



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS
IRREGULARES COMO UNA ALTERNATIVA DE
LAS PRUEBAS CRUZADAS**

Trabajo escrito vía cursos de educación continua

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA ISABEL / LUIS REYES



MÉXICO, D. F.



2002

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

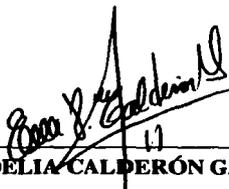
JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS
VOCAL: PROF. AMALIA GUADALUPE BRAVO LINDORO
SECRETARIO: PROF. SERGIO SÁNCHEZ GUERRERO
1er. SUPLENTE: PROF. GUILLERMO ESCAMILLA
2do. SUPLENTE: PROF. ZOILA NIETO VILLALOBOS

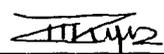
SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**FACULTAD DE QUÍMICA EDIFICIO D
U.N.A.M.**

ASESOR DEL TEMA:


E.B.C. EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS

SUSTENTANTE:


MARÍA ISABEL LUIS REYES

DEDICATORIA ESPECIAL:

A papá Angelito[†], por todo lo que me enseñó, no con palabras, sino con hechos.

AGRADECIMIENTOS

*A **DIOS** por darme la oportunidad de cumplir un sueño más y compartirlo con los que me quieren.*

*A mis padres, **María Reyes Sánchez y Antonio Luis Morales**. Me han dado la mejor herencia. Gracias.*

*A mis hermanas, **Eva, Rosario y Edith**. Las quiero mucho nenas.*

*A mis hermanos, **Joel, Toño y José Angel**. Por su apoyo.*

*A mis abuelos, **Ignacio Luis Flores †, Adolfa Morales Hipólito †, Angel Reyes Aviles † y Maximina Sánchez Rivera**. Por sus enseñanzas.*

*A mis amigas, por orden de aparición, **Verónica, Olga, Elizabeth, Mariana, Carmen, Gaby y Lupita**. Han sido un gran apoyo en la adversidad.*

Y a todas las personas que he encontrado en el camino, que dan sin esperar nada a cambio.

IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES COMO UNA ALTERNATIVA DE LAS PRUEBAS CRUZADAS

INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XIX, se realizaron transfusiones sin la realización de pruebas serológicas. Más tarde Landsteiner describe el sistema ABO a principios de 1900, el cual fue aplicado en la tipificación de grupos sanguíneos. En 1908, Ottenberg, utilizó el descubrimiento de Landsteiner, señalando la importancia de la tipificación sanguínea y las pruebas cruzadas. Las pruebas cruzadas incluían ensayos con el suero del receptor y eritrocitos del donador (prueba cruzada mayor) y eritrocitos del receptor con suero del donador (prueba cruzada menor); con ellas se detectaban anticuerpos completos o IgM porque las pruebas sólo eran realizadas a temperatura ambiente. En 1939 fue descrito el antígeno Rh, reconocido como anticuerpo incompleto o IgG. Los informes de anticuerpos detectados a diferentes temperaturas empleando potenciadores en el medio de reacción, condujeron a la creencia de que así se detectarían e identificarían todos los anticuerpos. En las pruebas se incluía el uso de la albúmina, incubación a 37°C y la fase de antiglobulina. Para 1960 la búsqueda de anticuerpos estaba integrada por las fases: salina, albúmina y antiglobulina; también utilizada en las pruebas cruzadas. El uso de soluciones de baja fuerza iónica (LISS), enzimas, microplacas y pruebas de gel-PEG (polietilenglicol), mejoraron la eficiencia de la detección de anticuerpos.

Para 1970 identificar todos los anticuerpos representó un desafío.¹ El uso de la búsqueda de anticuerpos en las pruebas pretransfusionales, restó importancia a las pruebas cruzadas. Se logró que el índice de reacciones adversas en el receptor, ocasionadas por anticuerpos del donador, se redujera con la búsqueda de éstos anticuerpos en el suero del

donador; con lo cual se eliminó, en algunos laboratorios, la prueba cruzada menor. La AABB en su primera edición la menciona como opcional.

Con el previo reconocimiento de los anticuerpos irregulares en el suero del receptor y donador, el punto crítico a resolver sería, la determinación de la compatibilidad ABO.⁴³ De tal manera que los procesos se enfocaron en la búsqueda e identificación de anticuerpos clínicamente significativos y de otros anticuerpos capaces de inducir destrucción de eritrocitos.¹

Aún es un tema de debate la necesidad de realizar pruebas cruzadas hasta la fase de antiglobulina; incluso, la de centrifugación inmediata, cuando la búsqueda de anticuerpos irregulares en el receptor y donador ha sido negativa.¹

Actualmente se han introducido nuevas tecnologías de gel o fase sólida, para el escrutinio e identificación de anticuerpos contra antígenos eritrocitarios, las cuales incorporadas a instrumentos semiautomáticos, y combinadas a un sistema computarizado permiten realizar la identificación de anticuerpos y pruebas de compatibilidad.⁴³

La tecnología computarizada puede ser utilizada en la detección de incompatibilidad ABO en lugar de las pruebas cruzadas serológicas cuando se tiene un criterio específico.¹ También, la asignación y selección de unidades compatibles puede hacerse de forma manual, si no se cuenta con un sistema computarizado; siempre y cuando se cuente con un sistema establecido para tal situación.⁷

GENERALIDADES

PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD

El cruce de sangre buscando compatibilidad sanguínea, forma parte de una serie de procedimientos conocidos como pruebas pretransfusionales; las cuales tienen como objetivo seleccionar los componentes sanguíneos que tengan una aceptable sobrevida y no causen ningún daño al receptor.² Las premisas generales son las siguientes:

1. Asegurar la compatibilidad ABO.
2. Utilizar sangre del mismo grupo Rh, lo que es especialmente importante en mujeres que se encuentran en edad reproductiva. Cuando el donador y el receptor pertenecen al mismo grupo ABO y Rh, la transfusión será compatible en aproximadamente el 98% de los casos.
3. Para asegurar la compatibilidad en el 2% restante, son fundamentales:
 - a) El estudio de anticuerpos irregulares clínicamente importantes en el suero del receptor.
 - b) La prueba cruzada mayor (suero del receptor y los eritrocitos del donador).³

La AABB *Standards for Blood Banks and Transfusion Services* menciona los requisitos que deben seguirse en los procedimientos realizados a los componentes sanguíneos antes de ser liberados:

- Identificación positiva del receptor y de su muestra sanguínea.
- Tipificación ABO y Rh de la sangre del receptor.
- Pruebas de detección de anticuerpos clínicamente significativos utilizando suero del receptor.

