

## Artículo de revisión

# El laboratorio de inmunohematología

Lilia Rodríguez Sánchez\*

## Introducción

A lo largo de los años el trabajo del laboratorio dentro de los servicios de transfusión ha sufrido cambios importantes, entre los que se encuentran migrar de técnicas manuales a tecnologías automatizadas, siendo obligado asegurar el control del proceso. Asimismo, la demanda en la atención ha ido en aumento, es imperioso trabajar bajo estándares de calidad en todos los laboratorios y es necesario contar con sistemas efectivos que permitan gestionar la calidad.

Un punto determinante en la calidad es contar con personal capacitado y actualizado que sea capaz de resolver problemas transfusionales, dilucidar discrepancias en grupos sanguíneos, aplicar programas de control de calidad de procesos y analizar resultados que permitan aplicar una terapia transfusional adecuada y otorgar el componente idóneo para el beneficio de los pacientes que atendemos.

El presente escrito brinda algunas bases de trabajo en el laboratorio de inmunohematología.

## El control de calidad en el laboratorio de inmunohematología

En la normativa nacional se establece que todos los laboratorios deben aplicar programas de

control de calidad, asegurar el proceso desde la obtención de las muestras hasta la emisión de resultados.

Algunos laboratorios cuentan con sistemas informáticos que permiten tener trazabilidad y reducir al mínimo las fuentes de error.

El control de calidad dentro del laboratorio debe llevarse desde la fase preanalítica, analítica hasta la postanalítica.<sup>1,2</sup>

**Etapa preanalítica:**<sup>3</sup> en esta etapa se incluyen la valoración médica, elaboración de solicitudes al laboratorio, identificación correcta del paciente, etiquetado de tubos y la flebotomía (toma de muestras). Se han identificado como fuentes de error más comunes: datos incompletos o erróneos en solicitudes, tubos mal etiquetados, tubos no adecuados para el estudio, volumen inadecuado para estudios, entre otros.

Las solicitudes de estudios para el laboratorio de inmunohematología idealmente deben contener los siguientes datos del paciente: edad, género, diagnóstico, antecedentes patológicos, antecedentes transfusionales, fecha de última transfusión, si ha presentado reacciones adversas y en caso de haberse presentado, de qué tipo han sido, antecedentes gineco-obstétricos (mujeres), si hubo antecedentes de enfermedad hemolítica perinatal o del recién nacido (EHPN) y tratamiento farmacológico recibido.

\* Jubilada. Banco Central de Sangre Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Etapa analítica:**<sup>3</sup> en esta etapa se contempla todo el procesamiento analítico de las muestras e implica el control de:

- A. Las muestras.
- B. Los reactivos.
- C. Los métodos analíticos.
- D. Control de material de vidrio (limpieza).

### **A. Las muestras**

La calidad de las muestras puede verse afectada por las técnicas de extracción, separación, conservación y del origen.

- **Extracción:** la flebotomía debe realizarse de manera adecuada evitando ocasionar hemólisis mecánica que crearía confusión en el estudio.
- **Separación y conservación:** los tubos de sangre coagulada deben separarse perfectamente en un lapso no mayor de cuatro horas para evitar que el complemento se degrade; en caso de no trabajarlas el mismo día el suero y/o plasma deben conservarse en temperatura de congelación (-18 °C a -20 °C) y todas las muestras que contengan eritrocitos deben conservarse en temperatura de refrigeración (de 2 °C a 6 °C); el plasma puede utilizarse para la investigación de anticuerpos fuera del sistema ABO, considerando su afectación al complemento debido a que algunos anticoagulantes actúan quelando el calcio, que es necesario para la fijación del complemento al eritrocito; algunos anticuerpos como los anti-Duffy o anti-Kidd fijan el complemento.
- **Origen:** es importante conocer la procedencia de la muestra. Algunas muestras como las de sangre de cordón umbilical o con hiperproteinemia pueden ocasionar que se presente una aglutinación debida al medio y no por anticuerpos, por lo que en estos casos los

eritrocitos del paciente deben lavarse perfectamente utilizando solución salina 0.9% o solución amortiguadora pH 7. Si se trata de un paciente recién transfundido considerar que pudieran presentarse dobles poblaciones celulares, si el paciente es un recién nacido menor de seis meses los anticuerpos son transferidos pasivamente de la madre al RN, etc. En pruebas de compatibilidad de concentrados plaquetarios, sobre todo los obtenidos por aféresis, la muestra piloto del componente deberá centrifugarse perfectamente con el fin de evitar interferencia por las plaquetas.

