

Primera versión: 31 de marzo de 2006

Versión definitiva: 19 de julio de 2006

Aceptado: 27 de julio de 2006

Ruth Bonilla-Zavala

Importancia de las pruebas cruzadas y de la búsqueda de anticuerpos

RESUMEN

Las pruebas cruzadas y la búsqueda de anticuerpos son de suma importancia, ya que permiten que los antígenos y anticuerpos puedan ser detectados y estudiados en el laboratorio; nos ayudan a prevenir la transfusión de sangre incompatible, y proveen al paciente de máxima seguridad y beneficio. Antes de realizar cada procedimiento es muy importante contar con un excelente control de calidad, el cual nos permitirá verificar todos los procesos y etapas que influirán en la detección de los anticuerpos. Las pruebas cruzadas normalmente se llevan a cabo en cuatro fases: lectura rápida, lectura de 37°, lectura 37°/Coombs, validación con eritrocitos sensibilizados. El medio que rodea la prueba está muy relacionado con los potenciadores y con la fuerza iónica que favorece la reacción antígeno-anticuerpo, por lo que debe ser capaz de detectar anticuerpos activos a bajas temperaturas y diferenciar entre reacciones positivas verdaderas y falsas.

La investigación de anticuerpos irregulares libres en suero se debe realizar por lo menos con dos técnicas. Una segunda técnica puede ser un medio hiperproteico como albúmina, o enzimas como bromelina o LISS, siendo esta última la más eficaz.

SUMMARY

Crossed tests and the search of antibodies are of extreme importance, since they allow the detection and laboratory testing of antigens and antibodies. They help us to prevent the transfusion with incompatible blood, and to provide the patient with maximum security and benefit. Before making each procedure, it is very important to count with an excellent control of quality, which allows us to have under control all the processes and stages that will influence the detection of antibodies. Crossed tests are normally carried out in four phases: fast reading, reading of 37°, reading 37°/Coombs, validation with E. Sensitized. The means that surround the test are closely related to the potentiators and the Ionic Force that favors the reaction antigen-antibody, and must be able to detect active antibodies to low temperatures and to tell true from false positive feedbacks. The investigation of free irregular serum antibodies must be made at least with two techniques. One second technique can be hyperprotein means like albumin, or enzymes like bromelina or LISS, being this one the most effective one.

Ottenberg (1908) fue el primero en aplicar el descubrimiento de Landsteiner de los grupos sanguíneos a la práctica transfusional, al comprobar como prueba previa a la transfusión, si el suero del receptor causaba lisis y aglutinación de los hematíes del donante.¹ El avance científico y tecnológico de la inmunohematología ha conducido al desarrollo de técnicas moleculares que permiten identificar la presencia o ausencia

de una secuencia genética que codifica para una proteína específica, así como técnicas de citometría de flujo y western blot para evaluar la expresión de un antígeno en la membrana eritrocitaria; sin embargo, dentro de los nuevos conceptos debemos eliminar pruebas que no son esenciales, disminuir costos, utilizar protocolos simples y seleccionar adecuadamente los métodos, la temperatura, período de incubación y

Química Farmacobióloga
Banco Central de Sangre,
Centro Médico Nacional
Siglo XXI, Instituto
Mexicano del Seguro
Social.

Comunicación con:
Ruth Bonilla-Zavala
Tel.: 5571 0430
Dirección electrónica:
ruthbz33@hotmail.com

Palabras clave:

✓ prueba de
compatibilidad

Key words:

✓ compatibility
test

diferentes sustancias que aceleran y modifican la reacción antígeno-anticuerpo: albúmina humana, bovina, bovina polimerizada a 19, 22 y 30 por ciento. Enzimas como bromelina, fisina, papaína y tripsina, LISS (solución de baja fuerza iónica), columnas de gel, polietilenglicol (PEG), polibreno.²

La prueba de compatibilidad es un ensayo *in vitro* de lo que puede suceder en el paciente al recibir la transfusión de un componente sanguíneo, por lo que es de suma importancia, ya que permite que los antígenos y anticuerpos puedan ser detectados y estudiados en el laboratorio; también ayuda a prevenir la transfusión de sangre incompatible, y provee al paciente el máximo de seguridad y beneficio. La metodología varía según los recursos del servicio y la urgencia del caso, aunque de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-003-SSA-1993) siempre debe incluirse la técnica de antiglobulina humana como mínimo. Las técnicas en medio proteico y con enzimas proteolíticas pueden ser útiles para la distinción de la especificidad de un anticuerpo.³

Internacionalmente se han establecido los siguientes procedimientos:

- Solicitud de producto y datos relevantes del receptor.
- Identificación y colección de las muestras sanguíneas del receptor.
- Estudios y pruebas del donador.
- Determinación del grupo ABO y Rho (D) del receptor.
- Detección de anticuerpos irregulares.
- Selección de componentes ABO y Rho (D) apropiados para el receptor.
- Comparación entre resultados actuales y el historial de las pruebas transfusionales realizadas con anterioridad.^{2,4}

Antes de efectuar cada procedimiento es muy importante contar con un excelente control de calidad, el cual nos permite verificar todos los procesos y etapas que influirán en la detección de los anticuerpos, con lo que se podrán obtener resultados confiables y seguros.

Lavado de material

Se debe realizar con detergente neutro apropiado para laboratorio, éste debe ser exclusivo, de tal forma que no debe mezclarse con el material de otras secciones del laboratorio, ya que los residuos de álcalis y ácidos potentes neutralizan la reacción antígeno-anticuerpo, actúan sobre la superficie del eritrocito eliminando el ácido siálico o incluso destruyendo los glóbulos rojos, llegándose a confundir con una reacción hemolítica donde no la hay.

Material de vidrio

Se deben separar los tubos nuevos de los rayados y deteriorados. De tal forma que los nuevos sirvan para cualquier prueba que utilice suero de Coombs y los rayados para pruebas de grupo ABO y Rho(D).

Control de células y reactivos

Lavado de eritrocitos

Siempre que se utilicen eritrocitos para cualquier estudio en un banco de sangre deben ser lavados tres veces para enfrentarlos a los anticuerpos, la relación de células/solución salina isotónica óptima será de 1/60 volúmenes repartidos en 3 lavados consecutivos. Algo de 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 todas las células queden resuspendidas homogéneamente en toda la barra de salina agregada, de no ser posible esto por falta de práctica es recomendable tapar la boca del tubo con parafilm y 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).

La concentración final de eritrocitos a la que debe trabajarse es de 2.5 a 4.0 por ciento.

Después de lavar todas las células se debe corroborar que cada una de ellas tenga la misma concentración, ya que una variación entre cada tubo dará resultados diferentes al enfrentarlas a los anticuerpos en estudio.

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

Pruebas cruzadas

Las pruebas cruzadas normalmente se llevan a cabo en cuatro fases:

Lectura rápida, lectura de 37°, lectura 37°/ Coombs, validación con eritrocitos sensibilizados. El medio que rodea la prueba está muy relacionado con los potenciadores y con la fuerza iónica que favorece la reacción antígeno-anticuerpo, por lo que debe ser capaz de detectar anticuerpos activos a bajas temperaturas y diferenciar entre reacciones positivas verdaderas y falsas.

Consta de tres partes: 1. Prueba mayor (D), 2. Prueba menor (R), 3. Prueba autotestigo (AT):

1. Prueba mayor (D) o del DONADOR:

- a) Sirve para confirmar si existe compatibilidad ABO entre el receptor y el donador.
- b) Detecta anticuerpos en el suero del paciente que no se hayan demostrado en la prueba de tamizaje (porque el antígeno correspondiente no estaba presente en las células detectoras o eritrocitos de fenotipo conocido, PANEL).

Se utilizan 2 gotas de suero del receptor más 1 gota de eritrocitos lavados del donador.

2. Prueba menor (R) o del RECEPTOR:

- a) Detecta anticuerpos irregulares en el suero del donador y ratifica algún error de clasificación ABO/Rh.

Se realiza con 2 gotas de suero o plasma del donador más 1 gota de eritrocitos del receptor.

3. Prueba autotestigo (AT):

- a) Permite detectar una prueba de antiglobulina directa positiva, así como la presencia

de rouleaux y otras anormalidades autoinmunes (AHAI).

Se realiza con 1 gota de eritrocitos del receptor más 2 gotas de suero del receptor.

Ruth Bonilla-Zavala.
Pruebas cruzadas

Detección de anticuerpos libres en suero: se realiza enfrentando el suero del paciente o receptor con eritrocitos de fenotipo conocido (PANEL).

La investigación de anticuerpos irregulares libres en suero se debe realizar por lo menos con dos técnicas: la primera siempre será la salina llevada hasta la fase de Coombs, ya que en la mayoría de los casos permite diferenciar la IgM en su fase rápida a 22 y 37 °C de la IgG en la fase de Coombs; y la segunda puede ser un medio hiperproteico como albúmina, o enzimas como bromelina o LISS, siendo esta última la más eficaz.

Interpretación de detección de anticuerpos y pruebas cruzadas

A) Anticuerpos negativos y prueba cruzada compatible. Una detección de anticuerpos negativa no garantiza que el suero se encuentre libre de anticuerpos eritrocitarios clínicamente significativos, sólo indica que no contiene anticuerpos reactivos. Tampoco una prueba cruzada compatible indica una supervivencia eritrocitaria normal, por ello debe realizarse conjuntamente con un tamiz para anticuerpos, o bien diferentes técnicas tanto para anticuerpos como pruebas cruzadas.^{5,6}

B) La detección de anticuerpos, las pruebas cruzadas o ambas pueden ser positivas. Lo anterior puede deberse a la presencia de aloanticuerpos, autoanticuerpos, interacciones adversas con reactivos y formación de rouleaux. Si hay múltiples anticuerpos o un anticuerpo que reacciona con un antígeno de alta incidencia o si el anticuerpo está presente en concentraciones muy bajas deben usarse técnicas específicas como elusión, absorción o la combinación de las mismas.

C) Prueba cruzada incompatible, anticuerpos irregulares negativos. Se puede presentar cuando la concentración del

anticuerpo es muy baja y sólo se detecta con células frescas, también ocurre cuando las células del panel de eritrocitos de fentipo conocido no tienen el antígeno de la población en estudio.

combinan varias metodologías para tener un amplio panorama de detección de acuerdo al rango térmico de acción de cada anticuerpo, así como el medio en el cual se pueden potenciar o destruir, principalmente cuando existe mezcla de los mismos.

Conclusión

Las pruebas cruzadas y la búsqueda de anticuerpos son de suma importancia, ya que permiten que los antígenos y anticuerpos puedan ser detectados y estudiados en el laboratorio; ayudan a prevenir la transfusión de sangre incompatible y proveen al paciente el máximo de seguridad y beneficio. Aunque a primera vista pareciera que se trata de un tema muy conocido para quien realiza las pruebas, es importante que se tomen en cuenta los pasos y procedimientos por realizar, con énfasis en el control de calidad. En las pruebas cruzadas incompatibles es crucial el cuidado en todo el estudio del paciente, el protocolo a seguir y la correcta interpretación de los resultados; no debe perderse de vista que en las técnicas básicas existen muchas limitaciones, por ello se

Referencias

1. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine*. Tenth edition. Oxford, USA United Kingdom: Blackwell Science; 1997. p. 632-646.
2. Brecher ME. *Technical manual*. Fourteenth edition. Bethesda, Maryland: AABB; 2003. p. 379-395.
3. Rodríguez-Moyado H, Quintanar-García E, Mejía-Arregui M. *El banco de sangre y la medicina transfusional*. México: Panamericana; 2004. p. 239-258.
4. Linares G. Jesús. *Inmunohematología y transfusión. Principios y procedimientos*. Caracas, Venezuela: Cromotip. 1986. p. 151-177.
5. Cheng MS. *Delayed reaction following ABO – incompatible transfusion (letter)*. *Transfusion* 1995; 35:791.
6. Padgett BJ, Hannon JL. *Variations in pretransfusion practices*. *Immunohematology* 2003; 191(1):1-6. 