

III. Protocolo para realizar pruebas pretransfusionales

José Luis Alcaraz-López*

Según el diccionario de la Lengua Española, Compatibilidad: proviene del latín *compatibilis* = compadecerse. Que puede unirse o existir armónicamente con otra cosa o persona en un mismo lugar o tiempo. Definición acorde con la finalidad de las pruebas de compatibilidad sanguínea en donde buscamos una coexistencia armónica entre el producto sanguíneo transfundido y su receptor.

Historia: el primer reporte escrito de la transfusión sanguínea fue realizado en animales, por J. Denis en Francia en junio de 1667. J. Blundell realiza los primeros intentos de transfusión en humanos en 1824. En 1901 Landsteiner descubre el Sistema AB0. En 1914 Hustin empieza a utilizar el Citrato como anticoagulante. Moreschi en 1908 experimenta con animales inyectándoles IgG humana, trabajo que más tarde Coombs continúa y realiza su publicación en 1945 poniendo las bases de la prueba más generalizada y valiosa de nuestro tiempo que conocemos como Prueba de Coombs. Dacie en 1957 publica su trabajo sobre IgG contra el complemento humano (fracción C4).^{1,4}

En el transcurso de los últimos 70 años se ha trabajado con diferentes sustancias que aceleran y modifican la reacción antígeno-anticuerpo: albúmina humana, bovina, bovina polimerizada a 19%, 22%, 30%. Enzimas como la bromelina, fisina, papaína y tripsina, L.I.S.S. (*Low ionic strength saline*/solución salina de baja fuerza iónica), columnas de gel, polietileno glicol (PEG), polibreno.^{2,6}

La prueba de compatibilidad sanguínea es un ensayo *in vitro* de lo que puede suceder en el paciente al recibir la transfusión de un componente sanguíneo. De acuerdo a lo establecido internacionalmente la secuencia de actividades son: solicitud del producto y datos relevantes del receptor. Identificación y colección de las muestras sanguíneas del receptor. Estudios y pruebas del donador. Determinación del grupo AB0 y Rho(D) del receptor. Detección de anticuerpos irregulares. Selección de componentes AB0 y Rho(D) apropiados para el receptor. Comparación entre resultados actuales y el historial de las pruebas pretransfusionales previas.^{3,4}

Prueba Cruzada

Prueba mayor: 2 volúmenes del suero del paciente frente a un volumen de eritrocitos lavados del donador.

Prueba menor: 2 volúmenes de plasma del donante frente a un volumen de eritrocitos lavados del receptor.

Auto testigo: Eritrocitos más suero del paciente.⁵

Interpretación de resultados en Pruebas Cruzadas

Algunos de los factores más importantes que afectan la sobrevivencia de los eritrocitos son: la clase y subclase de inmunoglobulinas que se producen frente a sangre incompatible; la capacidad del anticuerpo para activar el complemento; la cantidad de anticuerpos presentes en el plasma del paciente y la avidencia por su correspondiente antígeno eritrocitario; el número de sitios antigénicos que tenga la sangre incompatible circulando en el organismo del paciente transfundido, el margen térmico de acción del anticuerpo implicado, la cantidad de eritrocitos transfundidos, la presencia de sustancias solubles de grupo en el receptor secretor y la actividad del sistema fagocítico mononuclear del paciente transfundido.⁷

Evaluación de la prueba cruzada

Prueba mayor positiva: en prueba rápida: corroborar el grupo ABO del donador. En técnica a 37° C o en Coombs realizar búsqueda de anticuerpos irregulares para determinar la especificidad del anticuerpo. Cruzar toda la sangre compatible por sistema ABO con que se cuente en el banco y transfundir las compatibles en situación de peligro inminente de muerte por la anemia. Cuando sea posible, realizar fenotipo eritrocítico con sueros comerciales.⁷

Pruebas mayor y menor positivas: cuando es detectado en salina rápida, corroborar el grupo del sistema ABO tanto al paciente como al donador. Si se detecta en 37° C y/o en Coombs realizar en el donador Coombs directo e investigación de anticuerpos.

Prueba menor positiva: si se detecta en salina rápida, corroborar el grupo ABO al donador, sobre todo cuando se va a transfundir plaquetas o plasma. Si se detecta a 37° C y/o en Coombs, realizar Coombs directo en el donador.

Auto testigo positivo: si el paciente ha sido transfundido recientemente (menos de 3 meses) es muy probable que esa aglutinación se deba a los anticuerpos del paciente que están pegados a los eritrocitos de la sangre transfundida. Si

* Banco Central de Sangre. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. México, D.F.

fue transfundido en los días previos con plasma o plaquetas, la aglutinación se puede deber al paso de anticuerpos del donador que se pegaron a los eritrocitos del paciente. Si el paciente nunca ha sido transfundido o tuvo transfusiones hace más de cuatro meses, es probable que estemos frente a un auto anticuerpo como puede suceder en las A.H.A.I. o en pacientes inmunocomprometidos como en el S.I.D.A.