### **B. Los reactivos**

Los reactivos utilizados en el control de calidad interno son:

#### 1. Células de fenotipo conocido:

Las células deben inspeccionarse antes de su uso, no deben presentar hemólisis, cambio de color, autoaglutinación, contaminación bacteriana, coágulos, etc. La concentración es muy importante, ya que dependerá si la prueba se realiza en tubo (2-4%) o en tarjeta (revisar inserto de la técnica). Pueden utilizarse soluciones para su conservación, siempre y cuando éstas no alteren o modifiquen la estructura y expresión antigénica.

#### 2. Antisueros:

Los criterios y especificaciones que deben cumplir los reactivos hemoclasificadores se encuentran referenciados en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos como: origen (monoclonales, humanos), código de colores, pH, avidéz, títulos, potencia, etc. siendo de vital importancia siempre revisar el inserto del reactivo antes de su uso.

### 3. Control de calidad de los antisueros:

Deberá llevarse registro del control interno de calidad de los reactivos **cada día de uso**, a excepción de la titulación esta prueba se realizará al estreno del lote con una muestra aleatoria. **Lo primero que debe hacerse es revisar el inserto, fecha de caducidad y número de lote.**

Los parámetros a controlar son: aspecto físico, efectuar prueba de avidéz, prueba de especificidad, titulación y potencia:<sup>4</sup>

**a. Aspecto físico:**<sup>4</sup> Todos los reactivos que se utilicen en el laboratorio deben revisarse físicamente, no deben presentar hemólisis, turbidez, precipitados, partículas, formación de geles en el sobrenadante, contaminación bacteriana o cualquier otra anomalía. En el caso de las tarjetas de gel deberá apreciarse un volumen uniforme en todos los pocillos, sin gotas de gel en la cámara de reacción, debe observarse claramente la diferencia entre el gel y el sobrenadante, sin cambio de coloración y su consistencia debe ser uniforme, libre de burbujas y/o partículas extrañas.<sup>5</sup>

**b. Prueba de avidéz:**<sup>4</sup> La avidéz es el tiempo máximo en segundos (s) que tarda en reaccionar un anticuerpo con su antígeno correspondiente a temperatura ambiente (de 18 a 22 °C) Para la realización de la prueba de avidéz del anti-D es importante revisar especificaciones del reactivo, podría ser necesario calentar a 37°C la placa. **Esta prueba no aplica a la tecnología en gel (Figura 1).**

**c. Prueba de especificidad:**<sup>4</sup> Es la característica que presentan los anticuerpos al reaccionar únicamente con su antígeno específico. Esta prueba aplica a los métodos que utilizan tubos y tecnología en gel.

#### c. 1 Para reactivos anti-A, B, AB y D

- Técnica en tubo.

Se enfrentan las células A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O si se cuenta con ellas contra los antisueros anti-A, anti-B, anti-A,B y anti-D y control como se muestra en el cuadro I.

Se colocan células en una concentración de 2 a 4% y la cantidad de antisuero determinada en el inserto.

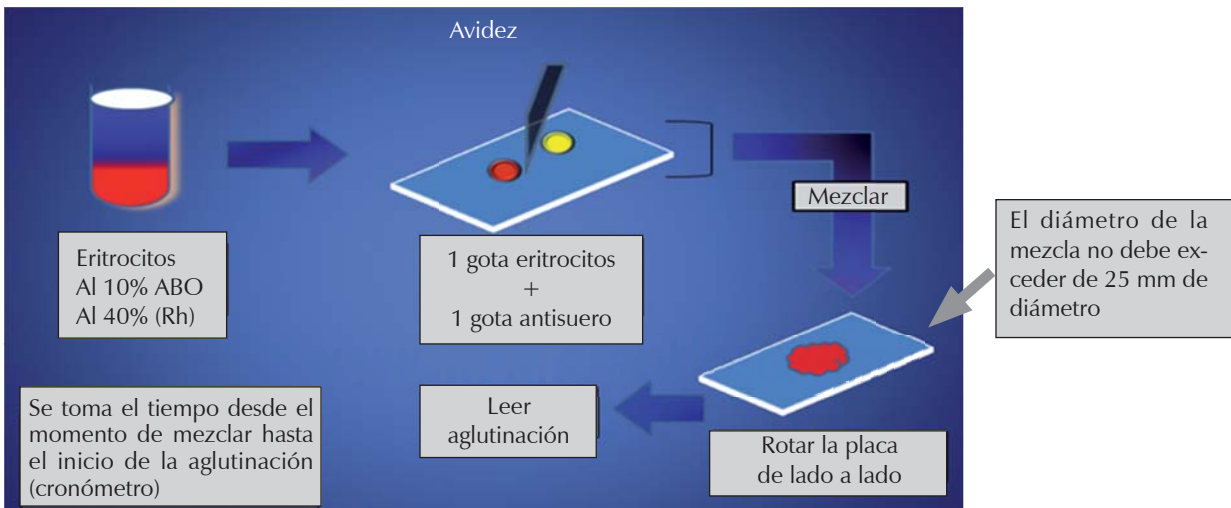


Figura 1. Técnica de avidéz.

Y el resultado debe anotarse en cruces.

- **Técnica en gel, fase sólida o perlas de vidrio:** Deben revisarse las instrucciones del proveedor.

**c. 2 Prueba de antiglobulina humana (suero de Coombs)**

Preparar una suspensión de eritrocitos lavados (sensibilizados y no sensibilizados) al 2-4% en solución salina isotónica (técnica en tubo) y/o a la concentración que indique la técnica en gel o perlas de vidrio. Realizar la prueba de **especificidad** enfrentando el suero de Coombs contra eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados (si se cuenta con ellos), centrifugar, leer y registrar resultados. Interpretación: aglutinación constituye una prueba positiva.

Para **técnica en tubo** se realiza una titulación mediante diluciones doble seriadas (*Figura 2*). Cada dilución se enfrenta contra eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados al 2-4%. Se centrifuga, se lee y se registra. Resultado: registrar la última dilución en donde todavía se observa aglutinación y se reporta en **título**, que es el recíproco de la dilución, por ejemplo, si la dilución es 1/64, el título es 64.

- d. Potencia:**<sup>4</sup> Se refiere a la intensidad de aglutinación que presenta el antisuero al reaccionar con su antígeno específico. Permite la comparación de antisueros por lotes o

marcas con mismo título y diferentes grados de aglutinación. En el *cuadro II* se muestra la correspondencia entre los grados de aglutinación y el puntaje. Para el ejemplo mostrado en la *figura 2* el puntaje es de 60.

**C. Los métodos analíticos**

Los diferentes métodos analíticos que se realizan en el laboratorio incluyen aquéllos para determinar grupo ABO y Rh, antígenos eritrocitarios (fenotipo) de los diferentes sistemas (Rh/Hr, Diego, Duffy, Kidd etc.), la investigación de anticuerpos regulares e irregulares libres en suero o plasma así como los unidos al eritrocito mediante diferentes técnicas.

Todas las metodologías<sup>6</sup> empleadas se basan en la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) que depende de varios factores: concentraciones de células, reactivos, pH, temperatura y tiempo de incubación, centrifugación (velocidad y tiempo) y lectura, por lo que todos estos factores deben controlarse para todas las técnicas.

La concentración de los reactivos y células es importante, por tanto debe revisarse el inserto, utilizar las células y reactivos a la concentración recomendada para evitar fenómenos de zona. La solución salina isotónica debe tener un pH de 7 + 0.2, conservarse en condiciones adecuadas para evitar modificación de osmolaridad y es necesario cambiarla cada día de uso. Debe respetarse el tiempo de incubación para cada técnica, ya que puede haber disociación de la reacción Ag-Ac, pudiendo encontrar resultados falsos negativos. Una fuerza excesiva de centrifugación puede ocasionar un sobrepacquetamiento de las células, dificultando la lectura, ocasionando resultados falsos positivos o el caso contrario, una deficiente centrifugación podría dar un resultado falso negativo. En todas las técnicas de tubo para la lectura de la aglutinación debe agitarse suavemente el tubo.

Cuadro I. Control de calidad.						
Células	Anti-A	Anti-AB	Anti-B	Células	Anti-D	Control Rh
A <sub>1</sub>	+	+	-	R <sub>1</sub> r	+	-
A <sub>2</sub>	+	+	-	rr	-	-
B	-	+	+			
O	-	-	-			

Las técnicas más empleadas son:

- Técnica salina
- Uso de enzimas
- Técnica de LISS (solución de baja fuerza iónica)
- Otras

Para el control de calidad de las técnicas puede emplearse un suero humano o un suero monoclonal diluido que contenga un anticuerpo conocido, enfrentarlo contra dos células, una que tenga el antígeno correspondiente (heterocigoto) y una negativa. Debe correrse

Cuadro II. Relación entre grados de aglutinación y puntaje.		
Lectura	Agglutinación	Puntos
4+	Total en un solo cúmulo grande	12
3+	Grandes aglomerados con pocos eritrocitos libres	10
2+	Gran cantidad de conglomerados pequeños con número moderado de eritrocitos libres	08
1+	Conglomerados definidos pero finos	05
Graniento (g)	Eritrocitos dispersos que pueden contener ocasionalmente algún conglomerado pequeño	02
Neg.	Los eritrocitos se mueven libremente. No hay conglomerados visibles	00

Correspondencia entre grados de aglutinación y puntaje.

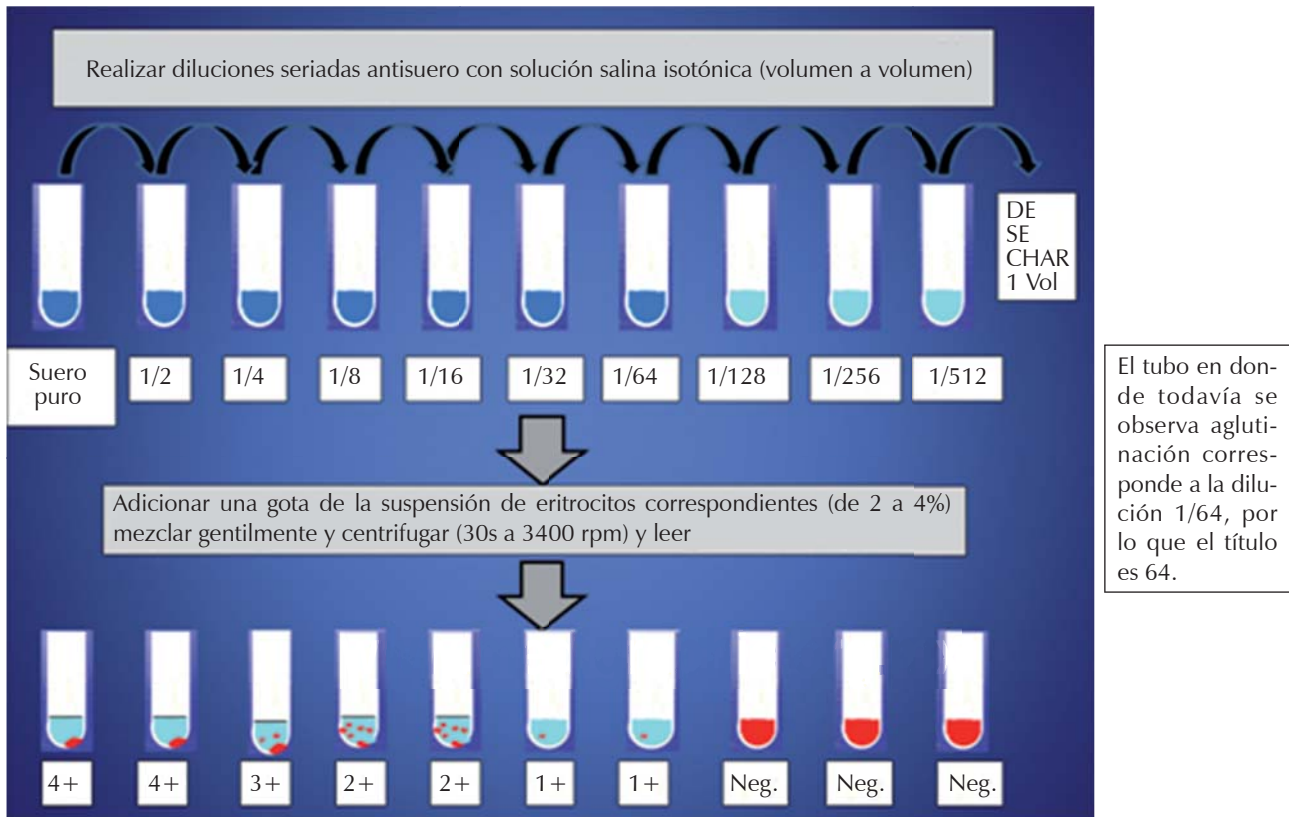


Figura 2. Técnica de titulación.

en paralelo, utilizando las mismas condiciones de prueba.

Es importante mencionar que hasta la fecha no existe una sola técnica que nos asegure encontrar 100% de los anticuerpos y todas tienen ciertas limitaciones siendo importante en algunos casos aplicar varias técnicas para dilucidar el o los anticuerpos presentes.

#### **D. Control de la limpieza del material de vidrio**

La limpieza del material que se utiliza para las pruebas del laboratorio de inmunohematología es fundamental, ya que la presencia de residuos de jabón o proteína puede ocasionar resultados falsos negativos.

**Etapa postanalítica:** Esta etapa comprende la recopilación de resultados, elaboración del reporte y entrega de resultados y/o entrega de componentes sanguíneos. Debemos asegurar que los resultados o componentes lleguen al paciente a quien se solicitaron los estudios y/o componentes y se considera hasta que los componentes son transfundidos (hemovigilancia), los datos contenidos en las solicitudes deben ser correctos, número de bolsa, nombres del donador y receptor. Si al transfundir presentó reacción, documentar el tipo, grado. El laboratorio debe realizar el estudio de la misma, por lo que es necesario rescatar la bolsa del componente transfundido y tomar muestras sanguíneas al paciente para llevar a cabo el protocolo de estudio de reacción transfusional.

Reportar resultados y éstos deberán integrarse en el expediente como antecedente para futuras transfusiones.

#### **Pruebas de hemoclasificación y hemocompatibilidad**

Todos los estudios se realizan de acuerdo con lo establecido en la NOM 253-SSA1-2012 en el apartado 9.5.

#### **Determinación del grupo sanguíneo ABO y Rho (D)**

El grupo sanguíneo ABO es el más importante debido a que existen anticuerpos regulares antitéticos (anti-A, anti-B y anti-A,B) que producen hemólisis en caso de existir incompatibilidad.

Se realiza lo que se conoce como prueba directa que es buscar los antígenos eritrocitarios utilizando sueros conocidos (anti-A, anti-B, anti-D y/o anti-AB) y la prueba inversa que es buscar anticuerpos utilizando células conocidas.

El segundo grupo sanguíneo en importancia es el Rh y solamente se determina el antígeno D, en este sistema también se encuentran los antígenos C, c, E se ha descubierto que pueden causar aloinmunización, teniendo importancia clínica.

#### **Técnica en tubo**

Antisueros anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D y control de Rh, la cantidad que se deposita es de acuerdo con lo que establece el inserto.

Células del paciente y del donador lavadas con solución salina 0.9% y resuspendidas a una concentración de 2 a 4%.

#### **Técnica en tarjeta**

Se utilizan tarjetas de grupo sanguíneo y la concentración de células se realiza de acuerdo con la técnica; (verificar con el proveedor), algunos proveedores no incluyen suero anti-AB ni células A<sub>2</sub> y O para determinar el grupo sanguíneo.

La dilución de las células se realiza utilizando los reactivos de la casa comercial.

En ambas técnicas se centrifuga y se lee el resultado.

Siempre deberá colocarse el autotestigo, glóbulos rojos y suero del paciente, debido a que podrían existir autoanticuerpos tanto libres como pegados al eritrocito.

Para los resultados en tarjeta se clasifican según el grado de aglutinación como se muestra en la figura 3.

Para determinar la expresión débil del antígeno D se utiliza la técnica en tubo con un antisuero anti-D que contenga anticuerpos del tipo IgG, la prueba se incuba por aproximadamente 30 min en baño María a temperatura de 37 °C y se lleva a fase de Coombs. Un resultado positivo debe etiquetarse como Rho D débilmente positivo o utilizar anticuerpos específicos contra las diferentes clonas del antígeno D para determinar las diferentes variantes, la más común es el DVI+, algunas tarjetas de gel contienen estos anticuerpos específicos.

### **Investigación de anticuerpos fuera del sistema ABO (anticuerpos irregulares de importancia clínica)**

Se les llama irregulares porque, en contraste con los anticuerpos del sistema ABO que se encuentran comúnmente en todos los individuos sanos, estos anticuerpos sólo se observan en algunos pacientes o donadores que han sido sensibilizados. Los anticuerpos irregulares son poco frecuentes y pueden hallarse como anticuerpos hemolizantes, aglutinantes o sensibilizantes.

Se evidencian a diferentes temperaturas *in vitro* y para su observación pueden requerir sustancias que favorezcan su demostración como: enzimas o sustancias como el polietilenglicol, solución de baja fuerza iónica pueden ser demostrados solamente con la prueba de antiglobulina indirecta o suero de Coombs. Por ser estas características imprevisibles, para su demostración la mayor parte de los bancos emplean técnicas de rutina combinadas, como la técnica salina, medio de alta concentración proteica medios enzimáticos y/o antiglobulina humana.

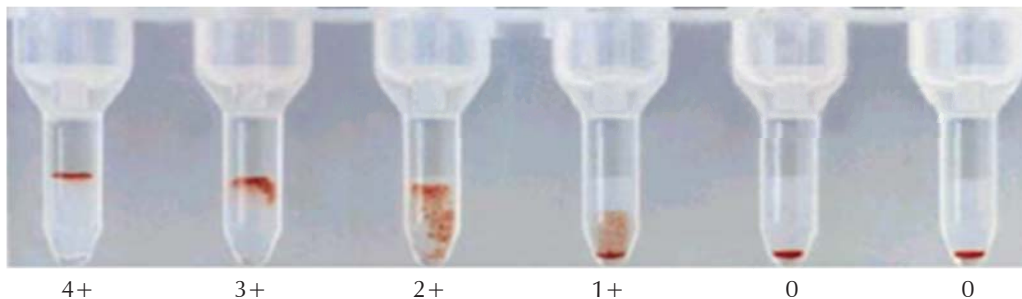
Para el estudio en inmunohematología los anticuerpos inmunes son aquellos producidos como respuesta a una aloinmunización y pueden hallarse en pacientes que han tenido transfusiones o mujeres que hayan tenido embarazos previos. Es importante identificarlos, ya que algunos tienen importancia clínica, esto es, pueden provocar reacciones adversas en caso de una transfusión incompatible (Cuadro III).

### **Técnicas**

Para la identificación pueden utilizarse diferentes medios de reacción siempre respetando tiempos de incubación y técnicas,<sup>7</sup> en el cuadro IV se muestra el protocolo que se realiza en el Banco Central de Sangre CMN SXXI:

La mayoría de los anticuerpos inmunes son del tipo IgG, por lo que la reacción se lleva en dos fases:

1. Una primera fase a temperatura de 37 °C de sensibilización, el anticuerpo se fija a la membrana del glóbulo rojo.



**Figura 3.**

Grados de aglutinación en técnica de tarjeta de gel.

2. La segunda fase de demostración del anticuerpo se realiza utilizando un anticuerpo dirigido contra la fracción Fc del anticuerpo (IgG), que es el suero de Coombs.

Los paneles que se utilizan pueden ser:

- Para realizar un tamizaje con 2 a 4 células, las características de este panel es que sólo se utilizan para saber si hay o no anticuerpos, no se define una especificidad.
- Para identificar el anticuerpo en donde se utilizan paneles de 6 hasta 16 células.

Es importante mencionar que en ocasiones deben aplicarse varias técnicas para dilucidar el anticuerpo de que se trate.

La relación de glóbulos rojos en la mayoría de las técnicas en tubo es 1:2, esto es una gota de glóbulos rojos por dos gotas de suero.

### Interpretación de resultados

Si se realiza un tamizaje se reporta **positivo** o **negativo**, eso significa que el paciente tiene un anticuerpo inmune de importancia clínica y éste debe identificarse.

Si se identifica el anticuerpo a través del uso de un panel completo y diferentes técnicas, debe reportarse al médico tratante, en el expediente clínico y preferentemente al paciente, se explicará la importancia para futuras transfusiones, ya que es obligado transfundir sangre compatible por fenotipo, es decir sangre que no contenga el antígeno para evitar reacciones adversas a la transfusión.

### Pruebas de hemocompatibilidad o pruebas cruzadas

El objetivo de las pruebas cruzadas de compatibilidad es investigar anticuerpos específicos activos a 37 °C en el suero del paciente contra los eritrocitos del donador y viceversa.

La prueba cruzada se divide en tres partes:

- *La prueba mayor* que contiene el suero del paciente y eritrocitos del donador (D).
- *La prueba menor* que contiene el plasma del donador y los eritrocitos del paciente (R), sólo en casos de contar con él, esto es porque los concentrados eritrocitarios actualmente contienen solución aditiva.
- *Y el autotestigo* que contiene el suero y eritrocitos del paciente (AT).

Una prueba cruzada es compatible cuando no se observa aglutinación en ninguna de las fases de la prueba, ni hemólisis a 37 °C.

### Prueba cruzada menor

La prueba cruzada menor se realiza utilizando plasma del donador y sirve para investigar anticuerpos irregulares presentes en el donador. Debe efectuarse cuando se quieran transfundir componentes sanguíneos que tengan plasma.

Cuando un paciente requiere transfusiones repetidas, debe obtenerse una nueva muestra

Cuadro III. Clasificación inmunohematológica de Anticuerpos.

Anticuerpos	Naturales	Regulares Irregulares	IgM activos de 0 °C-45 °C con importancia clínica, Sistema ABO IgM activos de 18 °C a 22 °C, sin importancia clínica H, Ii, Le(a,b), MN, A <sub>1</sub> natural, E natural
	Inmunes Autoinmunes Medicamentos	IgG activos a 37 °C, con importancia clínica, los antígenos eritrocitarios Antisistema Rh-Hr, auto-anti-I, auto-anti P, etcétera Tipo penicilina, alfametildopa	



Cuadro IV. Técnicas empleadas en BCSCMNSXXI.		
Técnica	22 °C	37 °C
Salina	30-45 min.	45-90 min.
Enzima (deben montarse dos series si se requiere trabajar las dos temperaturas)	10-15 min.	10-15 min.
LISS	No procede	15 min.

de su sangre para efectuar la siguiente prueba cruzada, si han transcurrido  $\pm$  72 horas después de la última transfusión.

Las pruebas pretransfusionales bajo control aseguran la compatibilidad inmunohematológica de la sangre y/o sus fracciones reduciendo a un mínimo las reacciones transfusionales inmediatas.

Por su parte el servicio médico y de enfermería deben controlar que:

1. La transfusión se lleve a cabo oportunamente al enfermo preciso con la técnica adecuada.

2. La evaluación de su efecto. Si éste a pesar de todo llegara a ser negativo, la comunicación inmediata con el laboratorio debe establecerse para dilucidar la causa.

## Referencias

1. Norma Oficial Mexicana NOM 253-SSA1-2012. Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
2. Norma Oficial Mexicana NOM 007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
3. Rodríguez SL. Guía Rápida de Banco de Sangre. Control de calidad en el laboratorio de Inmunohematología. Editorial Prado. México 2010.
4. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Suplemento para Dispositivos Médicos. 3a. ed. México: 2014
5. Golffed TH. Microtécnica de aglutinación en gel DiaMed, Fundamentos y Técnicas básicas. Julio 2014.
6. Roback JD. Technical manual. 16th. ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks; 2008.
7. González BJ. Técnicas y métodos de laboratorio clínico, 3a. ed. Disponible en: [www.medilibros.com](http://www.medilibros.com). 2010.

Correspondencia:

**Dra. Lilia Rodríguez Sánchez**

E-mail: [liliarodsan12@gmail.com](mailto:liliarodsan12@gmail.com)