

## Gaceta Médica de México

Volumen 139  
Volume

Suplemento 3  
Supplement

Septiembre-Octubre 2003  
September-October

*Artículo:*

### Simposio de inmunohematología

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

**Otras secciones de  
este sitio:**

- 👉 **Índice de este número**
- 👉 **Más revistas**
- 👉 **Búsqueda**

***Others sections in  
this web site:***

- 👉 ***Contents of this number***
- 👉 ***More journals***
- 👉 ***Search***



**Medigraphic.com**

## I. Introduccion

Clotilde Estrada-Carsolio

El hombre ha intentado ayudar a sus semejantes a través de la administración de sangre, existen datos registrados desde la época de los egipcios, griegos y romanos. Desde la administración de transfusiones con sangre de animales hasta beber la sangre de fuertes guerreros.<sup>1</sup>

En 1901 se llevó a cabo el descubrimiento del sistema ABO a través de los experimentos de Karl Landsteiner; para 1927 se realizó el descubrimiento de los sistemas MN y P a través de experimentos con animales; en 1939 Levine y Stetson encontraron el sistema Rh-Hr en su famoso estudio obstétrico<sup>4</sup> y en esta tónica de investigaciones siguieron los descubrimientos de los sistemas de grupos sanguíneos y su estudio, así en 1944 a través de las técnicas de bloqueo de anticuerpos fueron encontrados los llamados *anticuerpos incompletos* o sensibilizantes que se estudiaron con mas amplitud en 1945 gracias al empleo de la albúmina bovina. Para el fin de ese mismo año se comenzaron a emplear la técnica de la antiglobulina humana directa (Coombs), y algunas enzimas proteolíticas que dieron lugar al descubrimiento de sistemas como Kell y Lewis en 1946, Duffy en 1950 y Kidd en 1951.<sup>2</sup> Conforme se avanzó en el uso de diversas técnicas se fueron descubriendo cada vez mas sistemas y en 1980 la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT) por sus siglas en inglés, formó la Asociación en la Terminología de los Antígenos en la Superficie de las Células Rojas para unificar la nomenclatura, a través, no de modificar los nombres de los sistemas, sino del empleo de números para facilitar y unificar la identificación manual y en los sistemas de cómputo. Utilizando esta clase de terminología se reconocen hasta la fecha 26 sistemas, con sus correspondientes antígenos.<sup>5</sup> Debido a la gran variedad de antígenos descubiertos se ha hecho necesario el empleo de técnicas cada vez mas sofisticadas para la detección de los anticuerpos que se producen posteriores a una transfusión, durante el embarazo y en algunos estados patológicos; entre estos

estudios está el empleo de soluciones de baja fuerza iónica, el uso de agentes reductores como el 2-mercaptoetanol, el ditionietol (DTT), el bromuro de 2-aminoetilisotioureonio y el empleo de combinaciones de reactivos como es el caso del (ZZAP) que es una mezcla de papaína-L-cisteína activada y DTT.<sup>6-12</sup>

La metodología de estudio también ha sufrido transformaciones como la del empleo en la actualidad de las tarjetas con columnas de gel, ya sea por gradiente de peso o por intercambio de cargas,<sup>13</sup> que es también empleada para la realización de las pruebas de compatibilidad, que son realizadas para: procurar que el paciente reciba el máximo beneficio de la transfusión, prevenir una reacción hemolítica transfusional, detectar anticuerpos irregulares en el suero del paciente contra los glóbulos rojos del donante, en la prueba mayor y para detectar anticuerpos en el suero del donante contra los glóbulos rojos del receptor en la prueba menor; detectar errores en la determinación del sistema ABO y detectar errores en la identificación de las muestras de donantes y receptores.

Sin embargo, la prueba de compatibilidad no puede garantizar la sobrevivencia normal de los eritrocitos transfundidos, no asegura ausencia total de anticuerpos en donantes y receptores, no previene la inmunización del receptor, no detecta todos los errores de clasificación del sistema ABO, no detecta errores en la clasificación del sistema Rh-Hr, no detecta todos los errores clericales o administrativos, no detecta anticuerpos anti-leucocitos, anti-plaquetas ni anti-proteínas séricas.<sup>3</sup> Es por éstas razones que es necesario mantener bajo control todas las variables que pueden afectar cada uno de los procesos en todos los procedimientos de los bancos de sangre, tales son, por ejemplo, la temperatura de conservación de los reactivos, la especificidad, potencia y sensibilidad de los mismos, las velocidades y temperaturas de centrifugación, el control de la temperatura ambiental, el control de los instrumentos de conservación de las unidades sanguíneas, la

higiene en todos los trabajos realizados en torno a cada proceso. Desde la asepsia de los brazos de los donadores y la realización sistemática a cada una de las unidades obtenidas de las pruebas de detección de enfermedades transmisibles por vía sanguínea, hasta la limpieza de las áreas de trabajo; la calibración y mantenimiento preventivo de todos los instrumentos de seguimiento y medición; el transporte dentro y fuera del banco de sangre, de las unidades sanguíneas;<sup>14</sup> y todos los procesos que puedan implicar errores clericales o administrativos como son: La obtención de las historias clínicas y ginecoobstétricas de los pacientes que incluyan diagnóstico<sup>15</sup> y tipo de tratamiento que está recibiendo; la identificación del paciente y de la unidad a ser transfundida, el etiquetado, la obtención correcta y la antigüedad de la muestra; adicionalmente se deben realizar supervisiones de los datos que son asentados en libretas formatos, sistemas de cómputo, etc.<sup>16, 17</sup>