- Comparación de los resultados de la muestra del receptor obtenidos contra los registros de resultados previos.
- Confirmación del grupo ABO.
- Confirmación del tipo de Rh en unidades Rh-negativas.
- Selección de componentes ABO y Rh apropiado para el receptor.
- Realización de pruebas cruzadas serológicas o por computadora.
- Rotulado de los productos con la información de identificación del receptor.⁴

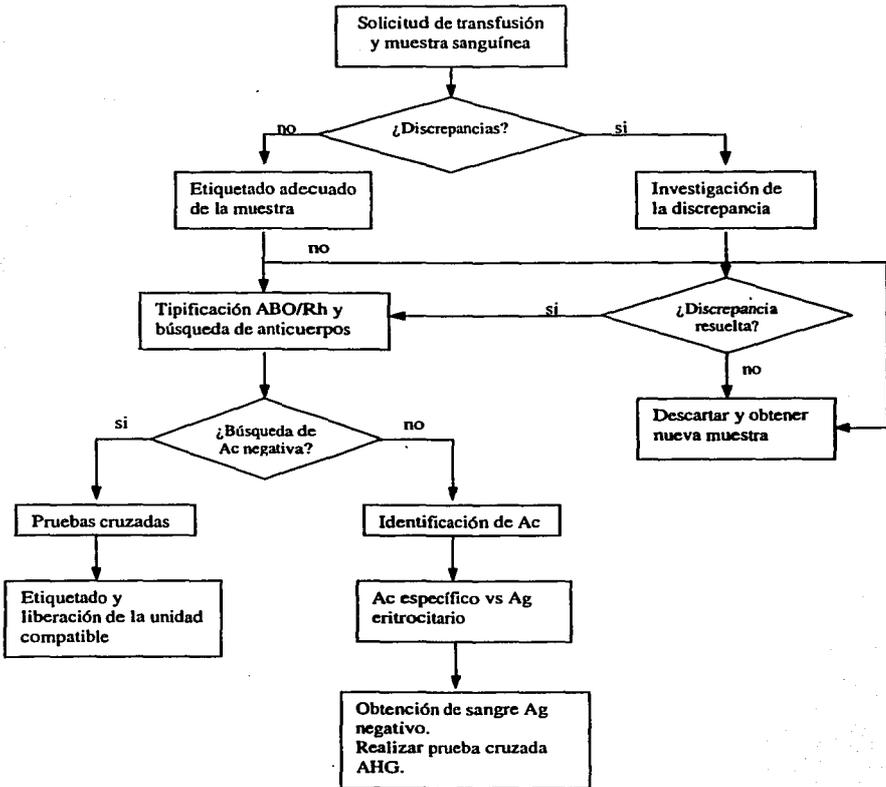
Los elementos de las pruebas de compatibilidad se resumen en el siguiente cuadro.¹

Elementos de las pruebas pretransfusionales

Prueba directa ABO	Eritrocitos del receptor con anti-A, anti-B y anti-AB.
Determinación de Rh	Eritrocitos del receptor con anti-D y un control de Rh.
Prueba inversa	Suero del receptor con células A ₁ , A ₂ , B y O.
Búsqueda de anticuerpos	Suero del receptor con células de fenotipo conocido.
Prueba cruzada (mayor)	Suero del receptor con eritrocitos del donador.

En el siguiente diagrama de flujo se observa claramente el procedimiento que se realiza en las pruebas pretransfusionales tradicionales.⁷

Diagrama de flujo para las pruebas pretransfusionales tradicionales



ESCRUTINIO E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

El escrutinio de anticuerpos en el suero de los posibles receptores se realiza para detectar o descartar la presencia de anticuerpos clínicamente significativos fuera del sistema ABO, reactivos a 37°C y/o en la prueba de antiglobulina y así evitar que causen reacciones transfusionales o un acortamiento de la supervivencia de las células transfundidas.² La detección de anticuerpos irregulares reúne las siguientes ventajas: primera, si se revela la existencia de aloanticuerpos, queda tiempo suficiente para identificarlos y seleccionar donantes compatibles. Segunda, detectar aloanticuerpos débiles empleando eritrocitos (2 o 3 células que expresen los antígenos asociados con los anticuerpos clínicamente relevantes) homocigotos por su doble contenido de antígenos para que la detección resulte más sencilla, que cuando el suero se enfrenta a donantes al azar, como ocurre en la prueba cruzada.^{6,4}

Cuando un anticuerpo atípico es detectado la especificidad debe ser definida (identificación del anticuerpo) mediante la confrontación del suero del paciente con células totalmente tipificadas (panel de 11 células fenotipadas). Una vez identificado el anticuerpo debe transfundirse al paciente con sangre o concentrado eritrocitario libre del antígeno correspondiente, excepto en circunstancias clínicas razonablemente justificadas y aprobadas por el médico responsable del banco de sangre o del servicio de transfusión.^{2,6}

Los anticuerpos considerados como peligrosos o con actividad hemolítica significativa, incluyen a los del sistema ABO, Rh, Kell, Kidd, Duffy, P y los eventuales S, s y U. Otros con mucha menor frecuencia que tienen importancia son los anticuerpos dirigidos contra los antígenos Ch/Rg, Le^b, Kn/Mc/Yk y Xg^a y aquellos que constituyen la verdadera excepción por su rareza son los anticuerpos contra los antígenos Cartwright, Lutheran,

Gerbic, Lan, Dombrock, Le^a, LW, II, entre otros. Como casos excepcionales se ha informado el anti-i con actividad hemolítica in vivo.²

El suero de donadores con antecedentes transfusionales o embarazos deben ser investigados para la detección de anticuerpos irregulares.³ De forma ideal, el escrutinio debería realizarse rutinariamente tanto a donadores como a receptores.²

Los métodos empleados deben ser aquellos que demuestren anticuerpos clínicamente significativos, incluyendo como mínimo la prueba de antiglobulina indirecta,³ debido a que algunos anticuerpos se unen al antígeno en la incubación pero no producen aglutinación y sólo son demostrables en la fase de Coombs.

