

## Capítulo 6

# Serología de grupos sanguíneos

La clasificación de la sangre por grupos y las pruebas de compatibilidad figuran entre las determinaciones básicas que cualquier servicio de transfusión debe estar en condiciones de realizar. La detección y la identificación de anticuerpos no figuran entre los requisitos básicos (véase el cuadro 1, página 6) pero el servicio debe dotarse de los medios necesarios para poder realizar pronto esos trabajos. En este capítulo se indican las ventajas y los inconvenientes de los diversos métodos, las precauciones especiales que hay que adoptar y los errores que deben evitarse, y se describen las aplicaciones prácticas. Los métodos se exponen someramente: para detalles puede consultarse la lista de bibliografía selecta que figura al final de esta obra.

En las primeras fases del desarrollo de un servicio de serología de la transfusión sanguínea debe efectuarse una encuesta de población para determinar la prevalencia de antígenos eritrocíticos, hemolisinas y anticuerpos, e identificar los grupos sanguíneos raros. Esa información es utilizable para pronosticar las necesidades de reactivos y las técnicas más adecuadas, así como los antígenos que deben abarcar los paneles de eritrocitos para detección e identificación de anticuerpos.

### **PRINCIPIOS GENERALES**

Para realizar pruebas serológicas de grupo sanguíneo se precisan buenos conocimientos, tanto teóricos como prácticos. En la formación del personal debe hacerse también hincapié en las precauciones necesarias para reducir el riesgo de errores de manipulación, así como en las técnicas que hay que saber. Un error de manipulación en la transfusión de sangre puede ser una importante causa de daños o incluso defunción.



Bloque N° 2	Prueba: Grupo (suero) Suero de paciente o de donante							Temperatura				Hora	Hora (lectura)	
	1	2	3	4	5	6	7	A	B	O				
Células conocidas														
A														
B														
O														

\* Por ejemplo, IgM monoclónica anti-D. Véase en la figura 2 el protocolo de trabajo para reactivos IgG anti-D reforzados

## **Exactitud de la documentación**

Se deben utilizar protocolos de trabajo para todas las pruebas. Lo ideal es que haya también un sistema de doble comprobación, es decir, que la clasificación de las células y la del suero sean realizadas por separado por distintos técnicos que luego comprobarán recíprocamente sus resultados. Si se identifican discrepancias se tacharán las pruebas en el protocolo, lo que significa que habrá que repetir las.

En la realidad, ese sistema de doble comprobación no siempre será practicable (por ejemplo, cuando hay una sola persona capacitada para realizar todas las pruebas). Un protocolo de trabajo como el de la figura 1 reduce el riesgo de errores de manipulación.

## **Fiabilidad de la clasificación ABO y Rh(D) de las muestras de sangre de donantes y de pacientes**

Los anticuerpos anti-A y anti-B aparecen normalmente en ausencia de los correspondientes antígenos en los eritrocitos. Las reacciones a la transfusión de sangre con incompatibilidad de grupo ABO pueden ser mortales, especialmente si se suministra sangre del grupo A o del grupo B a un paciente del grupo O con una elevada titulación de anticuerpos anti-A o anti-B.

El antígeno Rh(D) es muy inmunogénico. Es muy importante evitar la inmunización de mujeres Rh-negativas que aún no hayan llegado a la menopausia, para evitar la enfermedad rhesus hemolítica del recién nacido en hijos Rh(D)-positivos. La determinación de grupo Rh(D) se suele omitir en los países donde hay muy pocas personas Rh(D)-negativas pero, en cualquier caso, la decisión habrá de ser parte de la política nacional de sangre. Cuando se realizan pruebas de determinación de grupo ABO y Rh(D) deben incluirse siempre los controles apropiados.

## **Pruebas de compatibilidad**

La compatibilidad de los eritrocitos del donante con el suero del receptor es uno de los requisitos de toda transfusión sanguínea inocua. En consecuencia, es esencial la determinación de dicha compatibilidad en tubos de ensayo siguiendo estrictamente los protocolos de trabajo, particularmente cuando no se pueden practicar pruebas de detección de anticuerpos.

## **Selección de sangre para pacientes con anticuerpos anómalos**

Los anticuerpos anómalos se suelen detectar durante las pruebas de cruce de la sangre, durante la investigación de problemas de clasificación ABO o Rh(D) en pacientes con anemia hemolítica adquirida o en casos de enfermedad hemolítica del recién nacido. Siempre que se pueda se determinará la especificidad de un anticuerpo anómalo para facilitar la selección de sangre con eritrocitos que carezcan del correspondiente antígeno. Si eso no se puede hacer localmente deberá enviarse suero y eritrocitos del paciente a un laboratorio de referencia.

A veces es imposible determinar la especificidad de un anticuerpo anómalo sea porque el laboratorio carece de panel de eritrocitos, sea porque la transfusión es urgente. En tal caso se cruzará el suero con varias unidades del mismo grupo ABO y Rh(D) que el del paciente para elegir una sangre compatible.

## **Reacciones a la transfusión**

La investigación completa de las reacciones a la transfusión es importante tanto para determinar sus causas como para prevenir su repetición. Debe establecerse un sistema para la identificación, la notificación y la investigación de esas reacciones.