En muchos de los casos y manteniendo siempre el control de los procesos, no encontraremos problemas de incompatibilidad, sin embargo habrá otros en los que desde el principio de la prueba de compatibilidad existan aglutinaciones inesperadas que estén relacionadas con los diagnósticos de los pacientes,<sup>15</sup> con la presencia de anticuerpos naturales regulares, naturales irregulares e irregulares por transfusiones o embarazos previos.<sup>16,18,19</sup> Es esta la razón por la cual debe tenerse en cada banco de sangre un algoritmo para el estudio de los problemas de incompatibilidad que conduzca a la resolución de los mismos.

Falta mucho aún por estudiar y descubrir en el maravilloso mundo de la inmunohematología y los bancos de sangre; ¿se harán en el futuro las pruebas de compatibilidad sólo en computadoras? ¿Se omitirá la prueba menor de compatibilidad? ¿Serán sustituidas las pruebas de compatibilidad por el estudio sistemático de búsqueda de anticuerpos irregulares en todos los donadores y el estudio de los antígenos de los receptores?

Son grandes las metas hacia el futuro y bastante lo que nos falta por estudiar, tenemos un gran trabajo por delante y mucho que agradecer a las generaciones que nos han precedido y que sacaron física y moralmente a los bancos de sangre de los sótanos de los hospitales.

## Referencias

1. **Zmijewski C.** The history of blood transfusion. En: *Immunohematology*. 3<sup>rd</sup> ed. Appleton Century-Crofts/New York.
2. **Issitt PD, Issitt CH.** An introduction to immunohematology. In: *Applied blood groups serology*. 2<sup>nd</sup> ed. Spectra Biologicals, Division of Becton and Dickinson Company;
3. **Linares JG.** Transfusión sanguínea. En: *Inmunohematología aplicada al banco de sangre*. Segunda Edición. Litotec C.A.
4. **Radillo AG.** Historia de la transfusión sanguínea. En: *Medicina transfusional*. Editorial Prado; 1999.
5. Appendix 6. Blood groups antigens assigned to systems. In: *aaBB technical manual*, 14<sup>th</sup> ed. American Association of Blood Banks; 2002.
6. **Reid ME.** Autoagglutination dispersal utilizing sulphhydryl compounds. *Transfusion* 1978;18:353-355.
7. **Olson PR, Weiblen BJ, O'Leary JJ, Moscovitz AJ, McCullough J.** A simple technique for inactivation of IgM antibodies using DTT. *Vox Sang.* 1976;30:149-159.
8. **Wyatt D.** Other blood group systems. In: *Immunohematology*. Quinley Eva D. 2nd Edition. Lippincott.
9. **Bergeron D, Adams SM.** Autoimmune hemolytic anemias and drug-induced hemolytic anemias. In: Quinley ED. editor 2<sup>nd</sup> ed. *Immunohematology* Lippincott.
10. Principles of serological methods In: Issitt Peter D, Anstee David J. 4<sup>th</sup> ed. *Applied blood group serology*. Montgomery Scientific Publications.
11. **Branch DR, Petz LD.** A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. *Amer J Clin Path.* 1982;178:161-167.
12. **Advani H, Szamor J, Judd WJ, Johnson CL, Marah WL.** Inactivation of Kell blood group antigens by 2-aminoethyliso-thiuronium bromide. *Br J Haematol* 1982;51:107-115.
13. **Radillo A.** Control de calidad en los bancos de sangre. En: *México: Medicina transfusional*. Prado; 1999.
14. Appendix 7. Suggested quality control performance intervals. In: *aaBB technical manual*, 14<sup>th</sup> ed. American Association of Blood Banks; 2002.
15. **Quintanar-García E.** Uso del panel de eritrocitos de fenotipo conocido, experiencia nacional. *Jornadas Científicas. 35 Aniversario del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional SXXI IMSS.* 1997. p. 25-48.
16. **Dacie J.** The auto-immune haemolytic anaemias. In: *The haemolytic anaemias*. Vol 3. Churchill Livingstone; editors.
17. Pretransfusion testing. In: *aaBB technical manual*, 14<sup>th</sup> ed. Ch. 18. American Association of Blood Banks; 2002.
18. **Van Der Lelie J, Lange JMA, Vos JJE.** Autoimmunity against blood cells in human immunodeficiency-virus (HIV) infection. *Br J Haematol* 1987;67:109-114.
19. **Solinger A, Hess E.** Induction of autoantibodies by human immunodeficiency virus infection and their significance. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1991;17:157-175.



## II. Uso y aplicaciones de reactivos especiales en el laboratorio de inmunohematología

Federico Rodríguez-Quezada

Los aloanticuerpos en contra de los eritrocitos, diferentes a los ya esperados (anti-A, anti-B y anti-AB) son llamados anticuerpos irregulares o fuera del sistema ABO, pueden encontrarse en un rango que varía de 0.3 a 38% de la población en general, dependiendo del grupo de pacientes o de donantes estudiados y de la sensibilidad de las técnicas empleadas.<sup>1</sup> A diferencia de los autoanticuerpos, los aloanticuerpos reaccionan solamente con alogénicos. La aloinmunización a antígenos eritrocitarios puede ser el resultado de embarazos, transfusiones, trasplantes, o después de administración vía parenteral o IM de material inmunogénico. En algunos casos, no se puede identificar la causa o evento inmunizante.