Técnicas de detección de anticuerpos antieritrocitos: la detección de anticuerpos antieritrocitos libres en el suero se realiza enfrentando el suero y como segunda opción, plasma del paciente en estudio contra eritrocitos de fenotipo conocido que sean representativos de la población del paciente.

Los eritrocitos de fenotipo conocido se denominan PANEL, que puede constar de 6, 10, 12 o 15 células que abarcan la mayoría de los antígenos raros de una población (K, Dia, Lea, Kpa, Lua, etc) y la ausencia de los antígenos que son frecuentes en la misma, o sea que hay sangres negativas a: s, P1, Fya, Fyb, k, Jka, Jkb, Lub, Dib, Kpb. Muchas veces no es posible conseguir todo esto en un número tan bajo de donadores y se procura armar el panel con las sangres más representativas de la población que se tiene en ese momento.

Para obtener buenos resultados en la investigación de anticuerpos es necesario tener bajo control todos los procesos porque cada etapa influirá en el fin que es la detección del anticuerpo.

Lavado de material: realizarlo con detergente neutro apropiado para laboratorio, debe ser exclusivo y no mezclarse con el material de otras secciones del laboratorio porque los residuos de álcalis y ácidos potentes neutralizan la reacción antígeno-anticuerpo, actúan sobre la superficie del eritrocito eliminando ácido siálico o incluso destruyendo los glóbulos rojos llegando a confundir con una reacción hemolítica en donde no la hay.

Separar los tubos nuevos de los rayados y deteriorados usando los primeros para realizar cualquier prueba que utilice suero de Coombs y dejando los segundos para pruebas de grupo AB0 y Rho(D).

Lavado de eritrocitos: siempre que se utilicen eritrocitos para cualquier estudio en Banco de Sangre deben ser lavados tres veces para ser enfrentados a los anticuerpos, ya sean de pacientes o monoclonales, excepto en la prueba de Grupo AB0 y Rho(D) de rutina, aquí deberán ser lavados cuando se demuestren incongruencias en las pruebas directa e inversa o que se detecte algún autotestigo positivo.

La relación de células/solución salina isotónica óptima será de 1/60 volúmenes repartidos en 3 lavados consecutivos.

Algo muy importante y que tiene vital importancia en el resultado final, es que en cada lavado los eritrocitos deben ser removidos totalmente de la pared del tubo por agitaciones suaves para evitar su deterioro y posteriormente agregarles

la salina formando un remolino suficiente para que todos las células queden resuspendidas homogéneamente en toda la barra de la salina agregada, de no ser posible esto por falta de práctica, es recomendable tapar la boca del tubo con parafilm para agitar por inversión. Lo anterior también es válido para todos los lavados que se realizan para llevar a prueba final de Coombs (salina-Coombs, Albúmina-Coombs, etc.).

Otro punto importante es la concentración final de eritrocitos a la que se trabajará: 2.5 – 4.0%. Después de lavar todas las células, corroborar su concentración para que cada una de ellas tenga la misma concentración, una variación entre cada tubo darán resultados diferentes al enfrentarlas a los anticuerpos en estudio.

Una concentración final muy baja de eritrocitos nos dificultará ver las aglutinaciones; una concentración muy alta volverá negativa la prueba en investigación de anticuerpos de poca concentración porque estos tendrán que repartirse entre los eritrocitos presentes y no alcanzarán para todos, obteniéndose una prueba negativa al agregar el Coombs en lugar de positiva débil o incluso en las de mediana aglutinación podrían volverse negativas.

Las temperaturas de incubación y sus tiempos deben ser los adecuados para cada técnica.

Procedimientos

1. Marcar tubos de 10x75 de la siguiente manera: 4 hileras marcadas según el número de células con que cuenta el panel en uso. A la primera marcarlos con una S (técnica salina), el segundo con A (albúmina), tercero con B (Bromelina) y cuarto con L (L.I.S.S.).
2. A los 3 primeros paneles: S, A, B ponerles 2 gotas de suero problema y una de eritrocitos de panel correspondiente y mezclar.

Salina: centrifugar los tubos 30 seg. Leer aglutinación, incubar 30 minutos a 22° C. Centrifugar, regresar los tubos a 22° C. Leer aglutinaciones, pasarlos a 37° C una hora, centrifugar, regresarlos al baño, leer aglutinaciones, lavar 3 veces los tubos, resuspendiendo muy bien los eritrocitos antes de agregar de nuevo la salina isotónica; en el último lavado retirar toda la salina remanente, agregar 2 gotas de suero de Coombs poliespecífico, centrifugar, leer las aglutinaciones, anotar resultados en hoja de trabajo.

