

	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PRUEBA DE COOMBS DIRECTO/ ANTIGLOBULINA DIRECTA (PAD)	Código: IT-IS-BS-32
		Página 1 de 8
	DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: Septiembre 2019
		Versión vigente: 02

INDICE

Pág.

1.0 ALCANCE.....	1
2.0 DOCUMENTOS APLICABLES.....	1
3.0 DEFINICIONES.....	1
4.0 MATERIAL Y EQUIPO.....	2
5.0 DESARROLLO.....	3
6.0 ANEXOS.....	5
7.0 CONTROL DE CAMBIOS.....	8

1. Alcance:

Aplica para la realización de la Prueba de Coombs (prueba de antiglobulina directa PAD), para detectar inmunoglobulinas de la clase IgG y/o fracciones del complemento (c3d) unidos a los glóbulos rojos (sensibilización), hasta la obtención de los resultados, para dar cumplimiento a la N/A **NOM-253-SSA1-2012**, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos en pro del paciente.

2. Documentos Aplicables:

FT-IS-BS-03 Solicitud de hemocomponentes sala de operaciones

FT-FT-BS-04 Solicitud de hemocomponentes

N/A NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

N/A Manual del equipo automatizado

N/A Libro de eventos adversos del acto transfusional

N/A Libreta de seguimiento a pruebas cruzadas incompatibles

N/A Sistema Informático

N/A Anticuerpos irregulares

N/A Manual de técnicas de Inmunoematología 1º edición, 2015 Licon

N/A Bitácora de Prueba de Antiglobulina Humana (Coombs directo)

3. Definiciones:

Aglutinación: Reacción caracterizada por agrupación de células o partículas resultante de la interacción entre antígenos y anticuerpos.

	Elaboró	Revisó	Autorizó
COPIA NO CONTROLADA	QFB Leticia Nogal Valadez Químico Banco de Sangre	Dra. Esperanza Elizabeth Zuno Reyes Jefe de Banco de Sangre	Dr. Santiago López Venegas Jefe de la División de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Tratamiento

	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PRUEBA DE COOMBS DIRECTO/ ANTIGLOBULINA DIRECTA (PAD)	Código: IT-IS-BS-32
		Página 2 de 8
	DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: Septiembre 2019
		Versión Vigente: 02

Aloanticuerpo: Inmunoglobulina resultante de una respuesta inmune a un antígeno ajeno al individuo

Anticuerpo: Inmunoglobulina resultante de una respuesta inmune o un antígeno propio o ajeno al individuo.

Auto-anticuerpo: Inmunoglobulina producido por el mismo individuo.

Antígeno: Sustancia capaz de estimular una respuesta inmune con la formación de anticuerpos.

Inmunoglobulina: Proteína presente en el plasma, de mayor peso molecular que la albúmina, que actúa como anticuerpo.

Inmunoematología: El estudio de los antígenos y anticuerpos de los grupos sanguíneos y problemas asociados.

Muestra: Alícuota de sangre, plasma, suero o de un producto extraído del conjunto por métodos que permitan considerarla como representativa del mismo, empleada para fines diagnóstico, comprobación o investigación, no utilizable para fines terapéuticos.

Prueba de Coombs directo/ Prueba de Antiglobulina Directa (PAD): Análisis que permite detectar anticuerpos, complemento o ambos adheridos a la membrana del eritrocito, mediante el uso de anticuerpos contra gamaglobulina humana (Suero de Coombs).

Reactivo de antiglobulina humana (Suero Coombs): Producto empleado para la detección de globulinas humanas adheridas a los eritrocitos. El poliespecífico, también detecta actividad de complemento humano (C3d y C3b).

Roleaux.- Es la agrupación de hematíes formando las llamadas "pilas de monedas", cuando en el suero de algunos pacientes se encuentran altas concentraciones de proteínas.

Eritrocitos sensibilizados: Glóbulos rojos que tienen adheridos a un antígeno de la membrana eritrocitaria, anticuerpos, complemento o ambos.

4.0 Material y Equipo:

- Reactivo de antiglobulina humana (Suero Coombs) poliespecífico.
- Reactivo de anti-globulina humana (Suero Coombs) monoespecífico. Anti-IgG.
- Reactivo de anti-globulina humana (Suero Coombs) monoespecífico, Anti-complemento.
- Células control positivo (eritrocitos sensibilizados).
- Células control negativo (eritrocitos no sensibilizados).
- Tarjetas de gel Coombs.
- Solución salina fisiológica
- Diluyente para suspensión (Solución salina isotónica tamponada)

	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PRUEBA DE COOMBS DIRECTO/ ANTIGLOBULINA DIRECTA (PAD)	Código: IT-IS-BS-32
		Página 3 de 8
	DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: Septiembre 2019
		Versión Vigente: 02