Los aloanticuerpos dirigidos en contra de los eritrocitos se pueden detectar inicialmente en cualquier prueba de laboratorio que involucre el uso de suero o plasma, tales como: la prueba inversa del grupo sanguíneo ABO, el escrutinio de anticuerpos de rutina (cuando se emplea un semipanel de dos a tres células) y las pruebas de compatibilidad o pruebas cruzadas; generalmente cuando se encuentra un anticuerpo se debe identificar su especificidad y determinar si tiene significancia clínica.

Un anticuerpo clínicamente significativo, puede definirse como aquel que acorta el período de sobrevida de los eritrocitos transfundidos o que ha sido asociado con enfermedad hemolítica del recién nacido. Algunos anticuerpos causan la lisis de eritrocitos incompatibles en cuestión de horas e incluso minutos, otros disminuyen la sobrevida solamente unos días y algunos otros no causan lisis aparente.<sup>2</sup>

Desafortunadamente no todas las identificaciones de anticuerpos irregulares son simples (utilizando un panel de 6 a 12 células de fenotipo conocido) y no siempre es uno solo el anticuerpo implicado en el problema, de tal manera que cuando existen dos o más aloanticuerpos o una mezcla de autoanticuerpos con varios aloanticuerpos, resulta complicado y se consume demasiado tiempo para esclarecer el problema.

Una de las premisas más importante cuando nos enfrentamos a muestras de pacientes que resultan con la prueba de autotestigo positiva (lo más probable es que dicho paciente esté produciendo autoanticuerpos, hasta no demostrar lo contrario), es la de determinar si existen aloanticuerpos enmascarados por la presencia del o los autoanticuerpos circulantes o adsorbidos en los eritrocitos del paciente y que pueden causar panaglutinación (todas

las células de rastreo, semipanel o panel completo utilizadas, aglutinan e incluso las que se emplean en la prueba inversa del grupo sanguíneo ABO) como se presentan en casos severos de anemia hemolítica autoinmune mediada por autoanticuerpos calientes o por autoanticuerpos fríos. Una vez identificada la especificidad de dichos aloanticuerpos, es necesario e imprescindible transfundir unidades antígeno negativo cuando el médico tratante indica una transfusión.

A continuación se describen los usos y aplicaciones de algunos de los reactivos de mayor utilidad en la resolución de algunos de estos casos, pero poco conocidos en la mayoría de los bancos de sangre del país.

### Agentes reductores

En ocasiones es necesario prevenir la aglutinación mediada por autoanticuerpos fríos de tipo IgM, y obtener eritrocitos libres (desnudos) de dichos autoanticuerpos para poder tipificar y después fenotipar. La adición de compuestos sulfhidrilo tales como el 2-mercaptoetanol (2-ME) o el ditiotrietol (DTT)<sup>3,4</sup> que pueden ser mezclados con el suero solamente (para eliminar los anticuerpos IgM e investigar anticuerpos IgG) o añadidos a los eritrocitos (para evitar la aglutinación espontánea de células sensibilizadas) actúan principalmente sobre las uniones disulfuro (-S-S-) reduciéndolas (-SH, HS-), de tal manera que las subunidades de la IgM se separan de la cadena "J" que las mantiene unidas y pierden su actividad.

La molécula de IgM en su forma pentamérica se reduce a la forma monomérica y por lo tanto perderá su habilidad para aglutinar los eritrocitos. Aunque el DTT es más resistente a la oxidación por el aire, menos sensible a la luz y carece del olor desagradable del 2-ME, es menos eficiente que el 2-ME en su acción reductora. Un punto importante para recordar es que estos compuestos son más efectivos cuando se les incuban con las muestras problema a 37°C en lugar de a temperatura ambiente (22°-24°C).<sup>5,6</sup>

Se debe considerar que ambos reactivos desnaturalizan los antígenos Jsa y Jsb y que el DTT inactiva todos los antígenos del sistema Kell, (aparte de los ya mencionados arriba, excepto Kx, aunque éste ya no pertenece al sistema Kell, anteriormente se le incluía en este

sistema), Kn<sup>a</sup>, Yt<sup>a</sup>, JMH, y Hy; además de que cuando se utilizan estos reactivos se debe correr en paralelo un control que consiste en mezclar partes iguales de suero y solución salina y compararlo con el suero ya tratado con el agente químico para asegurarse que la dilución del anticuerpo no se está tomando como desnaturalización o inactivación del mismo.<sup>7</sup>

## ZZAP

La adsorción es el proceso mediante el cual se retira del suero el anticuerpo circulante mediante una combinación adecuada del mismo con eritrocitos seleccionados en condiciones de reacción óptimas. La mezcla suero-eritrocitos se incuba, y el anticuerpo es removido adsorbiéndose en los antígenos presentes en la membrana de los eritrocitos; después de la incubación, la mezcla se centrifuga y el suero adsorbido se separa de los eritrocitos.<sup>6,8</sup>

El método de adsorción es comúnmente utilizado para remover autoanticuerpos presentes en el suero; la autoadsorción utilizando eritrocitos del propio paciente, es útil para retirar el o los autoanticuerpos del suero del paciente sin remover cualesquiera de los aloanticuerpos que pudieran estar presentes en el mismo suero.