## **MUESTRAS DE SANGRE**

Para las pruebas manuales de determinación de grupo ABO y Rh(D) lo mejor es utilizar muestras de 10 ml sin anticoagulante o con él. El suero es esencial para las pruebas de compatibilidad (cruce de la sangre). Todas las muestras se rotularán minuciosamente y con claridad.

Al llegar al laboratorio, cada muestra se centrifuga (por ejemplo, 2000g durante 3 minutos). El suero no utilizado y que pueda necesitarse en otra ocasión se almacenará a  $-20^{\circ}\text{C}$  o temperatura inferior. Se mantendrán muestras de eritrocitos a  $4^{\circ}\text{C}$  durante unos días para fines de referencia.

## **TECNICAS DE DETERMINACION DE GRUPO SANGUINEO ABO**

Estas técnicas se usarán según las instrucciones que haya dado el fabricante del suero utilizado. Pueden emplearse portaobjetos o losetas, tubos o microplacas.

## **Pruebas en portaobjetos o loseta**

Algunos servicios de transfusión utilizan las pruebas en portaobjetos para la determinación preliminar del grupo ABO en el momento de la toma de sangre (por ejemplo, en las unidades móviles o en los centros satélite de colecta). La determinación se vuelve a hacer más tarde utilizando el método de tubo o de microplaca. Las pruebas en portaobjetos o loseta son utilizables para la determinación urgente de grupos ABO, si no se dispone de centrifugadoras de tubos, pero son poco fiables para la clasificación de suero con baja titulación anti-A y anti-B y no se las recomienda para uso corriente. Las pruebas en portaobjetos no permiten la introducción y el examen simultáneo de controles.

Los portaobjetos son los que se usan para microscopios. Para las pruebas en loseta vale cualquier superficie limpia y no porosa, pero es preferible el vidrio opaco, la cerámica o el plástico blanco.

## **Pruebas en tubo**

Se debe disponer de una gradilla de tubos, según se indica en el protocolo de trabajo de la figura 1.

### *Pruebas en tubo de centrifugadora*

Estas pruebas se pueden realizar con tubos de vidrio o de plástico de 10 mm × 75 mm o de 12 mm × 75 mm. Los tubos de plástico son más económicos que los de vidrio pero valen para una sola vez. Los tubos de vidrio se deben lavar minuciosamente y secar en un horno antes de volver a usarlos. La centrifugación puede ser inmediata en casos de urgencia, pero en condiciones normales conviene incubar las muestras en el tubo a la temperatura ambiente durante 15 minutos antes de proceder a la centrifugación. La velocidad y la duración de ésta dependerán del equipo disponible.

### *Pruebas en tubo de sedimentación*

Estas pruebas, al igual que las anteriores, se pueden realizar en tubos de 10 mm × 75 mm o de 12 mm × 75 mm, o en tubos de precipitación más pequeños (7 mm × 50 mm), que resultan más económicos. Cuando se dispone de reactivos de buena calidad el método es fiable y adecuado para la clasificación ABO de grandes lotes de muestras (40 ó más). Las muestras se incubarán a la temperatura ambiente durante 30 y 90 minutos.

*Reactivos*

Cuando se usan sueros anti-A y anti-B muy potentes (por ejemplo anticuerpos monoclonales) no se precisan reactivos anti-A, B (suero del grupo O o combinaciones monoclonales equivalentes). Ahora bien, con los reactivos de menos potencia (por ejemplo, anticuerpos policlonales de donantes) es esencial emplear sueros anti-A, B, ya que de lo contrario los subgrupos A o B más débiles pasarán desapercibidos.

El uso de reactivos coloreados (azul para anti-A y amarillo para anti-B) permite al técnico verificar que el reactivo se ha incorporado a la prueba. Los reactivos deben contener también etilendiaminatetraacetato (EDTA; 0,1 mol/litro, pH 7,1–7,3); el EDTA inhibe completamente e impide la hemólisis por hemolisinas potentes cuando se utiliza suero fresco.

*Suspensiones de eritrocitos*

Las suspensiones de eritrocitos deben ser en solución salina al 2–3% (0,154 mol/litro NaCl; 9 g/litro) y se pueden hacer directamente a partir de la muestra sin lavar los eritrocitos. Cuando se preparan suspensiones de eritrocitos de grupo A y de grupo B para clasificación de suero, la incorporación de EDTA (0,1 mol/litro, Ph 7,1–7,3) a la solución salina evitará la hemólisis debida a la alta titulación anti-A y anti-B en presencia de complemento (suero fresco).

*Orden de las actividades para una eficiente prueba por lotes*

Las gradillas de tubos se disponen según el protocolo de trabajo (figura 1) y la identidad de las muestras se anota en cierto sentido (por ejemplo, de izquierda a derecha). Las muestras de las gradillas se mantienen siempre en el mismo orden sin alterarlo ni dejar tubos sobre la mesa porque eso puede conducir a errores de manipulación.