Albúmina: agregar tres gotas de albúmina al 22 % (o 2 gotas de 30%), mezclar y centrifugar 90 seg., leer aglutinación e incubar durante 60 minutos a 37° C centrifugar 90 seg. Regresar a 37° C y leer aglutinación; lavar 4 veces y llevar a Coombs.

Bromelina: agregar una gota de Bromelina, incubar a 22° C durante 10 minutos, centrifugar, regresar al baño las

muestras y leer. Pasar a 37° C por 15 minutos, centrifugar, regresar a 37° C, leer, lavar 3 veces y llevarlos a Coombs.

Bromelina en 2 fases: numerar los tubos según el número de células del panel, poner una gota de Bromelina en cada tubo mas una gota de eritrocitos correspondientes, mezclar e incubar por 5 minutos a 37° C. Lavar 3 veces, agregar 2 gotas de suero problema, mezclar, incubar a 22° por 10 minutos, centrifugar, leer a 22° C, incubar a 37° C por 15 minutos, centrifugar, leer a 37° C, lavar 3 veces los tubos en estudio, agregar suero de Coombs, centrifugar y leer. Interpretar resultados.

LISS: poner dos gotas de LISS en cada tubo, agregar una gota de eritrocitos lavados y al 3-5%, según el número de tubo correspondiente, mezclar y centrifugar un minuto, decantar el sobrenadante a sequedad, poner nuevamente 1 gota de LISS, resuspender por agitación, agregar 2 gotas de suero problema y dos gotas mas de LISS, mezclar, centrifugar 30 seg., leer aglutinaciones, incubar 15 minutos a 37° C. Lavar 3 veces las células, agregar suero de Coombs, centrifugar 30 seg. Leer aglutinaciones y anotar resultados en hoja de trabajo.

Interpretar los resultados encontrados en cada técnica y a cada temperatura, observar si hay diferencias y similitudes entre las técnicas realizadas

Despegado por calor

1. Preparar albúmina bovina al 6 % con solución salina.
2. En un tubo de 13x100 poner volumen a volumen la solución anterior y los eritrocitos lavados.
3. Incubar a 56° C por 10 min. Agitar vigorosamente cada 2 minutos.
4. Centrifugar 2 minutos, regresar el tubo a 56 grados y separar el sobrenadante. Recentrifugar y decantar en tubo limpio, realizar con esto la investigación de anticuerpos.

Despegado por Cloroformo

1. Preparar una solución de albúmina al 6% con solución salina.
2. En un tubo de 13x100, poner volumen a volumen la solución anterior y el paquete de eritrocitos lavados. Agregar un volumen equivalente de cloroformo.
3. Tapar con tapón de caucho, mezclar vigorosamente por 15 seg., mezclar por inversión durante un minuto. Destapar con mucho cuidado para que no se proyecte el contenido. Poner el tubo a 56° C durante 5 minutos exactos; mezclando constantemente con un aplicador (pipeta pasteur). Centrifugar 5 minutos, pasar el sobrenadante a un tubo de 12x75, centrifugar 2 minutos, decantar el sobrenadante y realizar con él la investigación de anticuerpos.

Despegado por Tricloroetileno – Cloroformo

1. En un tubo de 13x100 poner volumen a volumen con solución salina los eritrocitos lavados, agregar igual volumen del reactivo, tapar el tubo, incubar a 37° C durante 5 a 10 minutos rotando constantemente con una inclinación de 45 grados hasta que se observe la hemólisis total.
2. Centrifugar 5 minutos, con pipeta pasteur recuperar el sobrenadante procurando no tocar la interfase ni el reactivo porque entonces todo se hemolizará.
3. Centrifugar nuevamente por 2 minutos, decantar y realizar el estudio de anticuerpos.

Estudio de anemia hemolítica autoinmune (AHAI), está caracterizada por un grupo de trastornos que llevan a la destrucción de eritrocitos con acortamiento en su vida media debido a la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra sitios antigénicos en dichas células. Puede presentarse como una forma primaria (ideopática), puede coexistir con otra enfermedad: Lupus eritematoso sistémico, Anemia perniciosa, artritis reumatoide, padecimientos malignos como Leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin y enfermedad de Hodgkin; o bien presentarse posterior a la administración de algún fármaco: alfa metil dopa, penicilina, etc.

En más de 80 % de los casos de anemia hemolítica auto inmune (AHAI) aparece un anticuerpo que reacciona a 37° C. La prueba directa de la antiglobulina es casi siempre positiva, y la indirecta en algunas ocasiones puede ser negativa. En más del 80% de los casos se detecta IgG en los eritrocitos, casi un 50% de éstos revelan la presencia de complemento y cerca del 10% pueden demostrar solo complemento.