La temperatura a la cual una autoadsorción es llevada a cabo, depende de la reactividad óptima del autoanticuerpo, esto es, las autoadsorciones calientes llevadas a cabo a una temperatura de 37°C se utilizan para remover autoanticuerpos de tipo IgG, mientras que las autoadsorciones frías se llevan a cabo a 4°C y removerán autoanticuerpos de tipo IgM. Una vez que el autoanticuerpo ha sido adsorbido, el suero del paciente se puede utilizar para identificar los aloanticuerpos o para llevar a cabo pruebas de compatibilidad.

Uno de los reactivos de gran utilidad para llevar a cabo el proceso antes descrito es el ZZAP, que significa por sus siglas en inglés: "disulfide activated proteolytic enzyme", y está compuesto por una mezcla de ditiotrietol (DTT) y una enzima proteolítica (papína L-cisteína activada); se usa para remover anticuerpos de las células sensibilizadas al mismo tiempo que se le da un tratamiento enzimático a las mismas, una vez tratados los eritrocitos con ZZAP ya están listos para llevar a cabo autoadsorciones, debido a que se mantiene la integridad de la membrana eritrocitaria y que dicha membrana carece de anticuerpos IgG.<sup>9</sup>

Las células tratadas con el reactivo poseen mayor número de sitios antigénicos disponibles y estos sitios son más receptivos al anticuerpo, pero dichas células no deben ser utilizadas para fenotipar ya que se pueden obtener resultados falsos negativos o positivos, para eso

existen otros métodos disponibles tales como el uso de cloroquina o el método de la elución glicina ácida.

Este compuesto actúa reduciendo los puentes disulfuro en las moléculas, incrementa la susceptibilidad de las moléculas de IgG a la acción de la enzima proteolítica, por lo tanto la molécula de IgG pierde su integridad y es removida de la superficie de los eritrocitos. De entre las consideraciones que se deben tener está que desnaturaliza los antígenos del sistema Kell (excepto Kx), M, N, S, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Fy<sup>6</sup>, Yt<sup>a</sup>, Ch, Rg, Pr y Xg<sup>a</sup>. Aparte de que se utiliza este reactivo para remover las moléculas de IgG de las células sensibilizadas (cabe mencionar que es muy útil para los casos de AHA por anticuerpos calientes, no así para la mediada por anticuerpos fríos), también se pueden obtener células Ko, que serían útiles en la identificación de un anticuerpo contra un antígeno de alta frecuencia entre la población (ej. anti-k).

## 2-AET

El reactivo conocido como bromuro de 2-aminoetilisotiourea, es utilizado en casos muy especiales tales como la preparación *artificial* de células Ko, para reconocer antígenos o anticuerpos asociados con el sistema Kell, ya que inactiva o desnaturaliza antígenos que son el producto del gen que se encuentra en el locus Kell; si el antígeno no es eliminado por este tratamiento, quiere decir que no es codificado por este gen, tal es el caso de Kx que es producido por el gen XK y no por el gen Kell.<sup>10</sup>

Después de enfrentar este reactivo a los eritrocitos, estos se comportan como los eritrocitos de los pacientes que padecen de Hemoglobinuria paroxística nocturna, que fijan componentes del complemento inespecíficamente, por lo que se recomienda usar reactivo de coombs monoespecífico IgG, cuando se lleven a cabo pruebas de compatibilidad o identificación de anticuerpos hasta la fase de Coombs, para evitar reacciones falsas positivas. Este compuesto químico inactiva como ya se mencionó anteriormente, los antígenos del sistema Kell (excepto Kx), Yt<sup>a</sup>, Hy, Kn<sup>a</sup>, Lu<sup>b</sup> y Yk<sup>a</sup>, pero potencia la reacción del anti Gerbich (reacciona fuertemente este anticuerpo con las células tratadas con el 2-AET). En los laboratorios de investigación se utiliza para identificar y caracterizar nuevos antígenos del sistema Kell.

Estas son algunas de las herramientas, accesibles, de fácil preparación, que no requieren equipos sofisticados, que nos permiten todavía en esta era de avances tecnológicos sentir que los Laboratorios de Inmunohematología y los profesionales que ahí laboran, tenemos mucho que aportar en la resolución de casos complicados con el fin de ayudar a salvar vidas humanas.

## Referencias

1. Initial detection and identification of alloantibodies to red cell antigens. In: Combs MR, Drew MJ, Goodnough LT, Brecher ME, editors. Technical Manual 14<sup>th</sup> ed. AABB; 2003.
2. **Lingenfelter B, Gibbs FG, Sosler SD.** Detection and identification of antibodies. In: Harmening DM, editor. Modern blood banking and transfusion practices. 4<sup>th</sup> ed. F.A. Davis Company.
3. **Reid ME.** Autoagglutination dispersal utilizing sulphhydryl compounds. Transfusion 1978;18:353-355.
4. **Olson PR, Weiblen BJ, O'Leary JJ, Moscovitz AJ, McCullough JA.** Simple technique for inactivation of IgM antibodies using DTT. Vox Sang 1976;30:149-159.
5. **Wyatt D.** Other blood group systems. In: Quinley ED, editor. 2<sup>nd</sup> ed. Immunohematology. Lippincott.
6. **Bergeron D, Adams SM.** Autoimmune hemolytic anemias and drug-induced hemolytic anemias. In: Quinley ED, editor. 2<sup>nd</sup> ed. Immunohematology. Lippincott.
7. Principles of serological methods In: Issitt PD, Anstee DJ. editors. 4<sup>th</sup> ed. Applied blood group serology. Montgomery Scientific Publications.
8. **Judd WJ.** A handbook of serologic techniques for use in investigative immunohematology. West Chester. Biological Corporation of America.
9. **Branch DR, Petz LD.** A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. Amer J Clin Path. 1982;178:161-167.
10. **Advani H, Szamor J, Judd WJ, Johnson CL, Marah WL.** Inactivation of Kell blood group antigens by 2-aminoethylisothiuronium bromide. Br J Haematol 1982;51:107-115.