- Equipo semiautomático para pruebas de hemoclasificación y hemocompatibilidad
- Incubador
- centrifuga para tubo
- Centrifuga Serológica
- Tubo de 12 x 75 mm
- Pipeta Pasteur
- Pipeta semiautomática de volumen variable (100-1,000 uL y 10-200 UI).
- Puntas desechables para pipeta semiautomática
- Gasas
- Guantes

5. Desarrollo: Determinación de Prueba de Coombs Directo								
No.	Responsables	Descripción de la Actividad						
5.1	Químico/TLC	Recibe muestra sanguínea debidamente rotulada junto con y coteja que coincidan los datos.						
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>¿Coinciden?</th> <th>Entonces</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">SI</td> <td>Inicia estudio de la muestra pasa a 5.2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">NO</td> <td>Informa al área que deriva para su estudio y solicita corrección del error o en caso necesario nueva muestra.</td> </tr> </tbody> </table>	¿Coinciden?	Entonces	SI	Inicia estudio de la muestra pasa a 5.2	NO	Informa al área que deriva para su estudio y solicita corrección del error o en caso necesario nueva muestra.
		¿Coinciden?	Entonces					
SI	Inicia estudio de la muestra pasa a 5.2							
NO	Informa al área que deriva para su estudio y solicita corrección del error o en caso necesario nueva muestra.							
5.2 PRUEBA DE COOMBS DIRECTO TECNICA EN GEL								
5.2.1	Químico/TLC	Realiza la determinación de Coombs directo dependiendo del método:						
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Método</th> <th>Entonces:</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Manual</td> <td>Realiza prueba. Ver instrucciones del fabricante: Método manual</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Equipo Semi-automatizado</td> <td>Realiza prueba. Ver N/A Manual del equipo automatizado que utiliza un proceso automático continuo e integrado con las siguientes funciones: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Identificación de muestras y reactivos. ✓ Resuspensión de los eritrocitos, dilución y dispensación de muestras y reactivos. ✓ Centrifugación, lectura e interpretación de resultados. </td> </tr> </tbody> </table>	Método	Entonces:	Manual	Realiza prueba. Ver instrucciones del fabricante: Método manual	Equipo Semi-automatizado	Realiza prueba. Ver N/A Manual del equipo automatizado que utiliza un proceso automático continuo e integrado con las siguientes funciones: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Identificación de muestras y reactivos. ✓ Resuspensión de los eritrocitos, dilución y dispensación de muestras y reactivos. ✓ Centrifugación, lectura e interpretación de resultados.
		Método	Entonces:					
Manual	Realiza prueba. Ver instrucciones del fabricante: Método manual							
Equipo Semi-automatizado	Realiza prueba. Ver N/A Manual del equipo automatizado que utiliza un proceso automático continuo e integrado con las siguientes funciones: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Identificación de muestras y reactivos. ✓ Resuspensión de los eritrocitos, dilución y dispensación de muestras y reactivos. ✓ Centrifugación, lectura e interpretación de resultados. 							



INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PRUEBA DE COOMBS DIRECTO/ ANTIGLOBULINA DIRECTA (PAD)