Los métodos no solo deben detectar anticuerpos activos a bajas temperaturas sino que además tienen que diferenciar entre reacciones positivas verdaderas y falsas. Los siguientes métodos cumplen prácticamente con estos requisitos:⁶

➤ Centrifugación inmediata o prueba rápida. Establece la compatibilidad al sistema ABO; sin embargo, otros anticuerpos (por ejemplo auto-anti-I) pueden también ser detectados en esta fase.

➤ Incubación a 37°C. Se emplean medios de reacción entre los cuales se mencionan: albúmina, solución de baja fuerza iónica (LISS), polietilenglicol (PEG) y enzimáticos que facilitan las reacciones antígeno-anticuerpo, disminuyendo el tiempo de incubación. En esta fase se detectan anticuerpos de importancia clínica.²

➤ Antiglobulina. Se considera como la prueba de compatibilidad definitiva, porque detecta IgG y anticuerpos fijadores de complemento que pueden estar presentes en el suero del receptor, los cuales son potencialmente reactivos frente a los antígenos de los eritrocitos del donador.³⁹ Para esta fase se emplea reactivo de Coombs en forma de anti-IgG + anticomplemento (poliespecífico) o anti-IgG (monoespecífico).² El uso del

reactivo poliespecífico detecta anticuerpos que activan complemento como Kidd o incrementan la fuerza de la reacción para algunos otros anticuerpos.⁴

Nuevas tecnologías empleadas para el escrutinio e identificación de anticuerpos en las pruebas pretransfusionales.

Actualmente han surgido nuevas tecnologías, incluyendo reactivos monoclonales que reemplazan los anticuerpos de origen humano para tipificar ABO/Rh y el uso de polietilenglicol (PEG) como un reactivo potenciador para la detección e identificación de anticuerpos. Las tecnologías de gel, fase sólida y columna de afinidad para la demostración de las interacciones antígeno-anticuerpo, reemplazan las pruebas convencionales en tubo para los procedimientos de pruebas pretransfusionales.^{9,10} Estas técnicas se describen a continuación:

Técnica en gel. Fue creada en Europa en 1988 desarrollada por Lapiere *et al.* El principio básico es la reacción del suero y eritrocitos en un microtubo con una columna de 15 mm de longitud y 4 mm de ancho. Cada columna tiene 35 μL de gel acrilamida-dextran o sephadex preparado en un buffer LISS o solución salina. El gel puede contener: azida de sodio como preservativo, albúmina sérica bovina y en algunos casos, reactivos como anti-IgG o antiseros específicos contra eritrocitos (ABO y D). El procedimiento general consiste en colocar en la cámara de reacción del microtubo 25 μL de suero y 50 μL de eritrocitos suspendidos en LISS al 0.8%, seguido de una incubación de 15 min. a 37°C. Centrifugar 10 min. (70 x g). Durante la centrifugación los eritrocitos son introducidos a la columna del gel; los eritrocitos aglutinados pasan a través de la matriz de gel donde son atrapados en varios lugares de éste, su ubicación depende del tamaño de los aglutinados.

Los eritrocitos no aglutinados pasan fácilmente a través del gel formando un botón en el fondo del microtubo. Las reacciones positivas van desde 0 a 4+. Una reacción de 4+ es indicada por una banda sólida de eritrocitos en la parte superior del microtubo. 3+ aglutinados de eritrocitos en la parte media superior de la columna. 2+ se caracteriza por aglutinados dispersos a lo largo de la columna. En la reacción 1+ se observa aglutinación principalmente en la parte media baja de la columna del gel con algunos botones de no aglutinados.^{11, 27}

Se ha demostrado que la sensibilidad de la técnica en gel es superior a la prueba convencional de tubo PEG-antiglobulina indirecta en la detección de aloanticuerpos potencial y clínicamente significativos.^{18,22,24,28} Sin embargo hay que resaltar que el método de adsorción PEG es efectivo, sensible y eficiente para la detección de aloanticuerpos,^{14,16,30} pero tiene una desventaja ya que elimina algunos autoanticuerpos y aloanticuerpos por precipitación de inmunoglobulinas.^{8,12} A su vez se ha reportado que PEG-antiglobulina es más sensible que al utilizar albúmina o LISS en la técnica.^{13,15} Cabe mencionar que algunos anticuerpos como anti-Jk^a no son detectados al emplear diluyentes que contienen anti-complemento, ya que solo son demostrables por la actividad del complemento.²⁶

Columna de afinidad. Fue introducida en Estados Unidos en 1997. Es un sistema que consta de 6 u 8 microcolumnas de aproximadamente 12 mm de largo y 3 mm de diámetro. Los microtubos contienen gel de agarosa, la matriz inmunoreactiva esta compuesta de partículas de gel sefarosa con proteína G y partículas de sefacril con proteína A unidas covalentemente. Las proteínas G y A son extraídas del *Streptococcus* grupo G o C y *Staphylococcus* grupo A respectivamente; las cuales se unen específicamente a la porción Fc de las moléculas de IgG. El procedimiento consiste en adicionar en la cámara de reacción 50 µL de una suspensión de eritrocitos al 0.8% en LISS y 50 µL de suero.

Incubación a 37°C durante 15 min.. La centrifugación se realiza usando una centrífuga de ciclos programados de aproximadamente 3 min. Durante la centrifugación los eritrocitos atraviesan la barrera viscosa del gel de agarosa en donde se unen con las proteínas G y A. Si no hay unión de IgG con los eritrocitos, migrarán a través del gel depositándose en el fondo del microtubo formando un botón. Las reacciones positivas se visualizan por la banda de eritrocitos formada en la parte superior de la columna del gel de agarosa. Los grados de las reacciones pueden ser fuertemente positivo, positivo, positivo débil y negativo. Para las pruebas negativas puede introducirse un control de células recubiertas de IgG.¹¹