En inmunohematología, el término auto anticuerpo se aplica a cualquier anticuerpo que reacciona frente al correspondiente antígeno presente en los propios eritrocitos del paciente, incluso si la reacción ocurre solo *in Vitro*, y tanto si causa efectos patológicos *in vivo* como si no los produce. Generalmente puede reaccionar contra todas las muestras de eritrocitos a los que se enfrente, así como con los propios del sujeto, si bien al realizar pruebas con los eritrocitos adecuados se observa que posee, como mínimo, un grado de especificidad.

La mayor parte de los autoanticuerpos eritrocitarios pueden clasificarse en “fríos” y “calientes”. Los fríos reaccionan más intensamente por debajo de los 22° C. Y a su vez se pueden subdividir en inocuos y en nocivos asociados con anemia hemolítica y/o con trastornos vasculares por exposición al frío. La especificidad de éstos generalmente es del sistema II.

Los autoanticuerpos calientes reaccionan más intensamente a 37° C. Y pueden clasificarse en nocivos o inocuos según se hallen o no asociados a una destrucción

de los eritrocitos., la malignidad no está relacionada con su intervalo térmico, sino más bien depende de las propiedades biológicas de las moléculas IgG específicas que componen el anticuerpo, así como del número y distribución de los correspondientes lugares antígenicos.^{7,9}

Laboratorio. Información previa necesaria

Historia Clínica del Paciente:

Historia Transfusional, gineco-obstétrica (en mujeres).

Pruebas de laboratorio: hemoglobina, hematocrito, cuenta de reticulocitos, bilirrubinas, DHL.

Estudios en banco de sangre: grupo AB0 y Rho(D). Resolución de discrepancias.

Investigación de anticuerpos antieritrocitos libres en el suero usando diferentes técnicas: salina, hiperproteica, enzimática.

Titulación de los anticuerpos detectados en el suero utilizando sangres R1R1, R2R2, rr, y en pacientes con transfusiones previas: considerar los fenotipos: Fy(a-b+), Fy(a+b-) Jk(a-b+), Jk(a+b-), fenotipos poco frecuentes para diferenciar los autoanticuerpos de posibles aloanticuerpos.

Coombs directo: titulación y especificidad (IgG, IgA, IgM, C3, C4)

Despegado de anticuerpos de los eritrocitos (eluido): titulación usando los fenotipos ya mencionados anteriormente.

Fenotipos eritrocitarios con células tratadas a pH ácido para eliminar los anticuerpos pegados. Fenotipos diferenciales en pacientes con transfusiones recientes (menos de 4 meses)

Siempre que se trabaja con el panel mestizo mexicano, las células deben ser lavadas tres veces o prepararlas en alsever y antibióticos (Cloranfenicol más eritromicina),

para evitar la molestia de hacerlo cada día.

En casos complejos de dos o más anticuerpos en un mismo suero se debe realizar absorciones y elusiones a 37° C. para poder separarlos.

La técnica de absorción-elusión servirá para dilucidar si en las aglutinaciones observadas se tienen un solo anticuerpo o si dentro de este está oculto uno o más. Es muy buena para determinar en las panaglutinaciones con auto testigo negativo si ésta se debe a un solo anticuerpo o varios mezclados.

En las AHAI., sirve para separar los alo de los autoanticuerpos.⁸ Con todo lo mencionado podemos darnos cuenta de la importancia que tiene para dar una sangre compatible: El diagnóstico del paciente, su historia transfusional, el conocimiento profundo de los principios y las técnicas empleadas así como de la interpretación y síntesis adecuados de todo ello.

Referencias

1. **Murphy MF.** Pamphilon DH. Practical Transfusion Medicine. Blackwell Science. WK. 1998.
2. The antiglobulin test. Technical manual. 12ª. Ed. AABB. cap. 11. US. 1996
3. **Raichle TL, Paranto ME.** Compatibility testing. En: Hardening MD. Modern blood banking and transfusion practices. Philadelphia:FA Davis; 1994.p.256-75
4. **Radillo González A.** Medicina Transfusional. Editorial Prado. México.1999.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA-1993, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. México: Secretaría de Salud, 1994.p.1-75
6. **Petz LD, Garratty G.** Antiglobulin sera, past, present and future. Transfusión 1978;18:257.
7. **Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M.** Blood Transfusion in Clinical Medicine. 10ª. Ed. UK. Edit. Blackwell Science, 1997.
8. **Mendoza Pitzi MG.** Procedimientos Técnicos de Control de calidad de la sangre y sus componentes. Banco Central de Sangre. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.1992.
9. **Sir John Dacie.** The Auto-Immune Haemolytic Anaemias. Third Edition. UK. 1992.