Los errores en la manipulación de las muestras se evitan por los siguientes medios:

- Cotejando el número de la muestra con el número que figura en el protocolo.
- Manipulando la muestra sólo una vez para sacar suero y eritrocitos.
- Procediendo siempre en el mismo orden (por ejemplo, de izquierda a derecha).
- Reemplazando cada muestra, inmediatamente después del uso, en su sitio en la gradilla. Es aconsejable dejar la primera hilera de

la gradilla vacía. Eso permite reemplazar cada muestra analizada en la hilera precedente marcando así automáticamente el lugar que le corresponde a la última muestra analizada; eso es una precaución esencial para evitar errores de orden cuando existe la probabilidad de que se interrumpa al personal en el curso de su trabajo serológico. Las células de control (A, B y O) se incorporan al final y la lectura se hace primero para asegurarse de que actúan en el periodo de incubación más breve de las muestras analizadas en cada lote.

### *Lectura de resultados*

Se empieza por examinar el sobrenadante de cada tubo para detectar la hemolisis, indicadora de positividad. (Si se observa hemolisis en todas las pruebas cabe sospechar que hay un lote de solución salina defectuoso.) Seguidamente se observa la aglutinación.

### **Pruebas en microplaca**

Las microplacas son de poliestireno rígido y tienen 96 concavidades o pocillos. Las placas se pueden reutilizar si se las lava bien y se las seca.

Las microplacas se pueden rotular de manera que puedan examinarse todas las pruebas correspondientes a cada paciente, lo que reduce el riesgo de errores de manipulación. Los reactivos y la muestra se usan en cantidades menores que para las pruebas en tubo y las placas se pueden cargar de antemano y almacenar para emplearlas cuando llegue el momento. Pueden incluirse controles en cada placa.

El protocolo de la figura 1 es aplicable a las microplacas. El procedimiento es idéntico al de las pruebas en tubo de sedimentación (o las de tubo de centrifugadora si se utiliza una de éstas para microplacas). La lectura de resultados se puede hacer por medios automáticos con un lector de microplacas o a ojo, utilizando un espejo o una caja iluminada, después de una segunda suspensión del poso de células en los pocillos (que se efectuará suavemente, a mano, o por medios mecánicos con un batidor).

### **TECNICAS DE DETERMINACION DEL TIPO Rh(D)**

Ultimamente se han conseguido reactivos monoclonales de alta titulación IgM anti-D utilizables a la temperatura ambiente o a

37 °C. Sirven para las pruebas en portaobjetos, loseta, tubo (de centrifugadora o de sedimentación) y microplaca.

Sin embargo, los reactivos de IgG anti-D no se pueden utilizar para pruebas con solución salina a menos que se los someta a tratamiento químico para reforzar su acción aglutinante (véase lo que sigue); para conseguir la aglutinación también se pueden utilizar sustancias potenciadoras como la albúmina o las enzimas (proteasa). En general, los reactivos se deben incubar a 37 °C y utilizar y controlar según las instrucciones del fabricante.

### **Orden de las actividades para una eficiente prueba por lotes**

La prueba por lotes se realiza al mismo tiempo que la determinación de los grupos ABO para reducir al mínimo los errores por manipulación múltiple de las muestras. Los protocolos de trabajo se indican en la figura 1 (reactivo IgM anti-D) y la figura 2 (reactivo IgG anti-D).

Resulta más fácil proceder por orden en la determinación de los grupos ABO y Rh(D) si se disponen las gradillas, o las microplacas, en hilera, lo que reduce al mínimo los movimientos del operador y los errores. Los controles en determinación del Rh(D) se incorporan al final y los resultados se leen primero para asegurarse de que actúan en el tiempo de incubación más breve por comparación con las muestras sometidas a prueba. El control positivo debe ser un eritrocito O positivo (los fenotipos  $R_1r$  o  $R_1R_2$  son los mejores, cuando se dispone de ellos) y el control negativo es un eritrocito O, Rh(D)-negativo.

El autocontrol ABO también sirve como autocontrol del Rh(D) cuando para la prueba se usan reactivos monoclonales de IgM en solución salina. Sin embargo, cuando se usan reactivos IgG anti-D, el control del diluyente se realiza a 37 °C. Un autocontrol o prueba de control de diluyente positiva puede indicar que los eritrocitos del paciente están sensibilizados con un anticuerpo ligado *in vivo*. En tal caso serán aglutinados por el agente de refuerzo, por ejemplo albúmina, incluso si el paciente es Rh(D)-negativo. Para la determinación de grupo en esos casos se pueden usar reactivos IgM anti-D de alta titulación, si la autopruueba salina es negativa. Sin embargo, en ciertos casos de enfermedad hemolítica del recién nacido, los eritrocitos de éste están tan recubiertos de IgG anti-D que dan falsos resultados negativos debido al bloqueo de la absorción de la IgM anti-D por la IgG anti-D sensibilizante.

En la clasificación de la sangre de donantes, las pruebas negativas deberán ser confirmadas con un segundo reactivo o con una prueba en dos fases (véase lo que sigue).

**Figura 2. Modelo de protocolo de trabajo para la clasificación Rh(D) usando como reactivo IgG anti-D reforzada**

Fecha . . . . .  
 Técnico . . . . .