Se ha comparado la técnica de columna de afinidad con la prueba convencional en tubo LISS-antiglobulina para la detección de anticuerpos empleando 100 muestras positivas con anticuerpos clínicamente significativos y 130 muestras negativas. El método de columna de afinidad mostró resultados comparables con los resultados obtenidos en el método LISS-antiglobulina en tubo.²⁵ Ambos métodos detectan anticuerpos dirigidos a antígenos eritrocitarios de alta incidencia, de baja incidencia y autoanticuerpos. Los anticuerpos de clase IgM no se detectan por la técnica de columna de afinidad.²³ No obstante hay una microcolumna de afinidad con una matriz de gel que contiene además anti-IgM y anti-C3d.¹⁹ Las ventajas de éste método son que no se requiere lavado después de la incubación, el tiempo de centrifugación es de menos de 3 min., claramente se diferencian los resultados positivos y negativos, los resultados son reproducibles y son estables por más de 7 días.²³

Al evaluar comparativamente la técnica de columna de afinidad contra la de gel para la búsqueda e identificación de anticuerpos se obtuvieron los siguientes resultados de sensibilidad para las dos técnicas: 96.5% y 96.8% respectivamente. La especificidad fue de 97.2% para la primera y de 95.5% para la segunda, cuyos resultados son prácticamente

iguales. Una ventaja de la técnica de gel es que es más sensible cuando se tienen anticuerpos de tipo IgM.^{19,17}

Fase sólida. Técnica utilizada en Canadá desde 1980. La placa de fase sólida tiene 96 pozos impregnados de un pool de fragmentos de membrana de eritrocitos para la búsqueda de anticuerpos. En esta se adiciona 50 µl de la muestra de suero o plasma EDTA; simultáneamente se adiciona, en otro pozo el control positivo o negativo; se incuba durante 15 min. a 37°C, posteriormente se lavan los pozos, se seca la placa sobre un material absorbente; se adicionan dos gotas de células indicadoras en cada pozo. La placa se centrifuga por 3 min. a 350 x g y se lee. Una reacción positiva es indicada por una capa lisa sobre las células indicadoras lo cual muestra que se ha presentado una reacción con el anticuerpo. Una reacción negativa es cuando se observa un botón de células empalmadas en el pozo. El grado de reacción puede ser reportado con la clásica escala de 0 a 4+.¹¹ Esta técnica tiene más o menos la misma sensibilidad que la técnica en tubo y la ventaja de procesar una gran cantidad de muestras. Se emplea en la búsqueda de anticuerpos pero no es utilizada en las pruebas cruzadas.^{32,35}

El inmunoensayo de fase sólida, ha presentado una alta sensibilidad adicionando PEG; no obstante algunas reacciones no-específicas pueden ocurrir.^{21,33,34}

El suero de pacientes con ciertas enfermedades (LES, AHAI, etc.) dificulta el uso de esta técnica, debido a las proteínas anormales presentes y a autoanticuerpos.³¹

PRUEBAS CRUZADAS

La prueba cruzada forma parte del conjunto de las pruebas de compatibilidad también llamadas pretransfusionales. Se considera como la prueba final que determina la compatibilidad entre el suero del receptor y los eritrocitos del donador;^{1,4} y son principalmente importantes cuando se pretende transfundir concentrado eritrocitario, sangre total o componentes en los que la contaminación de eritrocitos se detecta a simple vista.³ Se emplean para detectar incompatibilidad ABO y anticuerpos clínicamente significativos.⁷

Los métodos seleccionados para realizarlas son los que se utilizan para la búsqueda de anticuerpos.^{1,4} Las pruebas, deberán incluir aquéllas que permitan demostrar la ausencia de anticuerpos específicos regulares o irregulares de importancia clínica en el suero del receptor, contra los eritrocitos del donador (prueba mayor); es recomendable demostrar la ausencia de anticuerpos irregulares de importancia clínica en el suero del donador, contra los eritrocitos del receptor (prueba menor), específicamente cuando se requiera transfundir sangre total proveniente de donadores con antecedentes de aloinmunización.⁵

Los dos tipos comunes de pruebas cruzadas son los de centrifugación inmediata en pacientes que no tienen anticuerpos clínicamente significativos y fase Coombs para los demás.⁷ Sea cual sea la prueba cruzada que se utilice, los eritrocitos del paciente deben cruzarse con su propio suero como control; un resultado positivo en esta prueba indicará que cualquier resultado positivo obtenido en la prueba cruzada mayor, puede deberse a la presencia de autoanticuerpos más que de aloanticuerpos.⁶

La interpretación de las pruebas cruzadas se establece basándose en la ausencia de hemólisis o aglutinación en todas las fases de la prueba; el resultado será no-reactivo o compatible y dichas unidades se consideran aceptables para la transfusión.¹

Cuando el receptor no tiene anticuerpos irregulares, (previo estudio con el panel de células conocidas) ni antecedentes de ellos, la fase de Coombs en la prueba cruzada se puede omitir. En tal situación sólo se requerirá una prueba para detectar la compatibilidad ABO, como la de centrifugación inmediata o prueba cruzada computarizada.⁴

Aspectos actuales

Existen diversas alternativas en el proceso serológico de las pruebas pretransfusionales, las cuales son diferentes para cada banco de sangre y servicio de transfusión.

Una posibilidad es realizar el rastreo e identificación de anticuerpos irregulares de forma rutinaria, tanto en el receptor como en el donador, y así en el momento de ser solicitado un componente sanguíneo se pueda efectuar una prueba salina rápida y una vez confirmada la compatibilidad liberar el uso del producto sanguíneo.² Sin embargo, la Norma Oficial Mexicana⁵ establece que no se ha comprobado que el rastreo rutinario de anticuerpos irregulares en los sueros del receptor y del donador, pueda sustituir a las pruebas cruzadas de compatibilidad, por lo que no resulta recomendable omitirlas. Cabe mencionar que el escrutinio no asegura la detección de todos los anticuerpos potencialmente importantes, dado que pueden existir anticuerpos frente a antígenos de baja frecuencia no presentes en los eritrocitos del escrutinio.³

Los investigadores Boral & Henry (1977) enfatizan la confiabilidad del escrutinio e identificación de anticuerpos, describiendo el uso del procedimiento *tipificación* y *búsqueda*, donde la detección de anticuerpos depende sólo de la búsqueda de anticuerpos y no de las pruebas cruzadas.³⁹ La *tipificación* y *búsqueda*, es una política en la cual a la muestra sanguínea del receptor se le realiza la tipificación ABO/Rh y búsqueda de anticuerpos irregulares.⁴

Boral & Henry estudiaron 12,848 muestras sanguíneas, identificando 283 anticuerpos irregulares, 11 de los cuales fueron detectados en las pruebas cruzadas. En éste estudio se utilizó un panel de células heterocigotas en lugar de células homocigotas; de ahí la importancia de realizar la búsqueda e identificación de anticuerpos irregulares mediante los siguientes puntos, establecidos para una detección segura de anticuerpos clínicamente significativos: uso de un panel de células homocigotas, desarrollo de técnicas de antiglobulina que no requieran de lecturas subjetivas, comprensión de los requisitos y validación de las técnicas empleadas, realización de la técnica por duplicado para asegurar la eficiencia del lavado de células y contar con un control de calidad externo.

Los investigadores concluyeron, que el uso apropiado del procedimiento *tipificación y búsqueda* tiene un 99.9 % de efectividad en la prevención de transfusiones de sangre incompatibles. Otros investigadores llegaron a la misma conclusión; estableciendo además, que el riesgo de no detectar un anticuerpo, no necesariamente conduce a la muerte, pero sí acorta el tiempo de vida de los eritrocitos.³⁹

Pruebas cruzadas computarizadas

Desde mediados de 1970 los servicios de transfusión han implementado el procedimiento de *tipificación y búsqueda*. Donde en ausencia de anticuerpos irregulares en el suero del receptor, se procede a realizar una prueba cruzada de centrifugación inmediata para detectar la compatibilidad ABO. Ahora, con la integración de los sistemas de información en los laboratorios del banco de sangre, es posible utilizar el software para detectar esta incompatibilidad entre la muestra del receptor y la muestra del donador, siendo así reemplazadas las pruebas de centrifugación inmediata por las pruebas cruzadas electrónicas (EXM).

Cuando es posible omitir la fase de Coombs de la prueba cruzada y efectuar sólo un procedimiento para detectar incompatibilidad ABO, se puede utilizar la selección computarizada de sangre, siempre y cuando se cumplan con los siguientes requisitos establecidos por la AABB y Blood Transfusion Task Force of the British Committee for Standardization in Haematology (BCSH):

- 1.- La computadora deberá tener lógica asignación para prevenir la liberación de sangre incompatible ABO. (BCSH)
- 2.- No debe haber presencia de anticuerpos clínicamente significativos en el suero del receptor, ni registros previos de ellos. (AABB, BCSH)
- 3.- Los resultados de mínimo dos determinaciones de grupo ABO del receptor deben coincidir. Una de ellas debe efectuarse en una muestra actual. (AABB, BCSH)
- 4.- Los elementos críticos del sistema deben ser validados en el sitio de trabajo. (AABB, BCSH) Por ejemplo la validación de lectores de código de barras, usados para el ingreso de información del receptor y donador; interfases usadas desde otros sistemas, como instrumentos automatizados para tipificación; o bien programas de software para la toma de decisiones e interpretación de resultados. Otra tarea crítica de la computadora incluye la validación de: la comparación de la etiqueta de la unidad del donador con los resultados de las pruebas confirmatorias, despliegue preciso de los registros históricos y validación de la asignación y liberación de unidades con el grupo correcto de ABO.
- 5.- Mecanismos que verifiquen la correcta entrada de datos antes de la liberación de sangre. (AABB, BCSH) La seguridad del método es posible si los datos almacenados en la computadora son correctos.^{1,4,5,36,40}

Los mecanismos de verificación correcta de entrada de datos incluye:

- a. Uso máximo de códigos de barra para la entrada de información del receptor y donador.
- b. Pruebas confirmatorias ABO/Rh en la unidad del donador; interpretación de los resultados computarizados, comparación de la entrada inicial del grupo ABO/Rh y que cuente con una alarma en caso de presentarse una discrepancia.
- c. Interpretación computarizada de los resultados de las pruebas ABO/Rh del receptor y verificación de la entrada manual de los resultados.
- d. Comparación computarizada del grupo ABO/Rh de resultados recientes y previos.³⁶

Los cambios necesarios en las técnicas y procedimientos se pueden realizar en cuatro etapas: (1) estandarización de selección de donador y recolección de sangre; (2) estandarización de la producción y control de calidad de componentes sanguíneos; (3) estandarización de las técnicas de laboratorio, por ejemplo procedimientos serológicos; y (4) implementación de un sistema de cómputo.³⁷

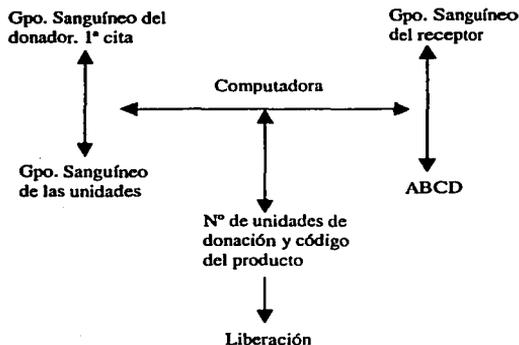
En el uso de este sistema es conveniente que el paciente tenga una identificación con todos los datos requeridos en forma de código de barras, por ejemplo en una muñequera. Las características de tal muñequera son: 1) que no sea fácilmente removible, 2) que tenga la etiqueta de transfusión, 3) que la impresión del código de barras sea único para cada etiqueta de transfusión y que la muñequera corresponda simultáneamente con el sistema computarizado, 4) que la etiqueta sea removida de la muñequera. Todas las unidades a transfundir deben tener una etiqueta con un código de transfusión único junto con los datos del paciente.⁴²

Los procedimientos de EXM son usados en Norte América, Escandinavia, Hong Kong y Australia. Algunos abastecen sangre a sitios lejanos mediante una red de trabajo. La experiencia ha mostrado que con la combinación de un programa adecuado de software y

un desarrollo cuidadoso de los procedimientos de operación estándar, se puede dar seguridad y eficiencia, en la detección de incompatibilidad ABO sin la realización de la prueba cruzada serológica; por lo que es importante contar con personal competente.³⁶

La investigación de la eficiencia en los sistemas computarizados ha hecho posible los cambios en los procedimientos de las pruebas cruzadas serológicas por las EXM, de acuerdo con el concepto ABCD (Antibody screen, Blood group check, Computerized, Delivery control).³⁷ Tal proceso se describe en el siguiente diagrama:

Concepto ABCD



En el servicio de Transfusión Sanguínea de Fuen (Dinamarca) se han realizado más de 100,000 transfusiones de concentrado eritrocitario basado en la prueba cruzada ABCD sin ningún problema.³⁷

La verificación de la compatibilidad ABO (EXM) ha sido aceptada en los procedimientos de pruebas cruzadas en pacientes sin aloanticuerpos clínicamente significativos.³⁸ El Hospital Universitario en Uppsala tiene una larga experiencia en las EXM; también llamadas pruebas ABCD.

Ventajas de las EXM

Reducciones significativas en la carga de trabajo, reducción en los radios de solicitudes de transfusiones y pruebas cruzadas, disminución del volumen requerido de muestra del receptor, menor manipulación de material altamente infeccioso, eliminación de las reacciones positivas asociadas con las pruebas cruzadas de centrifugación inmediata y disminución del tiempo de entrega de la unidad a transfundir. Si se cuenta con un sistema validado para la EXM y se trabaja de acuerdo a los procedimientos de operación estándar, la detección de compatibilidad ABO es del 100% confiable.^{4,36}

Uno de los beneficios de la EXM observado por el personal es la reducción en los niveles de stress, lo cual se refleja en un ambiente de trabajo más agradable y eficiente.³⁹

Con la implementación de este sistema se disminuirían los errores relacionados a un inadecuado o incompleto etiquetado de las muestras (pre-analítico), errores en la transcripción de entrada de datos de la identificación del paciente en el sistema de cómputo del laboratorio.⁴¹

Desventajas de las EXM

Los principales problemas asociados con el uso del sistema computarizado son la realización correcta de la tipificación ABO y Rh del paciente y donador, por lo tanto es esencial contar con un sistema de control de calidad. Un problema de las pruebas cruzadas computarizadas es que éstas no detectan anticuerpos contra antígenos de baja frecuencia; sin embargo esto también es válido para la prueba cruzada de centrifugación rápida.³⁹ En realidad las desventajas en la implementación y validación de los procedimientos de las pruebas cruzadas computarizadas son pocas.³⁶

Eliminación de las pruebas cruzadas

Actualmente hay informes de investigaciones donde se propone la eliminación de las pruebas cruzadas de las pruebas pretransfusionales. En el Servicio de Transfusiones del Hospital Universitario en New Brunswick, N. J.; Beginning en 1989, omitió las pruebas cruzadas, incluso la de centrifugación inmediata, en pacientes sin anticuerpos antierytrocitarios. Este cambio se acompañó de un procedimiento seguro. Su objetivo fue garantizar la seguridad del paciente, incrementado la eficiencia del laboratorio y reduciendo costos.⁷

En lugar de las pruebas cruzadas introdujeron un sistema en el cual, si la búsqueda de anticuerpos es negativa y existen dos confirmaciones del grupo ABO del paciente, la sangre se libera sin la prueba cruzada serológica o electrónica.⁷

En la propuesta de su sistema se enfatizó en la identificación exacta tanto de la muestra como del paciente; las muestras mal etiquetadas se descartaron sin excepción. Dos técnicos realizaron por separado la tipificación el grupo sanguíneo ABO y Rh de cada muestra. Si no hay presencia de anticuerpos irregulares en las unidades ABO idénticas,

éstas son liberadas. El etiquetado y liberación de unidades se lleva a cabo por dos técnicos. Si hay registros previos de anticuerpos irregulares o son detectados en las pruebas recientemente efectuadas, se utiliza sangre antígeno negativa por lo que se tiene que realizar la prueba cruzada hasta la fase Coombs, para poder ser liberada.

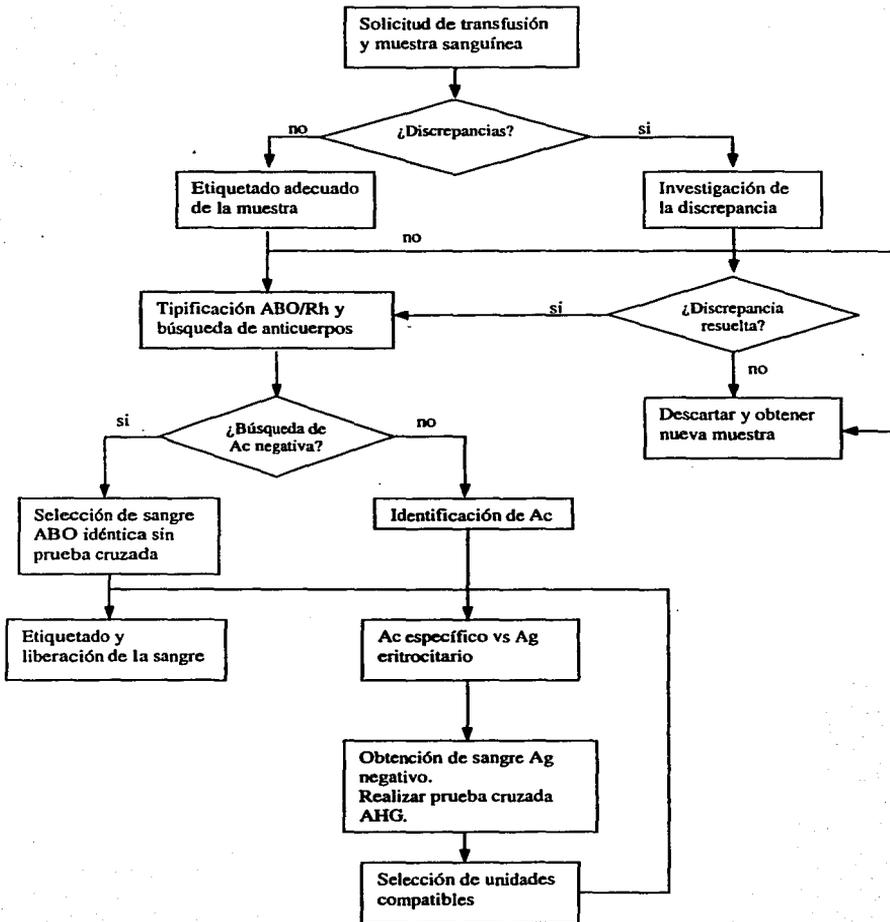
En las EXM, la computadora se encarga de asignar la unidad compatible ABO/Rh, sin embargo, en esta propuesta se sugiere que tal asignación sea realizada de forma manual por un técnico y confirmada por otro. Por lo que, ambos procedimientos son parecidos.

Las unidades con grupo ABO incorrecto, se detectan mediante la reconfirmación del grupo ABO y Rh (éste último se realiza solamente cuando el Rh sea negativo) antes de que las unidades sean liberadas.

Durante 3 años estudiados no se presentaron errores en la liberación de unidades de concentrado eritrocitario y la incidencia de las reacciones transfusionales fueron consistentes con los informes previos, demostrando así que no se agudizaron las reacciones hemolíticas al utilizar éste procedimiento.⁷

En el siguiente diagrama se engloba el sistema propuesto:

Propuesta para las pruebas pretransfusionales



ANÁLISIS

A través del tiempo, la Medicina Transfusional ha ido evolucionando en cuanto a procedimientos y criterios establecidos, para otorgar al paciente la máxima seguridad posible en la transfusión sanguínea.

Desde la introducción del escrutinio e identificación de anticuerpos irregulares en las pruebas pretransfusionales, se empezó a restarle importancia a las pruebas cruzadas. Ya que con el previo reconocimiento de anticuerpos clínicamente significativos en el suero del receptor y donador, el punto importante a resolver estaría enfocado solamente a la determinación de la compatibilidad ABO. Los estándares de la AABB mencionan que si no hay anticuerpos clínicamente significativos en las pruebas realizadas y no hay registros previos de la detección de tales anticuerpos, solamente será requerida una prueba serológica para detectar incompatibilidad ABO.^{4,7}

Por lo que, se han creado nuevas tecnologías que mejoran la especificidad y sensibilidad en la búsqueda e identificación de anticuerpos irregulares. Tales como la tecnología de gel, columna de afinidad y fase sólida con ventajas en la fácil lectura de resultados, eliminación de factores que afectan la sensibilidad de la prueba de antiglobulina humana directa e indirecta, estabilidad y reproducibilidad de resultados, entre otras.

Primeramente, la búsqueda e identificación de anticuerpos en el donador redujo la frecuencia de reacciones adversas ocasionadas por los anticuerpos irregulares, de tal manera que la prueba menor fue siendo eliminada o en un momento dado considerada opcional. Sin olvidar que los anticuerpos presentes en el donador pueden ser neutralizados o diluidos en el suero del receptor.

La búsqueda de anticuerpos clínicamente significativos tanto en el receptor como en el donador de manera rutinaria sería ideal. En caso de detectar anticuerpos se tendrá tiempo

suficiente para identificarlos y seleccionar sangre compatible; los anticuerpos débiles pueden ponerse de manifiesto empleando células eritrocitarias homocigotas que por su doble contenido antigénico permiten la detección de estos anticuerpos.

Hay que reconocer que el escrutinio de anticuerpos no asegura la detección de todos los anticuerpos clínicamente significativos, dado que pueden existir anticuerpos contra antígenos de baja frecuencia o no estar presentes en el panel de búsqueda. Los anticuerpos de importancia clínica están presentes en un porcentaje de 2 a 5% de la población hospitalaria. El riesgo de no detectar un anticuerpo conlleva al acortamiento de la supervivencia del eritrocito, pero no necesariamente tiene consecuencias fatales en el paciente.

Originalmente las pruebas cruzadas tenían como objetivo verificar la compatibilidad ABO y detectar anticuerpos irregulares, pero dada la escasa probabilidad de detectar anticuerpos en la prueba cruzada que no se hubieran detectado ya en el escrutinio de anticuerpos se ha optado por implementar sistemas para eliminar las pruebas cruzadas, como la aplicación del procedimiento *tipificación y búsqueda*; y el concepto ABCD (Antibody screen, Blood group check, Computerized Delivery control) en las pruebas computarizadas.

El procedimiento de *tipificación y búsqueda* puede eliminar las pruebas cruzadas serológicas, debido a que la detección de anticuerpos solamente depende de la búsqueda de anticuerpos y no de las pruebas cruzadas. Investigaciones recientes mencionan que un uso apropiado de la *tipificación y búsqueda* tiene un 99.9% de efectividad de transfusiones de sangre compatible. Esto indica que puede ser factible la eliminación de las pruebas cruzadas de las pruebas pretransfusionales.

La asignación de las unidades ABO compatibles puede llevarse acabo tanto de forma manual como computarizada; ambos procedimientos cuentan con el mismo principio, el de comparar los registros previos del grupo sanguíneo ABO/Rh y búsqueda de anticuerpos con los resultados obtenidos en muestras recientes.

La forma manual requiere del seguimiento de un sistema que reduzca: los errores de identificación del paciente, las discrepancias en la tipificación ABO/Rh y errores relacionados con la identificación de la unidad liberada. La implementación de un sistema computarizado es un tanto más complejo, y tiene que apegarse a los requisitos establecidos por los diferentes comités, para su estandarización.

Cada una de estas alternativas tiene ventajas pero las más importantes son la liberación de sangre en un corto tiempo, facilitando la disponibilidad de sangre al paciente especialmente en casos de urgencia, incrementando así la eficiencia del laboratorio.

CONCLUSIONES

Cuando se opta por el sistema de *tipificación y búsqueda* o se sigue el procedimiento ABCD, en sustitución de las pruebas cruzadas; deben establecerse medidas que garanticen un sistema fiable de comprobación de grupo ABO en el receptor en el momento de entrega de las unidades de sangre; utilizar en el escrutinio e identificación de anticuerpos paneles de células que cubran todos los antígenos más importantes desde el punto de vista transfusional (preferentemente células homocigotas); las técnicas empleadas para tales pruebas deben tener un alto grado de sensibilidad en la detección de anticuerpos clínicamente importantes.

La implementación de un sistema computacional permitirá establecer procedimientos de operación estándar en el laboratorio del banco de sangre; y mediante un sistema de red de trabajo se podrán efectuar operaciones a distancia para la liberación de unidades sanguíneas compatibles a lugares lejanos.

En nuestro país aún prevalece la idea de que ni desde el punto de vista logístico ni económico la supresión de la prueba cruzada tenga ventajas considerables. Ya que el hecho de realizar de manera rutinaria la búsqueda e identificación de anticuerpos así como el implementar un sistema de cómputo, implicaría un mayor costo en las pruebas del laboratorio. Por otra parte, la legislación Mexicana aún no aprueba la omisión de las pruebas cruzadas de las pruebas pretransfusionales.

No obstante en un futuro relativamente corto, quizás México utilice abiertamente estos sistemas alternos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Quinley Eva D. Inmunohematology. Principles y Practice. 2th Edition. Lippincott Raven Publisher. 1998. p.203, 207 - 210
2. Radillo González Alfredo. Medicina Transfusional. Editorial Prado. 1999. México. p.261, 262, 266, 268, 269, 297
3. Vega C. Martín, Montoro Alberola J. A. Manual de Medicina Transfusional. Doyma Libros. 1994. España. p.13, 14,78, 79
4. Technical Manual Committee AABB. 13th Edition. 1999. p. 376-382
5. Norma Oficial Mexicana. NOM-003-SSA2-1993. Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. p. 37, 38
6. Mollison P. L. Transfusion de Sangre en Medicina Clínica. Editorial Reverte. 1987. España. p. 632-634
7. Kuriyan. Pretransfusion testing without serologic crossmatch: approaches to ensure patient safety. Vox San 2000; 78(2):113-118.
8. Branch R. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. Transfusion 1999; 39:6-10.
9. Maffei L. M. Survey on pretransfusion testing. Transfusion 1998; 38(4):343-349.
10. Garratty G. Modern approaches to pretransfusion testing. Inmunohematology 1999; 15(1)
11. Rumsey D. H. New protocols in serologic testing: a review of techniques to meet today's challenges. Inmunohematology 2000; 16(4)
12. Judd W. J. PEG adsorption of autoantibodies causes loss of concomitant alloantibody. Inmunohematology 2001; 17:82-85.
13. Combs M. R. Selecting an acceptable and safe antibody detection test can present a dilemma. Inmunohematology 2000; 17:86-89.
14. Jimenez M. Evaluation of the polyethyleneglycol antiglobulin test in the detection and identification of erythrocyte antibodies. Sangre 1998; 43(1):21-24.
15. Yasuda H. Three episodes of delayed hemolytic transfusion reactions due to multiple red cell antibodies, anti-Di^a, anti-Jk^b and anti-E. Transfusion Science 2000; 23:107-112.
16. Chun-Kwok Cheng. PEG adsorption of autoantibodies and detection of alloantibodies in warm autoimmune hemolytic anemia. Transfusion 2001; 41:13-17.
17. Chanfong S. I. Comparison of gel technology and red cell affinity column technology in antibody detection. Inmunohematology 1998; 14(4):152-154.
18. Weisbach V. Comparison of the performance of four microtube column agglutination systems in the detection of red cell alloantibodies. Transfusion 1999; 39(10):1045-1050.
19. Eichler H. Micro-Column affinity test and gel test: comparative study of two techniques for red cell antibody screening. Inmunohematology 1999; 77:154-158.
20. Sandler S. G. A solid phase and microtiter plate hemagglutination method for pretransfusion compatibility testing. Haematologia 2000; 30(3):149-157.
21. Mark L. Optimizing pretransfusion antibody detection and identification: a parallel, blinded comparison of tube PEG, solid-phase, and automated methods. Transfusion 2001;41:621-626.
22. Judd W. J. The gel test: use in the identification of unexpected antibodies to blood group antigens. Inmunohematology 1998; 14:59-62

23. Champagne K. Comparison of affinity column technology and LISS tube test. *Inmunohematology* 1998; 14(4):149-151.
24. Derr D. A. Implementation of gel column technology, including comparative testing of Ortho ID-MTS with standard polyethylene glycol tube tests. *Inmunohematology* 1998; 14(2):72-74.
25. Shirey R. S. A comparison of a new affinity column system with a conventional tube LISS-antiglobulin test for antibody detection. *Inmunohematology* 1999; 15(2):75-77.
26. O'Brien P. Complement-binding anti-Jk^a not detectable by DiaMed gels. *Vox Sang* 1998;74(1):53-55.
27. Carvajal Gtz. Técnicas en Gel en el Banco de Sangre. Hospital Calderón Guardia, CCSS.
28. Novaretti. Comparison of tube and gel techniques for antibody identification. *Inmunohematology* 2000; 16(4):138-141.
29. Courtney. Tube and column agglutination technology for autocontrol testing. *Inmunohematology* 2001; 17:50-52.
30. Low. K. S. Improved detection of weak, clinically significant antibodies by supplementation of polyethylene glycol with a low-ionic solution. *Inmunohematology* 1998; 14(2):68-71.
31. Million L. A Stable Reagent System for Screening and Identifying Red Blood Cell Irregular Antibodies: Application to Commercial Antibodies. *Vox Sang* 1998; 75:288-297.
32. Stankovic Ana K. Clinical Significance of low-Level Anti-Red Blood Cell Antibodies: Red Blood Cell Survival Studies. *Am J Clin Pathol* 1998; 110:124
33. Gammon M. Confirmation of positive antibody screens by solid-phase red cell adherence assay using a tube technique method with polyethylene glycol enhancement. *Inmunohematology* 2001; 17(1):14-16.
34. Tamai T. Evaluation of a new solid-phase immunoassay for alloantibody detection using bromelin-treated and untreated red blood cells. *Inmunohematology* 2001; 17(1):17-21.
35. Ostendorf N. Automated serological compatibility testing using a solid-phase test and standard laboratory equipment. *Vox Sang* 2001; 80:225-229.
36. Judd W. Requirements for the electronic crossmatch. *Vox Sang* 1998; 74S (2):409-417.
37. Georgsen J. From serological to computer cross-matching in nine hospitals. *Vox Sang* 1998; 74S (2):419-425.
38. Cheng G. Experiences with "self service" electronic blood banking. *Vox Sang* 1998; 74S (2):427-429.
39. Chapman J. F. The computer crossmatch: a safe alternative to the serological crossmatch. *Transfusion Medicine* 2000; 10:251-256
40. Engelfriet C. P. The use of the computer cross-match. *Vox Sang* 2001; 80:184-192.
41. Galloway M. An audit of error rates in a UK district hospital transfusion laboratory. *Transfusion Medicine* 1999; 9:199-203.
42. Lau F. Y. Improvement in transfusion safety using a specially designed transfusion wristband. *Transfusion Medicine* 2000; 10:121-124.
43. Oberman H. Developments in pretransfusion testing and compatibility testing. *Transfusion* 2000; 40