Código: IT-IS-BS-32

Página 4 de 8

Fecha de Revisión:
Septiembre 2019

Versión Vigente: 02

DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

		Revisa resultados de Coombs Directo e interpreta de acuerdo al Anexo 1 y procede como sigue:								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Resultado</th> <th>Entonces</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Positivo</td> <td>Registra resultado correspondiente (1+, 2+, 3+, 4+) en FT-IS-BS-03 Solicitud de hemocomponentes sala de operaciones o FT-FT-BS-04 Solicitud de hemocomponentes y continua la prueba para titulación pasa a 5.2.3</td> </tr> <tr> <td>Negativo</td> <td>Registra en FT-IS-BS-03 Solicitud de hemocomponentes sala de operaciones o FT-FT-BS-04 Solicitud de hemocomponentes y documentos aplicables según el caso (N/A Libro de eventos adversos del acto transfusional, N/A Libreta de seguimiento a pruebas cruzadas incompatibles y N/A Sistema Informático, N/A Bitácora de Prueba de Antiglobulina Humana (Coombs directo)). Imprime reporte N/A Anticuerpos irregulares, y pone a disposición para el manejo del médico tratante.</td> </tr> <tr> <td>Dudoso / Inespecífico</td> <td>Realizar prueba en tubo (Ver Anexo 2 y 4) y pasa a 5.3</td> </tr> </tbody> </table>	Resultado	Entonces	Positivo	Registra resultado correspondiente (1+, 2+, 3+, 4+) en FT-IS-BS-03 Solicitud de hemocomponentes sala de operaciones o FT-FT-BS-04 Solicitud de hemocomponentes y continua la prueba para titulación pasa a 5.2.3	Negativo	Registra en FT-IS-BS-03 Solicitud de hemocomponentes sala de operaciones o FT-FT-BS-04 Solicitud de hemocomponentes y documentos aplicables según el caso (N/A Libro de eventos adversos del acto transfusional, N/A Libreta de seguimiento a pruebas cruzadas incompatibles y N/A Sistema Informático, N/A Bitácora de Prueba de Antiglobulina Humana (Coombs directo)). Imprime reporte N/A Anticuerpos irregulares, y pone a disposición para el manejo del médico tratante.	Dudoso / Inespecífico	Realizar prueba en tubo (Ver Anexo 2 y 4) y pasa a 5.3
Resultado	Entonces									
Positivo	Registra resultado correspondiente (1+, 2+, 3+, 4+) en FT-IS-BS-03 Solicitud de hemocomponentes sala de operaciones o FT-FT-BS-04 Solicitud de hemocomponentes y continua la prueba para titulación pasa a 5.2.3									
Negativo	Registra en FT-IS-BS-03 Solicitud de hemocomponentes sala de operaciones o FT-FT-BS-04 Solicitud de hemocomponentes y documentos aplicables según el caso (N/A Libro de eventos adversos del acto transfusional, N/A Libreta de seguimiento a pruebas cruzadas incompatibles y N/A Sistema Informático, N/A Bitácora de Prueba de Antiglobulina Humana (Coombs directo)). Imprime reporte N/A Anticuerpos irregulares, y pone a disposición para el manejo del médico tratante.									
Dudoso / Inespecífico	Realizar prueba en tubo (Ver Anexo 2 y 4) y pasa a 5.3									
		NOTA: De primera instancia se realiza la prueba utilizando Técnica en gel. De obtener resultados dudosos o inespecíficos se realizara por la Técnica en tubo.								
5.2.3	Químico/TLC	Prueba de Coombs directo/ Prueba de Antiglobulina Directa (PAD) (ver Anexo 2 y 3)								
5.2.4	Químico/TLC	Registra en FT-IS-BS-03 Solicitud de hemocomponentes sala de operaciones o FT-FT-BS-04 Solicitud de hemocomponentes y documentos aplicables según el caso (N/A Libro de eventos adversos del acto transfusional, N/A Libreta de seguimiento a pruebas cruzadas incompatibles y N/A Sistema Informático, N/A Bitácora de Prueba de Antiglobulina Humana (Coombs directo)). Imprime reporte N/A Anticuerpos irregulares y pone a disposición para el manejo del médico tratante.								
5.3 PRUEBA DE COOMBS DIRECTO TECNICA EN TUBO										
Ver página 25 N/A Manual de técnicas de Inmunoematología 1º edición, 2015 Licon.										



INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PRUEBA DE COOMBS DIRECTO/ ANTIGLOBULINA DIRECTA (PAD)

Código: IT-IS-BS-32

Página 5 de 8

Fecha de Revisión:
Septiembre 2019

DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

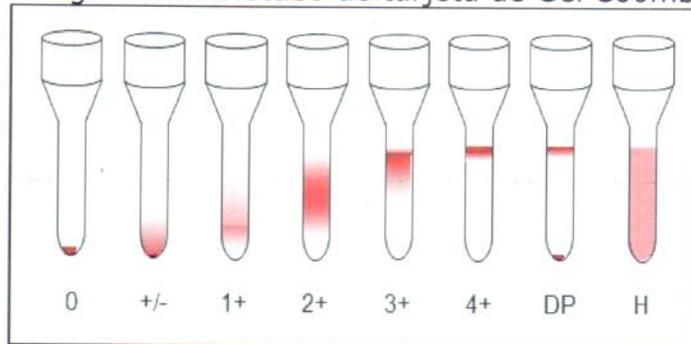
Versión Vigente: 02

<p>5.3.1</p>	<p>Químico/TLC</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Lava 3 veces con solución salina los eritrocitos de Paciente (P) y eritrocitos sensibilizados. • Prepara suspensión al 5% de cada una de ellas con solución salina fisiológica. • Marca tubo P (Paciente) y agrega 1 gota de la suspensión de eritrocitos. • Adiciona 1 gota de Suero Coombs • Mezcla y centrifuga 15-20 seg a 3400 rpm <p>Lee y registra el resultado.</p> <table border="1" data-bbox="755 745 1247 882"> <thead> <tr> <th>¿Aglutina?</th> <th>Entonces</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SI</td> <td>Positivo</td> </tr> <tr> <td>NO</td> <td>Negativo</td> </tr> </tbody> </table> <p>Si es NEGATIVO, adicionar 1 gota de eritrocitos sensibilizados, esperando aglutinación como control de calidad, en caso de no presentar aglutinación deberá repetir la prueba.</p> <p>Registra el resultado, según el formato aplicable, pasa a 5.2.4.</p>	¿Aglutina?	Entonces	SI	Positivo	NO	Negativo
¿Aglutina?	Entonces							
SI	Positivo							
NO	Negativo							

6. Anexos

Anexo 1. Lectura e interpretación de resultados:

Imagen en microtubo de tarjeta de Gel Coombs



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PRUEBA DE COOMBS DIRECTO/ ANTIGLOBULINA DIRECTA (PAD)	Código: IT-IS-BS-32
		Página 6 de 8
	DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: Septiembre 2019
		Versión Vigente: 02

Interpretación de resultados:

Negativo	0	Banda de hematíes en el fondo de la columna, resto de la columna sin aglutinados visibles
Positivo	+/-	Escasos aglutinados de pequeño tamaño en la mitad inferior de la columna.
	1+	Algunos aglutinados de pequeño tamaño en la columna.
	2+	Aglutinados de tamaño pequeño o mediano a lo largo de la columna.
	3+	Banda superior de aglutinados, de tamaño mediano en la mitad superior de la columna.
	4+	Banda de hematíes aglutinados en la parte superior de la columna.
DP		Doble población (Doble banda de hematíes, en el fondo y en la parte superior de la columna).
Positivo	H	Fuerte reacción Antígeno-Anticuerpo, se observa hemólisis en microtubo

Anexo 2. Titulación de la Prueba de Coombs directo/ Prueba de Antiglobulina Directa (PAD)

Dilución del reactivo de Coombs. Ver página 26 N/A Manual de técnicas de Inmunoematología 1º edición, 2015 Licon.

- Prepara una gradilla con 10 tubos.
- Identifica cada tubo con la dilución sucesiva correspondiente de la siguiente manera:

#Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dilución	SSD*	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512

*SSD= suero sin diluir (reactivo Suero Coombs sin diluir)

- Dispensar 200 uL o un volumen de solución salina fisiológica al 0.9% a partir del tubo número 2 y hasta el tubo número 10.
- En el tubo del número 2 dispensar 200 uL de suero de Coombs.
- Mezclar suavemente el tubo 2 evitando la formación de burbujas.
- Tomar 500 uL del tubo 2 y adicionar al tubo de la dilución siguiente, homogenizando con precaución y así sucesivamente hasta el tubo 10.
- Marcar 1 serie de 10 tubos como sigue:
 - P1,P2,P3, etc (paciente)

	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PRUEBA DE COOMBS DIRECTO/ ANTIGLOBULINA DIRECTA (PAD)	Código: IT-IS-BS-32
		Página 7 de 8
	DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: Septiembre 2019
		Versión Vigente: 02

- Adicionar 1 gota de cada dilución del reactivo de Coombs con pipeta Pasteur al tubo correspondiente de cada serie.
- Utilizar una sola pipeta por cada del tubo
- Mezclar y centrifugar a 3,400 rpm durante 20 segundos.
- Leer las aglutinaciones y anotar el resultado.
- Reportar el título (corresponde a la última lectura con aglutinación de 1+) y potencia.

NOTA: Cuando se desarrolla una técnica en tubo es muy importante tener en cuenta las posibles causas de error.

Anexo 3. Causas de error

Falsos negativos

- Suero de Coombs diluido, caducado o contaminado (desechar el vial) y realizar nuevamente las diluciones).
- Lavado de material
- Muestras de sangre vieja o en condiciones inadecuadas de conservación.
- Lavado inadecuado de eritrocitos.
- Concentración inadecuada de eritrocitos.
- Mala centrifugación.
- No adicionar (el antisuero) eritrocitos correspondientes.
- No adicionar el reactivo de Coombs.

Falsos positivos

- Muestras con Roleaux o aglutinación espontánea.
- Material sucio por no eliminar partículas contaminantes o por restos de jabón líquido.
- Muestra contaminada con soluciones o medicamentos aplicados vía intravenosa.
- Muestras de neonatos lavados incorrectamente que contenga gelatina de Wharton.
- Mala centrifugación.

	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PRUEBA DE COOMBS DIRECTO/ ANTIGLOBULINA DIRECTA (PAD)	Código: IT-IS-BS-32
		Página 8 de 8
	DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: Septiembre 2019
		Versión Vigente: 02

7. Control de Cambios:

Versión Vigente	Fecha	Motivo
0	Abril del 2016	Alta del procedimiento
01	Julio 2018	Mejoras en la instrucción de trabajo y actualización de términos.
02	Septiembre 2019	Revisión y actualización anual