## III. La prueba cruzada incompatible y su correlación clínica

José Luis Alcaraz-López

La Norma Oficial Mexicana<sup>1</sup> vigente para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos define:

- a) Pruebas de Compatibilidad: Estudios practicados in vitro empleando muestras de sangre del donante y del receptor, para comprobar la existencia de afinidad recíproca entre las células de uno y el suero del otro, para efectos transfusionales.
- b) Los bancos de sangre y los servicios de transfusión deberán realizar las pruebas de compatibilidad sanguínea antes de cada transfusión alogénica.
- c) Las pruebas cruzadas de compatibilidad sanguínea, 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 donante (prueba mayor); asimismo, es recomendable demostrar la ausencia de anticuerpos irregulares de importancia clínica en el suero del donante, contra los eritrocitos del receptor (prueba menor)... rutinariamente se empleará la prueba de antiglobulina humana (prueba de Coombs), pudiéndose omitir cuando se tenga certeza que el receptor y el donante carezcan de antecedentes propiciadores de aloinmunización. Las pruebas cruzadas deberán incluir un control que permita detectar la presencia de autoanticuerpos. A manera de control del procedimiento y del reactivo, en cada prueba de Coombs

interpretada como negativa, es recomendable agregar células sensibilizadas con inmunoglobulina G...

Al realizar los estudios pretransfusionales de productos sanguíneos podemos encontrarnos con aglutinaciones inesperadas que nos llevan a tomar la decisión de buscar nuevas unidades sanguíneas que sean compatibles o decidimos transfundir ese producto en base al conocimiento científico del comportamiento de los antígenos y anticuerpos involucrados y por la historia transfusional que nos proporciona el médico solicitante. (Cuadro I).

**Cuadro I. Prueba pretransfusional (prueba cruzada):**

	Auto testigo	Prueba menor	Prueba mayor
Eritrocitos Paciente	XX	XX	
Suero Paciente	XX		XX
Eritrocitos Donador			XX
Plasma Donador		XX	

Algunas de estas pruebas pueden ser incompatibles y se deben de buscar las causas analizando las siguientes áreas:

Buscar Error en la tipificación ABO y Rho(D) del donador, del paciente o de ambos.

## Historia clínica

Es importante conocer si el paciente fue transfundido previamente, el tipo de producto transfundido, el número aproximado de transfusiones, la fecha de la última transfusión de eritrocitos, documentar si se ha presentado algún tipo de reacción transfusional señalando cuándo ocurrió, signos y síntomas presentados, los estudios realizados y resultados encontrados.

**Pacientes sin estímulos:** tienen anticuerpos Naturales regulares del sistema ABO: Anti-A, Anti-B, Anti-AB. Inmunoglobulinas clase IgM de amplio rango térmico y generalmente hemolíticas en la Población Mexicana, las reacciones transfusionales por estos anticuerpos son las más peligrosas.

Anticuerpos naturales irregulares, inmunoglobulinas clase IgM, activas a temperaturas de 22° C o menores, que no están relacionadas generalmente con reacción transfusional; se detectan las aglutinaciones al realizar las lecturas a temperatura del laboratorio y desaparecen cuando se realiza la observación de la muestra incubada a 37° C. Los anticuerpos más frecuentes son: Anti-A1, Anti-H, Anti-I, Anti-i, Anti-P1, Anti-M, Anti-N, Anti-Lea, Anti-Leb y en ocasiones la mezcla de algunos de ellos.

**Pacientes con estímulos:** Son los pacientes que se han enfrentado a eritrocitos extraños por transfusiones y mujeres con embarazos previos. En estos existe la posibilidad de encontrar aloanticuerpos como respuesta a estímulos por antígenos desconocidos.<sup>2</sup> Estos pacientes tienen los anticuerpos naturales regulares y la posibilidad de los anticuerpos irregulares mencionados previamente.

**Historia Gineco obstétrica:** En mujeres se debe informar el número de gestas, partos, abortos, cesáreas, hijos con enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), número de hijos afectados, la causa, el tratamiento recibido del recién nacido, fecha del último parto y del último hijo con EHRN.

## Diagnóstico del paciente

Tiene gran importancia este dato pues de él podemos inferir la posibilidad de alo o de autoanticuerpos. En nuestra experiencia hemos encontrado que los pacientes con diferentes diagnósticos y tratamientos, presentan diferentes frecuencias de anticuerpos:<sup>3</sup>

Cirrosis hepática politransfundidos, son los que con mayor frecuencia presentan alo anticuerpos y mezclas de varios de ellos.

Insuficiencia renal crónica, sigue en frecuencia, con el agravante de que las muestras sanguíneas son difíciles de coagular quedando restos de fibrina en el suero que pueden volver negativa la prueba cruzada aún con pre-

sencia de anticuerpos, los restos de fibrina neutralizan el suero de Coombs.

**Diabetes mellitus** con altos índices de glucosa sanguínea puede disminuir el pH del suero en estudio, no permitiendo la unión antígeno-anticuerpo volviendo negativa la prueba cruzada en presencia de anticuerpos débiles o de baja concentración en el suero del paciente.

Pacientes accidentados con maceración de tejidos y fracturas expuestas, pueden presentar problemas en la identificación del grupo sanguíneo AB0 y Rho(D) si los eritrocitos no son lavados suficientemente antes de realizar estas pruebas. Así mismo la prueba cruzada puede ser Positiva aún en pacientes sin estímulos previos y en la investigación de anticuerpos antieritrocitos aparece una panaglutinación con las células de diferentes fenotipos empleadas.

En muestras de Recién Nacidos es necesario lavar varias veces los eritrocitos, de preferencia con solución salina isotónica calentada a 37° C para eliminar la proteína de Warton, de lo contrario se observarán aglutinaciones inespecíficas.

En muestras sanguíneas de pacientes con Cáncer de Colon sin estímulos transfusionales previos, los eritrocitos pueden presentar un Coombs directo Positivo. Los antígenos sanguíneos del grupo ABO y Rho(D) pueden irse perdiendo paulatinamente hasta parecer 0 Negativos; este problema lo tenemos documentado en tres de nuestros pacientes.

En síndrome de inmunodeficiencia adquirida<sup>4,5</sup> se presenta con cierta frecuencia aglutinaciones inespecíficas por los complejos inmunes relacionados a la enfermedad, en ocasiones con coombs directo positivo en pacientes nunca transfundidos y con resultados negativos en el despegado de anticuerpos de los eritrocitos.

En lupus, enfermedades de la colágena y en tratamiento con alfa metil doppa, los pacientes pueden desarrollar una anemia hemolítica autoinmune mediada por autoanticuerpos generalmente de especificidad contra el Sistema Rh/Hr en estos pacientes tanto la prueba mayor, menor y autotestigo son positivos con la técnica de antiglobulina humana, lo mismo que en todas las células de panel, excepto las células Null. Algunas veces pueden producirse anticuerpos calientes contra el Sistema II en pacientes infectados con neumococo, mononucleosis infecciosa y rara vez anticuerpos contra el MNSsU u otros sistemas eritrocíticos.<sup>6</sup>

En los pacientes de Mieloma Múltiple y otros padecimientos con producción de Proteínas Anormales, pueden encontrarse las pruebas cruzadas incompatibles en técnicas rápidas y a 37° C. En estos casos es recomendable seguir los estudios hasta la prueba de antiglobulina humana incrementando los lavados previos hasta 4 o 5 veces para eliminar esas proteínas, además de que no se recomienda en estos casos realizar las pruebas de

compatibilidad con albúmina polimerizada porque se incrementa la aglutinación en donde no están interviniendo anticuerpos anti-eritrocitos sino proteínas extrañas.

En tratamiento con antibióticos y otros medicamentos pueden producirse anticuerpos anti-droga pudiendo aparecer un Coombs directo positivo en los eritrocitos del paciente o ser incompatible la prueba mayor cuando hay anticuerpos libres en suero, dependiendo del tipo de mecanismo: Tipo penicilina, cefalosporina o quinidina; existiendo actualmente relacionada una lista muy grande de drogas que pueden causar estos problemas.<sup>6</sup> En estos pacientes con múltiples transfusiones pueden producir aloanticuerpos enmascarados dentro de los autoanticuerpos generando así un doble problema para lo que es necesario separar las dos entidades con auto adsorciones, elusiones y titulación de los anticuerpos con sangres de diferentes fenotipos característicos de la etnia del paciente.<sup>7,8</sup>

En el trasplante de médula ósea, después de que se implantan las células del donador, el fenotipo eritrocitario del paciente irá cambiando progresivamente, apareciendo los antígenos desconocidos para él. Estos cambios los podemos observar en la sangre del paciente cuando existe Incompatibilidad Mayor o Menor por AB0, en el Rho(D) cuando el binomio es Positivo/Negativo y en todos los demás fenotipos en donde existan diferencias, lo cual nos obliga a tomar la decisión de transfundir los productos sanguíneos idóneos para el momento de la evolución del trasplante. En alguna de esas etapas podemos encontrar el Coombs directo positivo, observar hemólisis en el suero del paciente o incluso observar la aparición de nuevos anticuerpos anti eritrocitos o la desaparición de los ya existentes. Nos obliga a hacer cuenta diferencial de eritrocitos del paciente y de la médula ósea implantada, complicándose más en la etapa en que el paciente recibe transfusiones de eritrocitos.

La Historia Transfusional en pacientes con una reacción a eritrocitos transfundidos o la presencia de aloanticuerpos en un paciente con transfusión en los últimos tres meses nos obliga a realizar estudios como: Coombs directo con diluciones, Coombs específico, Elusión de anticuerpos de los eritrocitos recientemente transfundidos, Titulación de Anticuerpos, Fenotipos diferenciales de la superficie y fondo del hematocrito para demostrar la presencia de doble población celular y estudiar el fenotipo del paciente para corroborar la especificidad de los anticuerpos encontrados y para dar sangre compatible por fenotipo en transfusiones subsecuentes.

En la prueba cruzada cuando el auto testigo es positivo nos obliga a realizar un Coombs directo con diluciones y

de ser posible un Coombs específico. Dependiendo de la Historia transfusional debemos demostrar si lo encontrado es un autoanticuerpo o un aloanticuerpo.

Cuando la Prueba Menor, la Prueba Mayor o ambas son incompatibles nos obliga a ratificar inicialmente los Grupos Sanguíneos ABO y Rho(D), posteriormente demostrar la presencia y especificidad de anticuerpos irregulares en el plasma del donador si la prueba menor fue incompatible; o en suero del Receptor si la prueba mayor fue la incompatible.

En los casos en que el Autotestigo, Prueba Mayor y Prueba Menor son incompatibles a 37° C o con técnica de Coombs, es necesario primero verificar que los eritrocitos del paciente no se hayan confundido, recomendando ratificar el nombre completo del paciente, tomar nueva muestra de la sangre anticoagulada, para verificar Grupo AB0, Rho(D) lo mismo que del donante; si los resultados fueren los mismos, entonces será necesario seguir el protocolo de una Reacción Transfusional Reciente, el de una Anemia Hemolítica Autoinmune o una combinación de ambas para demostrar la presencia de auto y aloanticuerpos.

Con lo antes mencionado, la prueba cruzada es una pequeña ventana por donde vemos el paisaje reducido de los anticuerpos presentes en los pacientes en estudio y la investigación de anticuerpos libres en el suero, los despegados de los eritrocitos, las titulaciones, el Coombs directo, la adsorción, las cuentas diferenciales, los fenotipos eritrocitarios en pacientes con transfusiones lejanas, los fenotipos diferenciales en los recientemente transfundidos nos muestra un panorama amplio de los Antígenos y Anticuerpos que puede tener el sujeto en estudio.

## Referencias

1. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993. Para la disposición de sangre humana con fines terapéuticos. Diario Oficial de la Federación, 18 de julio de 1994.
2. Contreras M. Audit in transfusión medicine. Jornadas Científicas. 35 Aniversario del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional SXXI IMSS. 1997. p. 8-14.
3. Quintanar-García E. Uso del panel de eritrocitos de fenotipo conocido, experiencia nacional. Jornadas científicas. 35 Aniversario del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional SXXI IMSS;1997. p. 25-48.
4. Van Der Lelie J, Lange JMA, Vos JJE. Autoimmunity against blood cells in human immunodeficiency-virus (HIV) infection. Br J Haematol 1987;67:109-114.
5. Solinger A, Hess E. Induction of autoantibodies by human immunodeficiency virus infection and their significance. Rheum Dis Clin North Amer 1991;17:157-175.
6. Dacie J. The auto-immune haemolytic anaemias. In: The haemolytic anaemias. Vol. 3. Churchill Livingstone.
7. Leger R, Garratty G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. Transfusion 1999;3:11-16.
8. Branch D, Petz LD. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. Transfusion 1999;39:6-10.

## IV. Control de calidad en técnicas de detección de anticuerpos antieritrocitos

Julio César Martínez-Álvarez

Numerosos antígenos de grupos sanguíneos diferentes al sistema ABO y Rh-Hr son ignorados en el acto transfusional, debido a que muy pocas personas poseen anticuerpos dirigidos contra alguno de ellos.<sup>1</sup> Estos anticuerpos eritrocitarios se pueden detectar e identificar por diferentes técnicas. Existen factores que se deben de controlar y que afectan la reacción entre el anticuerpo y el antígeno; los factores pueden estar asociados con el antígeno, con el anticuerpo y con las condiciones de la reacción. Los relacionados con el antígeno incluyen el número de sitios antigénicos, las interacciones génicas, la dosis, el sitio que ocupa el antígeno sobre la superficie eritrocitaria, la edad de las células y las condiciones de almacenaje de estas. Los relacionados con el anticuerpo: Capacidad para fijar complemento, la influencia que sobre la reacción tienen el uso de suero o plasma, el fenómeno de *rouleaux* y la contaminación bacteriana. Las condiciones de la reacción incluyen el pH, relación entre la concentración de antígeno y anticuerpo, temperatura, tiempo de incubación, centrifugación, fuerza iónica y por último, el tipo de medio: Salino, albuminoso, enzimático o el reactivo antiglobulínico.<sup>2</sup>

**Antígeno.** Son macromoléculas que desencadenan una respuesta inmune. La mayoría de ellos son proteínas y polisacáridos, lípidos y hasta ácidos nucleicos que pueden tener propiedades antigénicas. Tiene regiones denominadas determinantes antigénicos o epítomos que interactúan directamente con anticuerpos de especificidad única. Otras moléculas potencialmente antigénicas son los haptenos, que sólo son inmunogénicos cuando están unidos a una proteína acarreadora.<sup>3</sup>

**Antígenos eritrocitarios.** Los antígenos de grupos sanguíneos están presentes en la membrana de los eritrocitos, pudiendo ser glucolípidos, proteínas, glucoproteínas y sialoproteínas.

**Anticuerpos.** Los anticuerpos eritrocitarios están constituidos por inmunoglobulinas, que son proteínas plasmáticas, producidas por el tejido linfoide en respuesta a la presencia de un antígeno extraño. Se han reconocido cinco clases de inmunoglobulinas en base a sus características antigénicas observadas en las cadenas pesadas: IgG (gamma), IgM (m $\mu$ ), IgA (alfa), IgD (delta) e IgE (épsilon). Son de importancia en reacciones transfusionales la IgG e IgM y muy rara vez IgA.

**IgG:** constituye el 75% del total de las inmunoglobulinas del plasma normal. Se han identificado cuatro subclases de IgG, poseen en forma exclusiva la capacidad de atravesar la barrera hemato-placentaria y proveer defensa en las primeras semanas de vida. Pueden fijar complemento, siendo su orden de eficacia: IgG3 > IgG1 > IgG2. La subclase IgG4 no fija complemento por la vía clásica, pero puede hacerlo por la vía alterna.

**IgM:** Constituye entre el 5 al 10% de las inmunoglobulinas en el plasma normal, se presentan en forma de pentámeros, tienen un peso molecular de 900 000 d, lo cual hace imposible que atraviese la barrera hemato-placentaria. Son aglutininas muy potentes y algunas activan complemento eficazmente. Es el anticuerpo producido en la primera etapa de una respuesta primaria.

**IgA:** Comprende el 20% de las inmunoglobulinas del plasma, es una inmunoglobulina de secreciones, en el plasma se encuentra en forma de monómeros y en secreciones en forma de dímeros. En el humano se han descrito dos subunidades antigénicamente distintas: IgA1 e IgA2.

### *Reacción transfusional*

Los sistemas eritrocitarios implicados con mayor frecuencia son ABO, Rh/Hr, Si, Duffy, Kell, Kidd, Diego.<sup>4</sup>

### **Detección de anticuerpos antieritrocitos**

No hay ninguna técnica capaz de detectar todos los anticuerpos, no obstante que existen muchos métodos que detectan la mayoría de los anticuerpos. La selección debe basarse en una cuidadosa evaluación de la sensibilidad y especificidad de los diferentes métodos disponibles, teniendo en cuenta las limitaciones de las técnicas y reactivos empleados.<sup>5</sup>

### **Salina**

Técnica de gran utilidad para detectar anticuerpos tipo IgM: Anti-A, Anti-B, Anti-H, Anti-I, Anti-Lea, Anti-Leb, Anti-E, Anti-M, Anti-S, Anti-P1, Anti-Lua, Anti-N.

Salina-Coombs: Detecta hasta el 98% de los anticuerpos importantes en reacciones transfusionales.

#### *Procedimiento*

1. Lavar los eritrocitos en estudio 3 veces con solución salina isotónica estéril (pH 6.8-7.3) y preparar una solución final al 3-5%, rotular tubos de 10X75 mm, según el panel a emplear y autotestigo, colocar 2 a 3 gotas de suero en estudio más una gota de eritrocitos correspondiente, mezclar, centrifugar y observar la presencia de hemólisis o aglutinación, y anotar los resultados (Salina Rápida).
2. Incubar a 22°C durante 30 minutos, centrifugar y observar la presencia de hemólisis o aglutinación, y anotar los resultados (Salina a 22°C).
3. Incubar a 37°C durante 45 a 90 minutos, centrifugar y observar la presencia de hemólisis o aglutinación, y anotar los resultados (Salina a 37°C).
4. Lavar tres veces con solución salina isotónica estéril, decantar a sequedad.
5. Agregar 2 gotas del suero de Coombs, centrifugar y observar la presencia de aglutinación, y anotar los resultados (Salina Coombs).
6. Realizar Consumo de Antiglobulina Humana (CAGH) para control de la prueba.

Interpretación: La aglutinación o hemólisis constituye una prueba positiva.

#### *Factores a controlar*

1. Correcta suspensión de eritrocitos al 3-5 % en solución salina isotónica estéril.
2. Correcta centrifugación (velocidad y tiempo de centrifugación).
3. Control de la temperatura y tiempo de incubación.
4. Control de calidad al suero de Coombs, una adecuada estandarización en la interpretación en la observación de aglutinación o hemólisis.
5. Limpieza en el material utilizado.

#### **Albúmina**

Es un medio coloidal para potenciar la reacción de un gran número de anticuerpos de la clase IgG. Se ha demostrado que actúa aumentando la constante dieléctrica del medio de reacción, ocasionando una reducción en el potencial Z. A mayor grado de polimerización, la reacción antígeno anticuerpo es más evidente tanto en aglutinación directa como por antiglobulina. Ventajas: detecta muy bien anticuerpos del sistema Rh/Hr y Kell. Sus esventajas consisten en que hace muy evidentes a los anticuerpos fríos, provocando confusión a las personas que no tengan mucha experien-

cia en esta técnica, e incluso los puede hacer evidentes a 37°C. No es buena en padecimientos como el Mieloma Múltiple y otras enfermedades con hiperproteíнемia.

#### *Procedimiento*

1. Seguir los pasos 1, 2 y 3 de la técnica salina, agregar 2 gotas de albúmina al 22%, 30%, centrifugar 90 segundos y observar la presencia de hemólisis o aglutinación. Y anotar los resultados (Albúmina Rápida).
3. