



Preparación de células control para la prueba de antiglobulina humana

Pedro Sánchez Frenes,* Yusimí Cuellar Contreras,[‡] María de Jesús Sánchez Bouza,[§] Mayra Oropesa Castellón,^{II} Katherine Reinaldo Morera,^{II} Sonia Collazo González^{II}

Palabras clave:

Prueba de
antiglobulina humana,
imunohematología,
métodos de
laboratorio, células
control.

Key words:

Human
antiglobulin test,
immunohematology,
laboratory methods,
checks cells.

* Doctor en Medicina. Especialista de primer y segundo grado en Laboratorio Clínico. Profesor auxiliar. Máster en Salud Pública. Investigador agregado. Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos.

[‡] Licenciada en Biología. Profesora asistente. Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos.

[§] Doctora en Medicina. Especialista de primer y segundo grado en Bioquímica Clínica. Profesora auxiliar. Máster en Enfermedades Infecciosas. Investigadora agregada. Universidad de Ciencias Médicas «Raul Dorticos Torrado».

Recibido:
21/12/2013.
Aceptado:
06/03/2014.

RESUMEN

Introducción: Las células rojas reactivas se emplean en bancos de sangre y servicios de transfusiones como control analítico ante un resultado negativo de la prueba de antiglobulina humana. Su uso no es universal en nuestro medio debido, fundamentalmente, a la disponibilidad insuficiente de células comerciales y a la corta durabilidad de las células preparadas por el propio laboratorio. **Objetivo:** Desarrollar una metodología, tomando como base los métodos tradicionales, para la preparación de células rojas reactivas. **Material y métodos:** Se utilizaron eritrocitos O de fenotipo conocido proveniente de un donante regular de células y plasma hiperinmune anti D con título de anticuerpos 1/32 de un dador habitual de plasma por aféresis productiva. Se preparó suspensión de eritrocitos lavados débilmente, sensibilizados siguiendo procedimientos establecidos, utilizando solución SAGM como conservante. Se evaluaron parámetros físico-químicos e inmunohematológicos del producto inmediatamente después de elaborado y semanalmente para conocer su estabilidad. **Resultados:** Las células rojas preparadas mostraron ser funcionalmente adecuadas para su uso in vitro como control de calidad en la prueba de Coombs, con una estabilidad hasta los 30 días de conservación. Se considera que el método resulta adecuado para los propósitos iniciales ya que proporciona células controles sin necesidad de tratamiento previo ni de recurrir frecuentemente al donante, siendo sencilla y económica su elaboración.

ABSTRACT

Introduction: Reagent red cells are used in blood banks and transfusion services as analytical control before a negative result of the human antiglobulin test. Their use is not universal due, fundamentally, to the insufficient availability of commercial cells and the short life span of the cells prepared by the laboratory. **Objective:** To develop a methodology for the preparation of checks cells based on traditional methods. **Material and methods:** We used erythrocytes O of a known phenotype from a regular cell donor and hyperimmune anti D plasma with antibody titer 1/32 of a regular plasma donor by apheresis production. A weakly washed erythrocyte suspension was prepared, sensitized following established procedures, using SAGM solution as preservative. Physicochemical and immunohematologic parameters were evaluated immediately after the preparation and weekly to record their stability. **Results:** The check cells prepared proved to be functionally suitable for their use in vitro as quality control in the Coombs test, with a 30-day life span. The method is appropriate for the initial purposes as it provides check cells without the need of prior treatment, or frequent recourse to the donor, its preparation being simple and economical.

INTRODUCCIÓN

Los métodos usualmente empleados en el laboratorio de inmunohematología evidencian la reacción entre un anticuerpo y su antígeno correspondiente a través de la aglutinación con el empleo de reactivos que pueden agruparse en cuatro grupos básicos: células rojas reactivas, antiseros que contienen anticuerpos dirigidos a antígenos específicos, suero de antiglobulina humana (AGH) –que detectan inmunoglobulinas y/o complemento–

y potenciadores –que mejoran la detección de anticuerpos–.^{1,2}

Dentro del primer grupo, las células rojas reactivas son utilizadas ampliamente con diferentes propósitos: corroborar grupo sanguíneo celular mediante la determinación del grupo sanguíneo serológico del sistema ABO, detectar e identificar anticuerpos atípicos diferentes a los del sistema ABO (células de pesquisa y de panel celular), para el control de calidad de reactivos y ensayos de laboratorio utilizados de manera rutinaria en los bancos de sangre

[‡] Licenciada en Tecnología de la Salud. Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos.

[†] Licenciada en Química. Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos.

Correspondencia:
E-mail:
pedrosf@agua.cfg.
sld.cu

y servicios de transfusiones, como la prueba de Coombs.³

Las células para el control de Coombs (CC) son células rojas humanas del grupo O Rh positivo recubiertas con anticuerpos de la clase IgG anti D. Se añaden a cualquier resultado de prueba antiglobulina humana negativa, se centrifuga y luego se comprueba la aglutinación. El resultado debe ser positivo después de la adición de las células control de Coombs. Estas células «check» permiten asegurarse de que el procedimiento se ha realizado correctamente. Si las células control de Coombs no hacen la reacción positiva, la prueba no es válida. Dentro de las posibles causas de este resultado podrían citarse el no haber añadido el suero AHG a los tubos, el lavado inadecuado de las células o el deterioro del reactivo de AHG, entre otras.³ Es por ello que la utilización de estas células en las pruebas de laboratorio que empleen el suero de Coombs como reactivo principal son requeridas en los estándares para bancos de sangre y servicios de transfusiones de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB), por constituir un sistema de control analítico ante un resultado negativo de la prueba de antiglobulina humana. A pesar de ello, su empleo no es universal en nuestro medio debido, fundamentalmente, a la disponibilidad insuficiente de células comerciales y a la corta durabilidad (máximo 24 horas) de las células preparadas por el propio laboratorio.¹⁻⁴

Este trabajo describe una metodología para la preparación de células rojas reactivas útil en el control de la prueba de Coombs, desarrollada a partir de los métodos tradicionales en el Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio descriptivo–prospectivo realizado en el Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos durante los meses marzo a mayo de 2013.

Técnicas

Preparación de células reactivas. Se utilizaron eritrocitos O de fenotipo conocido (cc D Ee K-)

proveniente de un donante regular de células. El plasma hiperinmune anti D con título de anticuerpos 1/32 se obtuvo de un dador habitual de plasma por aféresis productiva; ambos, negativos a pruebas virológicas establecidas.⁵

Se procedió de la siguiente manera:

1. Se preparó un concentrado de eritrocitos lavados (CEL) a partir de una unidad de sangre total siguiendo procedimientos establecidos,⁵ separándose al final en dos unidades de 100 mL cada una.
2. Se adicionó gentilmente el doble de volumen de plasma anti D a cada bolsa de CEL, se incubaron en baño María a 37 °C por espacio de una hora.
3. Se lavaron seis veces en solución salina a 0.9% y se preparó una suspensión de hematíes entre 3 y 5% en solución SAGM.
4. Se almacenó en las propias bolsas plásticas a 4 °C, tomándose muestras para la evaluación inicial y periódica de la calidad.

Control de calidad: Inmediatamente después de preparada la suspensión globular y semanalmente, se evaluaron parámetros físico-químicos e inmunohematológicos reglamentados.⁶ Los parámetros físico-químicos se determinaron utilizando la solución sobrenadante de las células preparadas e incluyeron determinación de pH, concentración de potasio y prueba de hemólisis. Se utilizó para las dos primeras pruebas el analizador para gases sanguíneos Cobas 121 Roche Diagnostics, mientras que el grado de hemólisis se determinó por inspección visual.

Grado de hemólisis:³

Grado I - Halo de 5 mm por encima de la capa de hematíes.

Grado II - Halo de 5 a 10 mm por encima de la capa de hematíes.

Grado III - Hemólisis total del sobrenadante.

Los exámenes inmunohematológicos persiguieron determinar el grado de sensibilización de los hematíes a través del puntaje obtenido en la aglutinación de la prueba de Coombs

directa y la funcionabilidad de éstas al ser añadidas en la etapa final de la técnica de determinación de anticuerpos irregulares, además de la presencia de autoaglutinación. Para todos los casos, se utilizó antiglobulina humana poliespecífica (anti IgG y anti C3d) de Centis Diagnósticos, La Habana, Cuba, siguiendo los procedimientos establecidos.⁵

Lectura aglutinación:⁷

4 + Aglutinación total en un solo cúmulo grande en un fondo claro.

3 + Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro.

2 + Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.

1+ Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.

± Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos. Para los propósitos del estudio, se considera negativo.

0 Ausencia de aglutinación.

RESULTADOS

Las células rojas preparadas quedaron débilmente sensibilizadas con IgG al revelar, mediante la prueba de Coombs directa, un grado de aglutinación 3+/2+ sin presentar autoaglutinación, indicando ser funcionalmente adecuadas para su uso in vitro como control de la prueba de Coombs.

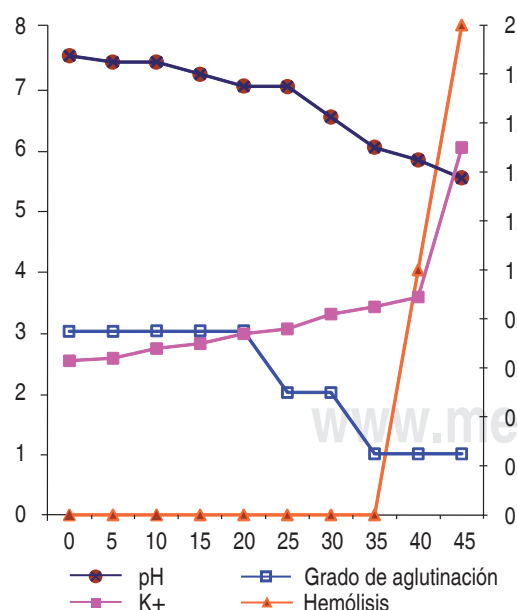


Figura 1. Efecto de la conservación de células sobre parámetros físico-químicos e inmunohematológicos.

Éstas mostraron ser estables hasta los 30 días de conservación, según los resultados expuestos en la figura 1.

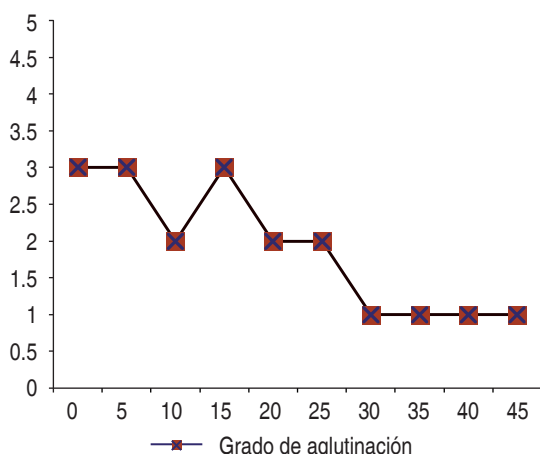
La variación del pH manifiesta los cambios que ocurren en la composición del medio; en este caso, se observó que el pH inicialmente se mantuvo alrededor de cifras fisiológicas, descendiendo sus valores a partir de los 30 días de almacenamiento. La concentración de iones K⁺ en la solución sobrenadante mostró un gradual ascenso hasta duplicar la cifra inicial. La prueba de hemólisis resultó negativa hasta el día 35; posteriormente, expresó un grado de hemólisis de I y II. Por otra parte, la suspensión celular no presentó autoaglutinación durante todo el tiempo del estudio y demostró estar debidamente sensibilizada hasta el día 40, en que comenzó a expresar grado de aglutinación por debajo de 2+.

Los resultados de la utilización de las células como control de calidad en la determinación de anticuerpos irregulares (prueba de funcionabilidad) se reflejan en la figura 2; en todos los casos, mostró un grado de aglutinación entre 3+ y 2+, comenzando a declinar a partir de los 30 días de conservación.

DISCUSIÓN

Al diseñar la metodología de preparación de estas células, se tuvo en cuenta que la unión del complejo antígeno anticuerpo es una reacción reversible regida por la ley de acción de masas; su constante de equilibrio es afectada por las concentraciones de antígeno y anticuerpo y por

Días	Físico-químicos			Inmunohematológicos	
	Hemólisis	pH	K+ mol/l	Autoaglutinación	Coombs directo
0	Negativa	7.5	0.63	Negativa	3+
5	Negativa	7.4	0.64	Negativa	3+
10	Negativa	7.4	0.68	Negativa	3+
15	Negativa	7.2	0.70	Negativa	3+
20	Negativa	7.0	0.74	Negativa	2+
25	Negativa	7.0	0.76	Negativa	2+
30	Negativa	6.5	0.82	Negativa	2+
35	Negativa	6.0	0.85	Negativa	2+/1+
40	I	5.8	0.89	Negativa	1+
45	II	5.5	1.50	Negativa	1+



Días	Número de muestras	Aglutinación en grado
0	20	3+
5	21	3+
10	23	2+
15	19	3+
20	27	2+
25	20	2+
30	13	2+/1+
35	20	1+
40	20	1+
45	21	1+

Figura 2. Ensayo funcional con la determinación de anticuerpos irregulares en donantes de sangre.

condiciones físicas como pH, temperatura, tiempo de incubación, etcétera.^{7,8}

Para lograr el recubrimiento débil de los células, se utilizó el doble volumen de plasma con potencia 1/32 con relación a los eritrocitos, comprobándose a través del grado de aglutinación de la prueba de Coombs directa de 3+/2+, según recomiendan diferentes autores, además de las ventajas económicas de utilizar plasma hiperinmune anti D en sustitución del suero hemoclasificador anti D.^{3,7}

La temperatura de incubación de 37 °C facilita la unión del anticuerpo IgG anti D con su antígeno correspondiente, debido al carácter endotérmico de esa reacción. Además, el tiempo de incubación durante una hora garantiza que más de 75% de los anticuerpos IgG anti D presentes en la muestra se fijen a las determinantes antigénicas de los eritrocitos.⁷⁻⁹

Por último, el empleo de seis lavados de la suspensión de células después de ser recubiertas por el anticuerpo fue necesario para descartar el plasma y evitar la formación de pequeños coágulos que pudieran confundirse con aglutinaciones, además de prevenir reacciones falsas negativas por la neutralización del suero de Coombs con algunos anticuerpos y proteínas plasmáticas que se encuentran solubles en el plasma.⁹ Por otra parte, las desventajas teóricas que posee la utilización de plasma en relación con el suero en las determinaciones de anticuerpos irregulares—debido a que los anticoagulantes podrían inhibir la activación del complemento—resultan también reducidas con el empleo de la remoción por sucesivos lavados del plasma sobrenadante.¹

El tiempo de almacenamiento de hematíes en solución preservadora-anticoagulante está definido hasta 42

días para uso en hemoterapia. En contraste, las células preparadas mostraron ser estables hasta los 30 días. Se debe tener en consideración que las células conservadas para uso clínico difieren en concentración, volumen y metodología de elaboración y conservación a las aquí preparadas con fines diagnóstico.¹⁰

Aunque las soluciones preservadora-anticoagulante contribuyen a la estabilización metabólica de las células sanguíneas almacenadas, ellas prosiguen su actividad metabólica, consumen nutrientes y agotan las fuentes energéticas intracelulares (B). El descenso del pH constatado en el estudio podría favorecer la disociación del anticuerpo IgG anti D fijado al hematíe por modificación de su constante de equilibrio, disminuyendo la potencia de aglutinación observada, así como cierto grado de hemólisis observado a partir del día 35 de conservación.⁷⁻¹⁰

A pesar de esto, se considera que el método resulta adecuado para la conservación de células rojas reactivas en medio líquido para uso diagnóstico, ya que permite la utilización de éstas sin necesidad de tratamiento previo, sino que se encuentran «listas para usar»; no es necesario recurrir frecuentemente al donante, se pueden reutilizar y el método de preparación es sencillo y económico.

REFERENCIAS

1. Klein HG, Anstee DJ. Blood grouping techniques. En: Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 11th edition. Oxford: Blackwell Publishing; 2006. pp. 299-351.
2. Bencomo Hernández A, Alfonso Valdés ME. Detección de anticuerpos IgA e IgM en la prueba de antiglobulina (Coombs). Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2010; 26 (4). [citado 5 de diciembre de 2012]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol26_4_10/hih09410.htm

3. Luberta Lugo A, Leyva Torres JL, Gallardo Rodríguez E. Conservación de células rojas reactivas en dos soluciones de resuspensión: AS-1 y AS-2. [Internet]. 2001. [Citado 12 de mayo de 2013]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol2_1_02/Uni03101.htm
4. Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide. Standards for blood banks and transfusion services [Internet]. 26th edition. Bethesda: AABB; 2009.
5. Ballester Santovenia JM, Alfonso Valdés ME, Ballester Planes L, Bencomo Hernández A, Cortina Rosales L, Macías Abraham C et al. Procedimientos para bancos de sangre y servicios de transfusión. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2009.
6. Franco E. El control de la calidad de los análisis inmunohematológicos en la región de las Américas. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 2003; 13. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v13n2-3/15736.pdf>
7. Bencomo Hernández A, Alfonso Valdés ME, Alfonso Valdés Y, Díaz Salazar M. Procedimientos para la determinación e identificación de anticuerpos eritrocitarios. Pruebas de compatibilidad pretransfusional. En: Suardíaz Pareras JH, Cruz Rodríguez CL, Colina Rodríguez AJ. *Laboratorio Clínico*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2004. pp. 575-591.
8. Klein HC, Anstee DJ. Immunology of red cells. En: Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 11th edition. Oxford: Blackwell Publishing; 2006. pp 48-113.
9. Villalobos Calero YV. Seminario de prueba de Coombs 2013. SlideShare, Inc [Internet]. 2013 [citado 17 de diciembre de 2013]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/rapboy/seminario-de-prueba-de-coombs>
10. Kakaiya R, Aronson CA, Julleis J. Whole blood collection and component processing. En: Technical manual. 16th ed. Bethesda: MD American Association of Blood Banks; 2008. pp. 189-228.

www.medigraphic.org.mx