103	27.3
	Anti-C		Algunos	Algunos	Mayoría	Sí	Sí	5	1.5	12	3.2
	Anti-E		Algunos	Algunos	Mayoría	Sí	Sí	63	18.5	81	21.4
	Anti-c		Algunos	Algunos	Mayoría	Sí	Sí	8	2.4	13	3.4
	Anti-e		Algunos	Algunos	Mayoría	Sí	Sí			5	1.3
Lutheran	Anti-Lu ^a		Mayoría		Mayoría	Raro	No	1	0.3	4	1.1
	Anti-Lu ^b		Algunos		Mayoría	Leve	Sí	3	0.9		
Kell	Anti-K		Algunos		Mayoría	Sí	Sí	63	18.5	63	16.7
	Anti-k				Mayoría	Sí	Sí				
	Anti-Kp ^a				Mayoría	Sí	Sí			2	0.5
	Anti-Kp ^b				Mayoría	Sí	Sí				
	Anti-Js ^a				Mayoría	Sí	Sí				
Lewis	Anti-Le ^a	Mayoría	Mayoría	Mayoría	Mayoría	No	Raro	83	24.4	42	11.1
	Anti-Le ^b	Mayoría	Mayoría	Mayoría	Mayoría	No	No	7	2.1	2	0.5
Duffy	Anti-Fy ^a				Mayoría	Sí	Sí	11	3.2	8	2.1
	Anti-Fy ^b				Mayoría	Sí	Sí	1	0.3	1	0.3
Kidd	Anti-Jk ^a				Mayoría	Sí	Sí	6	1.8	13	3.5
	Anti-Jk ^b				Mayoría	Sí	Sí			3	0.8
Diego	Anti-Di ^a				Mayoría	Sí	Sí				
	Anti-Di ^b				Mayoría	Sí	Sí				
Yt	Anti-Yt ^a				Mayoría	No	Sí				
	Anti-Yt ^b				Mayoría	No	No				

Xg	Anti-Xg ^a		Algunos		Mayoría	No	No					
Scianna	Anti-Sc1				Mayoría	No	No					
	Anti-Sc2				Mayoría	No	No					
Dombrock	Anti-Do ^a				Mayoría	No	Si					
	Anti-Do ^b				Mayoría	No	Si					
Colton	Anti-Co ^a				Mayoría	Si	Si					
	Anti-Co ^b				Mayoría	Si	Si					
								TOTAL	340	100	378	100

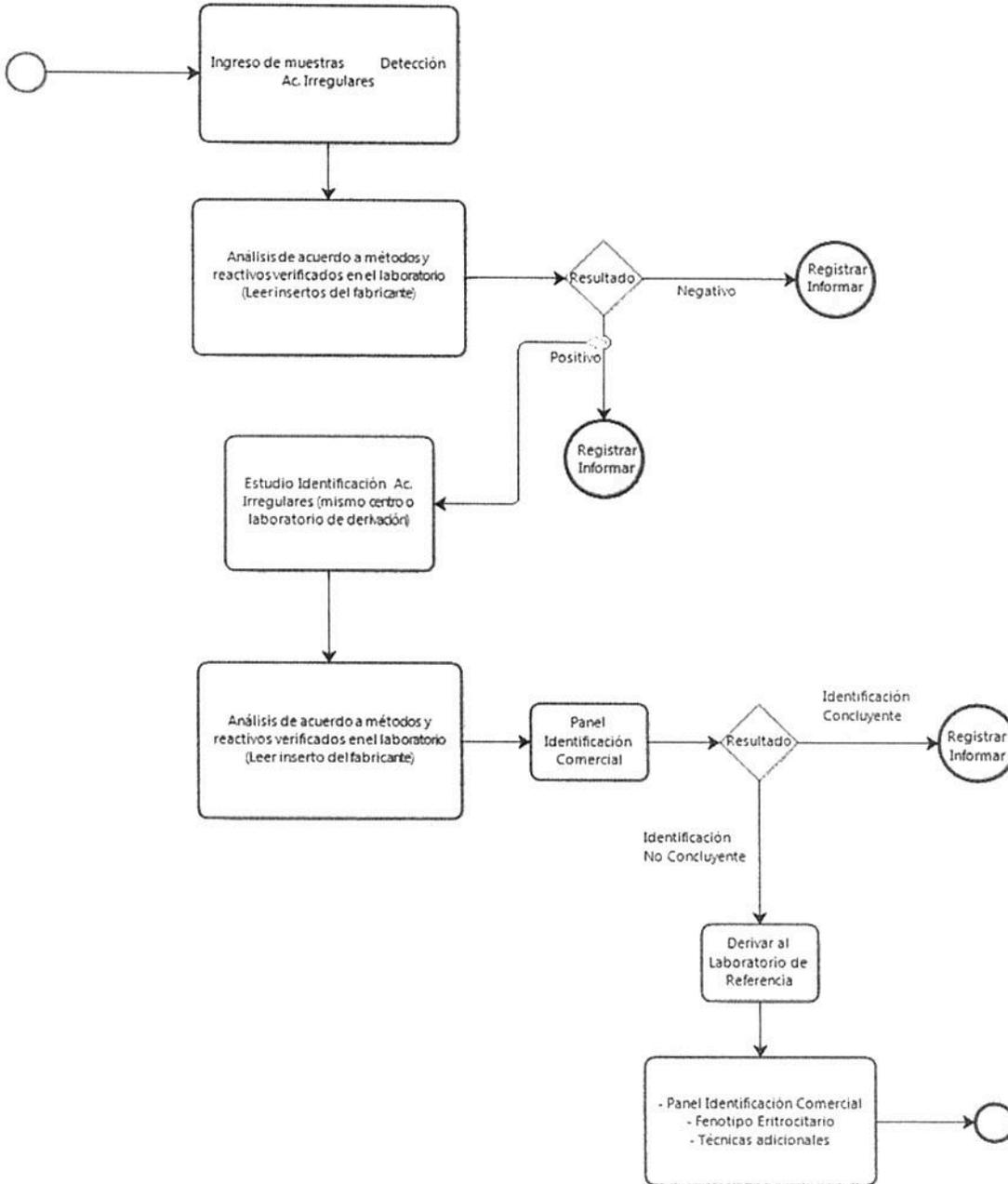
Fuente: Manual Técnico AABB, 2011 (adaptado)

¹ Datos obtenidos sobre un total de 142.812 donantes del Centro Metropolitano de Sangre y Tejidos, Santiago.

² Datos obtenidos sobre un total de 45.584 pacientes del Hospital Guillermo Grant Benavente, Concepción.

ANEXO 2

Algoritmo para la detección e identificación de anticuerpos irregulares eritrocitarios



ANEXO 3

Intensidades de Reacción de acuerdo a las distintas técnicas de aglutinación.

Intensidad de Reacción	Aglutinación Tubo/Microplaca	Aglutinación en columna (gel y esferas de vidrio)	Aglutinación Microplaca (fase sólida)
4+	Botón único. Fondo claro. Sin células libres.	Banda homogénea de aglutinados en la parte superior de la columna.	La adherencia es fuerte, cubriendo por completo la monocapa.
3+	Varios aglutinados de gran tamaño. Fondo claro. Sin células libres.	Banda superior de aglutinado y desplazamiento en la parte superior de la columna.	El grado de adherencia es moderado a fuerte, ligera formación de células en el centro del pocillo.
2+	Muchos aglutinados de mediano tamaño. Fondo claro. Sin células libres.	Aglutinados pequeños en la columna y a lo largo de la columna.	El grado de adherencia es moderado, botón celular irregular con agujero.
1+	Numerosos aglutinados pequeños. Fondo turbio por GR libres.	Algunos aglutinados pequeños en la columna.	El grado de adherencia es ligero a pequeño, botón celular difuso.
+/-	Apenas la aglutinación es visible. Fondo turbio por GR libres.	Escasos aglutinados de pequeño tamaño en la columna.	No aplica.
0	Ausencia de aglutinación	Banda de GR al fondo de la columna, resto de la columna sin aglutinados.	No hay adherencia, botón celular central bien definido.

ANEXO 4

Elementos básicos de un registro recomendado para anotar los resultados de la detección de anticuerpos irregulares eritrocitarios.

Fecha: _____ Tecnólogo Médico responsable: _____

Identificación paciente/donante	Reacción Panel I (intensidad de cruces)			Reacción Panel II (intensidad de cruces)			PA (intensidad de cruces)			Resultado Detección de Anticuerpos	Interpretación (Características del o los Anticuerpos)	Posibles especificidades involucradas
	CI	37°C	AGH	CI	37°C	AGH	CI	37°C	AGH			
<i>Ejemplos de reacciones</i>												
Paciente XXXX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Negativo	Ausencia de anticuerpos	
Paciente XXXX	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	Positivo	Aloanticuerpo	Anti-c; Anti-E; anti-K.....
Paciente XXXX	0	0	4+	0	0	4+	0	0	0	Positivo	Aloanticuerpo	Anti-D;
Paciente XXXX	2+	0	0	2+	0	0	2+	0	0	Positivo	Autoanticuerpo frío	
Paciente n....												

Reactivo	Lote	N° de serie	Marca	Fecha vencimiento
Panel celular				
Columna (soporte)				
AGH				
LISS				
Otro reactivo				

ANEXO 5

Ejemplo de tabla de trabajo para la identificación de anticuerpos irregulares.

Cel	Rh					MNS				Kell		P	Lewis		Duffy		Kidd		Cel	Resultado			
	D	C	E	c	e	M	N	S	s	K	k	P1	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	JK ^a	JK ^b		TA	37C	AHG	CC
1 R1R1	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	1				
2 R1R1	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	2				
3 R2R2	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	3				
4 r'r	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	4				
5 r''r	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	5				
6 rr	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	6				
7 rr	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	7				
8 R0r	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	8				
9 rr	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	9				
10 rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	10				
11 R1R1	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	11				
PA																			PA				

2° AUTORIZASE al Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia de este Instituto, a efectuar la publicación de las Recomendaciones Para la Detección e Identificación de Anticuerpos Irregulares Eritrocitarios, en los formatos que estime pertinentes, siempre y cuando, su contenido se encuentre en concordancia con el texto indicado en el presente acto administrativo.

Anótese, comuníquese y publíquese en el Diario Oficial y en la página Web Institucional.



DIRECTOR
 ROBERTO BRAVO MÉNDEZ
 DIRECTOR(S)


 Transcrito Fielmente
 Ministro de fe

Resol A1/Nº1203
11/12/2014


 INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE
 MINISTRO DE FE

Distribución

- Depto. Laboratorio Biomédico
- Comunicaciones e Imagen Institucional. ✓
- Asesoría Jurídica.
- Oficina de Partes.