Temperatura: 37 °C

N.º de identificación	1	2	3	4	5	6	7	8	OD+ (R <sub>1</sub> r)	OD- (rr)	Hora	Hora (lectura)
Anti-D												
Control de diluyente												
Grupo Rh(D)												

## **Problemas de determinación del tipo Rh(D) debido a debilidad de las variantes D (D<sup>u</sup>) y D**

La expresión del complejo antigénico Rh(D) es variable. En un grupo proporcionalmente pequeño de personas los eritrocitos tienen relativamente poco antígeno Rh(D), por lo que pueden no responder a los reactivos monoclonales IgM anti-D, a los reactivos IgG anti-D químicamente modificados y a los reactivos reforzados con albúmina. Sin embargo, pueden responder con reactivos IgG anti-D seleccionados en las pruebas con enzimas o antiglobulina. Esos se denominan grupos D débiles (D<sup>u</sup> bajo). No se los considera de gran importancia clínica en la transfusión porque tampoco se cree que sean inmunogénicos. Además de los grupos D débiles hay también una incidencia muy baja de variantes de D que expresen con fuerza algunos epitopos pero que no expresen otros de este complejo antígeno mosaico.

El hecho de que, con un reactivo salino anti-D no se detecte una variante de Rh(D) en los eritrocitos de un paciente y se clasifique a éste como Rh(D)-negativo no es grave porque esos sujetos pueden producir anticuerpos anti-D contra los epitopos que faltan de D. En la clasificación de sangre de donantes la situación es distinta: es esencial detectar las variantes y clasificar la sangre como Rh(D)-positiva porque aquéllas pueden ser inmunógenas. En consecuencia, todas las pruebas de donantes que resulten negativas para Rh(D) habrán de ser confirmadas en una segunda fase o prueba. Eso se puede conseguir convirtiendo la prueba negativa de solución salina en una fase antiglobulina con reactivos monoclonales IgM anti-D, mezclados con IgG anti-D para ese fin, o realizando una segunda prueba con un potenciador anti-D (por ejemplo albúmina) que detecte las variantes de Rh(D).

## **PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD**

Inmediatamente que se recibe la muestra de sangre en el laboratorio, el personal debe verificar si está debidamente rotulada y si la información que figura en la muestra coincide con la que figura en la solicitud. También se debe tomar nota de la historia pertinente del paciente (por ejemplo, transfusiones, embarazo, tratamiento medicamentoso), que debe figurar en la hoja de solicitud.

Debe tenerse mucho cuidado de identificar y rotular correctamente el suero que se separe de la muestra original de sangre del paciente. El suero se almacenará, de ser posible, a

–20 °C, o se mantendrá a 4 °C si se va a usar en los tres días siguientes. Se necesitará una nueva muestra de sangre para la prueba de cruce, en caso de que el paciente haya recibido una transfusión desde la fecha en que se tomó la muestra de suero, y de que la transfusión date de más de tres días, con el fin de detectar los anticuerpos que se puedan haber formado recientemente.

Sólo se requiere la prueba «principal» de cruce del suero del paciente con los eritrocitos del donante. El objeto del cruce es prevenir la incompatibilidad *in vivo*. Esta es particularmente grave cuando hay incompatibilidad ABO y, sobre todo, cuando se administran eritrocitos A o B a un paciente del grupo O que tenga una alta titulación de anticuerpos anti-A o anti-B. En general, la incompatibilidad se detecta por aglutinación pero también se puede demostrar por hemolisis.

El método que se siga dependerá de las circunstancias clínicas. En los casos de urgencia habrá que sacrificar la escrupulosidad a fin de suministrar sangre rápidamente al enfermo. Hay dos errores graves que se deben evitar: el suministro de sangre con incompatibilidad ABO, debido a las prisas o a procedimientos equivocados, y la demora de la transfusión con el riesgo de que el paciente sufra choque irreversible.

Una vez determinado el grupo ABO del paciente y el tipo de Rh(D), se escogerá sangre donada del mismo grupo y tipo. En el caso de mujeres en edad fecunda es particularmente importante que el tipo de Rh(D) sea correcto. Se cruza el suero del paciente con los eritrocitos del donante para confirmar la compatibilidad entre uno y otro; para ello puede usarse un protocolo de trabajo como el de la figura 3. Se puede emplear solución salina estándar (isotónica o hipotónica).

### **Prueba estándar (véase la figura 3a)**

En la prueba estándar se incorpora una medida de eritrocitos del donante (suspensión en solución isotónica al 30%) a cuatro medidas de suero del paciente. Al igual que con los protocolos de trabajo de la clasificación por grupos ABO y del tipo Rh(D), la incorporación de reactivos y muestras a los tubos se efectúa según un orden determinado. Los tubos que contienen los eritrocitos del donante se rotulan por orden (1, 2, 3, 4, etc.) pero los números de las bolsas de sangre de donante se anotan en el protocolo.

El contenido de los tubos se mezcla, se incuba a 37 °C durante 45 minutos, se centrifuga y se leen los resultados de la aglutinación.

Si la lectura de aglutinado se efectúa por la técnica de traspaso con pipeta, se deberán usar tubos distintos para la aglutinación y para la prueba de antiglobulina. Un resultado positivo (aglutinación, hemolisis o ambas cosas) indica incompatibilidad, por lo que la correspondiente unidad de sangre del donante no se deberá usar para transfusión al paciente de que se trate.

Si la prueba es negativa (ni aglutinación ni hemolisis), los eritrocitos de cada tubo se lavan cuatro veces con solución salina limpia y se efectúa la prueba de antiglobulina humana (AGH) (prueba de «centrifugado inmediato»). Si esta prueba es negativa, las sangres son compatibles y se puede rotular en consecuencia. Se preparan etiquetas de compatibilidad cruzada y se verifican con los protocolos la identidad de las muestras del paciente y del donante. Los resultados de la determinación de grupo ABO y del tipo Rh(D) se comprueban también comparando con la etiqueta de las bolsas. (Véase en el capítulo 8, páginas 117-121, el examen de control de calidad de la prueba AGH.)

### **Pruebas con solución hipotónica (véase la figura 3b)**

El principio en que se basan estas pruebas es el mismo que el de la prueba estándar. Sin embargo, en este caso se incorporan dos medidas de eritrocitos del donante (suspensión en 0,03 mol/litro de solución hipotónica al 1,5–2%) a dos medidas de suero del paciente (véase también el capítulo 8).

### **Pruebas de compatibilidad urgentes**

Para las pruebas de compatibilidad urgentes se usan los protocolos ya indicados. El grupo ABO y el tipo Rh(D) del paciente se determinan mediante pruebas rápidas en portaobjetos o en tubos de centrifugación inmediata. Los laboratorios que emplean las pruebas de solución hipotónica para el trabajo normal están en buenas condiciones para realizar las pruebas urgentes sin merma de la sensibilidad después de un breve periodo de incubación (15 minutos). Ahora bien, no es recomendable que los laboratorios que emplean las pruebas de solución isotónica cambien a las de solución hipotónica en casos de urgencia. Con la prueba estándar se recomienda un periodo de incubación más breve (15 minutos), aun admitiendo que quizás se pasen por alto algunas pequeñas incompatibilidades.



**Prueba de AGH - prueba indirecta de antiglobulina**

(b) *Solución hipotónica (SH) - prueba, 15 minutos - 1 tubo - 2 fases*  
 2 medidas (gotas) de suero del paciente: 2 medidas de eritrocitos del donante<sup>a</sup> en SH al 1,5-2,0 %

	Bloque N ° 2		SH					Temperatura · 37 °C		
	Suspensión de eritrocitos en SH al 1,5-2,0 %									
Unidades del donante (Número)	1	2	3	4	5	6	7	8	Hora	Hora (lectura)
Paciente N.º										
Suero									+ D débil	- AB/S <sup>b</sup>
Fase 1: aglutinación en salina									Controles AGH	
Fase 2 prueba con AGH										

<sup>a</sup> Los eritrocitos del donante deben ser lavados dos veces en SI antes de la suspensión en SH

<sup>b</sup> Suero, grupo AB

### **Despacho urgente de sangre, sin tiempo para una prueba de compatibilidad completa**

En las urgencias deben tomarse a los pacientes muestras de sangre para tratar con EDTA y muestras para coagulación antes de administrarles por vía intravenosa coloides como el dextrano y el almidón hidroxietilo. Se determinará por técnicas rápidas el grupo ABO y el tipo Rh(D) de la sangre de los pacientes. Se puede despachar sangre compatible una vez excluida la incompatibilidad ABO mediante una prueba rápida (2–5 minutos) de centrifugación de tubo con solución salina, utilizando dos partes de suero del paciente por una parte de eritrocitos del donante al 3%. En cualquier caso deberán preverse las pruebas ordinarias de compatibilidad y si en esta fase se detectan incompatibilidades habrá que tomar las medidas apropiadas.

Si se sigue ese procedimiento raramente habrá que recurrir al uso de sangre del grupo O Rh(D)-negativa. Llegado este caso, sólo se despacharían unidades cuya pertenencia al grupo hubiera sido comprobada.

Cuando se administran transfusiones masivas (es decir, cuando el número de unidades transfundidas en un periodo de 24 horas excede del volumen de sangre del receptor), la «verificación de compatibilidad» se reducirá a comprobar los grupos ABO y el tipo de Rh(D) de las unidades transfundidas. Después de esa acción urgente se procederá con carácter retrospectivo a la prueba de compatibilidad cruzada (cruce de la sangre) utilizando para ello la muestra pretransfusión. En caso de que se necesite más sangre se elegirá una compatible; lo ideal es identificar los anticuerpos que se encuentren.

Las unidades de sangre del donante que no hayan sido analizadas ni cruzadas con el suero del paciente se rotularán claramente «Seleccionada para el paciente .... pero pendiente de prueba cruzada».

### **La transfusión a lactantes**

Antes de la transfusión de sangre a un lactante se determinarán los grupos ABO y los tipos Rh(D) tanto de la madre como del niño. Con eritrocitos de éste se realizará una prueba de AGH y, si resulta negativa, se practicará una prueba cruzada de compatibilidad con sangre del mismo grupo y tipo que la del lactante, usando suero de

la madre (si es ABO-compatible) o del niño. Eso se hace para excluir la posibilidad de que haya un anticuerpo incompatible de la madre en el suero del niño y que en los eritrocitos de éste no haya un antígeno contra dicho anticuerpo. Los lactantes de menos de cuatro meses no producen alo-anticuerpos de eritrocito, incluso después de muchas transfusiones.

Es importante utilizar suero de la madre para las pruebas de compatibilidad si el niño tiene la enfermedad hemolítica del recién nacido o si se observa alguna incompatibilidad en la prueba cruzada. Eso puede aconsejar el uso de sangre del grupo O. Si el lactante no es del grupo O, habrá que asegurarse de que las unidades de sangre del donante tengan una baja titulación anti-A y anti-B. Cuando se sospeche la existencia de enfermedad hemolítica ABO del recién nacido habrá que usar sangre del grupo O con baja titulación anti-A y anti-B. Es una buena práctica utilizar eritrocitos concentrados O, resuspendidos en una tercera parte de plasma AB (o plasma A, o B, según proceda), especialmente para la transfusión de intercambio, ya que el plasma A o B contribuye a neutralizar los anticuerpos anti-A o anti-B.

### **Selección de sangre para pacientes con anticuerpos anómalos**

Si se encuentran unidades de sangre incompatibles, lo primero que hay que hacer es asegurarse de que no se las confunda debido a errores de manipulación, que las unidades tengan compatibilidad ABO con la muestra del paciente y se utilice una muestra adecuada de la sangre de éste. La prueba de cruce se debe repetir con las mismas unidades y con otras adicionales. Se incluye un autocontrol porque una autoprueba positiva puede ser causa de las reacciones. Si el anticuerpo se dirige contra un antígeno de baja o moderada frecuencia será posible obtener suficiente sangre compatible para atender las necesidades en la mayoría de los casos. En los pequeños bancos de sangre, donde se dispone de pocas unidades, conviene buscar entre los allegados del paciente para ver si hay donantes más compatibles; eso reviste particular importancia cuando el anticuerpo reacciona con antígenos muy frecuentes o cuando hay una mezcla de anticuerpos.

Ese sencillo procedimiento de selección mediante cruce de la sangre suele permitir atender la necesidad clínica del paciente. Ahora bien, el procedimiento de identificación de anticuerpos es muy importante porque permite obtener una experiencia en la solución de problemas que es esencial para el buen desarrollo del servicio.

## **INVESTIGACION DE REACCIONES HEMOLITICAS A LA TRANSFUSION**

Las causas más frecuentes de reacción hemolítica grave a la transfusión son una incompatibilidad ABO o el uso de sangre infectada. La incompatibilidad suele deberse a errores de manipulación, cuando las muestras proceden de otro paciente o cuando la sangre compatible para un paciente se administra a otro. Además, los errores de manipulación que afectan a un paciente pueden involucrar a otros cuyas sangres se cruzan al mismo tiempo. En consecuencia, es esencial verificar las muestras, las donaciones y la documentación para todas las pruebas cruzadas que se efectúan en un momento. Cuando se detecta un error de manipulación hay que notificárselo a todo el personal para que les sirva de experiencia y hay que examinar todo el sistema administrativo y de documentación para intentar mejorarlo.

Si se demuestra que las reacciones a la transfusión se deben a sangre infectada es esencial hacer un análisis minucioso de todos los procedimientos de toma, preparación, almacenamiento y transporte de la sangre o los productos sanguíneos, inclusive los de limpieza cotidiana de todo el equipo y las centrifugadoras del centro de transfusión. Si las reacciones a sangre infectada se producen más de una vez en un periodo de seis meses habrá que llamar a un experto exterior para que investigue la causa.

### **Pruebas serológicas**

Los especímenes necesarios para la investigación serológica de las reacciones a la transfusión son:

- Suero pretransfusión y eritrocitos del paciente.
- Muestras coaguladas tomadas del enfermo inmediatamente y a las 24 horas más o menos de la transfusión. Estas últimas son necesarias porque los anticuerpos anómalos pueden no ser detectables inmediatamente después de una transfusión incompatible.
- Lo que quede de todas las unidades de sangre del donante y las series de células del receptor.
- Orina del paciente tomada en las 24 horas siguientes a la reacción. En caso de hemolisis intravascular la orina será oscura debido a la presencia de metahemoglobina.

Se repetirán las pruebas de determinación de grupo ABO y Rh(D) de las muestras de sangre del paciente y las unidades

tomadas del donante. Se realizarán pruebas directas antiglobulina con lavados tomados del paciente antes y después de la transfusión. Se repetirán las pruebas cruzadas de eritrocitos del donante con suero del paciente, utilizando muestras pretransfusión y postransfusión. Estas últimas, así como muestras de plasma del donante, se analizarán para ver si contienen anticuerpos anómalos. Si el donante es del grupo O y el paciente del grupo A o el B, se determinarán las titulaciones de anticuerpos anti-A y anti-B en el plasma del donante. Los donantes con alta titulación ( $>128$ ) se considerarán como pertenecientes al «grupo de donantes peligrosos del grupo O».

### **Pruebas bacteriológicas**

Se efectuará un análisis bacteriológico de la sangre donada por los métodos de tinción Gram, examen de extensiones y cultivo a 4 °C, 20 °C, y 32 °C.

### **Pruebas bioquímicas**

Se hará un examen de suero postransfusión del paciente para detectar hemolisis, bilirrubina, hemoglobina libre y derivados hemoglobínicos. Los resultados de las pruebas se cotejarán con los correspondientes a las muestras pretransfusión.

## **ENFERMEDAD HEMOLITICA DEL RECIEN NACIDO**

### **Pruebas antes del parto**

En los países que carecen de medios para realizar pruebas de detección de anticuerpos a todas las mujeres gestantes debe darse prioridad al examen de las que sean Rh(D)-negativas o las que puedan haber sido inmunizadas previamente por transfusión o durante un embarazo. En esos casos se determinará el grupo ABO y Rh(D) y se analizará el suero con tres series por lo menos de células mediante las pruebas de antiglobulina humana en solución salina y centrifugación. Las células deberán ser del grupo O y comprenderán los antígenos C, c, D, E, e, M, N, S, s, K, k, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>. Una serie por lo menos deberá tener la combinación más fuerte R<sub>2</sub> de antígeno D, o ser el fenotipo *CDe/CDe*.

Si faltan células para análisis, la segunda posibilidad es una

prueba de AGH y solución salina del suero de la madre y eritrocitos del padre. Eso revelará si éste tiene un antígeno contra el anticuerpo detectado. Los anti-A o anti-B se neutralizan si hay incompatibilidad ABO. Este método tiene limitaciones evidentes en casos de paternidad controvertida o de mujeres que han sido sensibilizadas por transfusión.

Se determinará la especificidad de los anticuerpos, recordando que sólo los IgG atraviesan la placenta. Esa determinación permitirá al especialista vigilar los progresos del niño y dar tiempo al servicio para encontrar una sangre compatible en caso de que la madre o el niño necesite transfusión.

### **Pruebas en el parto**

El sistema más económico de prueba en el momento del parto consiste en determinar el grupo ABO y Rh(D) de la madre y del niño y luego realizar una prueba directa de antiglobulina con eritrocitos de cualquier niño que padezca ictericia, anemia o ambas cosas. Si la prueba directa AGH es negativa quedará excluida la incompatibilidad serológica, excepto si hay enfermedad hemolítica ABO del recién nacido (véase lo que sigue).

Ahora bien, si la prueba directa AGH es positiva habrá que analizar suero de la madre para identificar el anticuerpo. Si la prueba directa AGH del niño es positiva y no hay anticuerpos en el suero de la madre quedará excluida la incompatibilidad serológica, a menos que se deba a enfermedad hemolítica ABO del recién nacido. Con muestras de sangre coagulada almacenadas en frío, las pruebas directas de AGH pueden dar resultados positivos poco marcados pero ello no tiene ninguna significación clínica.

Para asegurarse de que el panel de células no ha fallado en la detección de un anticuerpo debido a la ausencia del antígeno correspondiente, el suero de la madre se somete de nuevo a prueba AGH con eritrocitos del niño para excluir la incompatibilidad serológica. En casos de incompatibilidad ABO, será necesario neutralizar los anticuerpos anti-A o anti-B.

Para la transfusión a lactantes en caso de enfermedad hemolítica, nos remitimos a la sección precedente sobre pruebas de compatibilidad para lactante (véase la página 80).

### **Enfermedad hemolítica ABO del recién nacido**

La enfermedad hemolítica ABO del recién nacido se produce cuando las titulaciones de IgG anti-A o anti-B son tan altas que

superan a las sustancias protectoras A y B del plasma del niño y destruyen los eritrocitos en que el antígeno A o el B están poco desarrollados. Por consiguiente, la enfermedad se limita casi exclusivamente a hijos de madres del grupo O, cuyas titulaciones de IgG anti-A o anti-B son unas 16 veces más altas que las de las madres del grupo B o del grupo A. La enfermedad hemolítica ABO del recién nacido es difícil de diagnosticar: se precisan técnicas especiales para demostrar la presencia de IgG anti-A o anti-B y la prueba directa de AGH en los niños afectados puede ser negativa. Además, cuando es positiva, los resultados pueden ser poco marcados.

El mejor diagnóstico, usando la técnica de AGH con células  $A_1$  y B de adulto, consiste en detectar anticuerpos anti-A o anti-B en un eluato caliente de eritrocitos de una muestra de sangre tomada del cordón umbilical del niño. Los anticuerpos anti-A o anti-B serán demostrables en la mayoría de los casos de enfermedad hemolítica ABO. Las pruebas con células del grupo O y el control del último lavado deberán ser negativas.

Una prueba más sencilla consiste en detectar anticuerpos anti-A o anti-B en el suero de la muestra de sangre del cordón umbilical por la técnica AGH con células  $A_1$  y B de adulto. Si el niño es el grupo A, la prueba crítica es con células  $A_1$ , y será positiva si hay enfermedad hemolítica ABO; a la inversa, si el niño es del grupo B, la prueba crítica es con células B. Con células de un niño del grupo A siempre habrá una fuerte reacción en presencia de células del grupo B; con células de un niño del grupo B, es de esperar una fuerte reacción en presencia de células  $A_1$ , pero esa reacción no será significativa porque los anticuerpos anti-A o anti-B no están involucrados en la patogénesis del trastorno. La prueba con eritrocitos del grupo O debe ser negativa; de ser positiva, ello indica la presencia de otro anticuerpo como causa concomitante de la enfermedad, sobre todo si la prueba directa antiglobulina es fuertemente positiva.

Las pruebas serológicas pueden ser negativas si la muestra de sangre del niño no se toma hasta pasados 2–3 días del parto. Ello se debe a que los anticuerpos anti-A o anti-B incompatibles quedan eliminados al destruirse los eritrocitos.

## **IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS ANOMALOS**

Los laboratorios que se ocupan de la identificación de anticuerpos deben disponer de un panel adecuado de eritrocitos, debidamente agrupados para tantos antígenos como sea posible. Los eritrocitos

estarán dispuestos en combinaciones escogidas de antígenos que permitan la identificación de los anticuerpos más frecuentes mediante la serie de pruebas de positividad y de negatividad. Un panel de células estará compuesto de ocho muestras, por lo menos, de células del grupo O (para evitar las reacciones anti-A o anti-B), aunque también suelen disponer de células de los tipos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, y B. Inicialmente se puede usar una colección de eritrocitos comprada u obtenida de fuentes de confianza. Más adelante, cuando el laboratorio tenga suficiente experiencia, podrá preparar un panel mediante determinación del grupo sanguíneo del personal del laboratorio, confirmada por un laboratorio de referencia. Ahora bien, los sueros para determinación de grupos suelen ser muy caros.

La combinación de antígenos debe abarcar los genotipos Rh: *CDe/CDe, CDe/cde, Cde/cde, cDE/cDE, cdE/cde, y cde/cde*. También es útil disponer de células C<sup>w</sup>-positivas. Otros antígenos son: K en una célula rr; Fy(a+b-) y Jk(a+b+) o Jk(a+b-) en otras células rr; y combinaciones de MM, MN, NN, S+, S-, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, Le(a+b-), Le(a-b+), y Le(a-b-) dispuestas en 8-10 muestras de eritrocitos del grupo O. Para facilitar la detección de anticuerpos, las combinaciones de antígenos del panel deben reflejar las variaciones de la prevalencia en los distintos grupos étnicos de la población local.

### **Técnicas para la identificación de anticuerpos**

El suero con anticuerpos se contrasta con el panel de eritrocitos mediante, por lo menos, prueba de solución salina y prueba de AGH a 37 °C porque algunos anticuerpos se comportan de modo distinto en esos dos tipos de pruebas. Es útil emplear eritrocitos lavados tratados con papaína o bromelina, ya que esta prueba es de gran sensibilidad; de hecho, igual o mayor que la prueba AGH con centrifugación para los anticuerpos Rh. Además, el tratamiento con enzimas destruye los antígenos M, N, S y Fy<sup>a</sup>, lo que facilita la identificación de los anticuerpos de esa especie, sobre todo cuando están mezclados con otros anticuerpos.

Los anticuerpos del tipo IgM reaccionan en pruebas con solución salina. Cuando esos anticuerpos existen, el uso de solución salina a 20-23 °C puede reforzar las reacciones y ahorrar tiempo en la identificación de anticuerpos que son óptimamente activos en frío, por ejemplo, los anti-P<sub>1</sub>, anti-Le<sup>a</sup>, anti-Le<sup>b</sup> o anti-HI. En los países tropicales, con temperaturas ambiente superiores a 28 °C, los anticuerpos activos en frío son más difíciles de detectar. Es poco probable que dichos anticuerpos dificulten la determinación de

grupo ABO o el cruce de la sangre a esas temperaturas.

Los anticuerpos de tipo IgG no suelen ser activos en las pruebas de solución salina. Constituyen excepciones los anti-A, anti-B, anti-M y anti-N cuando los eritrocitos reactivos tienen una densidad de antígeno muy alta. Los anticuerpos IgG se detectan óptimamente mediante pruebas potenciadas (con albúmina, enzima o antiglobulina indirecta); la prueba indirecta antiglobulina en tubo de centrifugación es la más importante para detectar anticuerpos clínicamente significativos. Las pruebas con albúmina no son tan sensibles como las indirectas antiglobulina, por lo que puede prescindirse de ellas. Ahora bien, si *se usan*, las técnicas de incubación prolongada y sustitución de albúmina son preferibles a las de suspensión en albúmina con breves plazos de incubación, porque resultan más sensibles.

El suero objeto de estudio se debe también probar con células del paciente (autoprueba). Si la autoprueba es positiva se debe considerar la posibilidad de un autoanticuerpo, de panaglutinación no específica, o formación de glomérulos. Si hay un autoanticuerpo, una prueba directa antiglobulina positiva con eritrocitos del paciente, junto con los resultados clínicos y hematológicos, indicará anemia hemolítica autoinmune.

La determinación de la especificidad del anticuerpo debe ir seguida de la tipificación de los eritrocitos del paciente para cerciorarse de que carecen del antígeno correspondiente a ese anticuerpo. Es aconsejable confirmar los resultados mediante envío de muestras del suero y de los eritrocitos en solución de ácido, citrato y dextrosa (o, de preferencia, solución de Alsever), a un laboratorio de referencia.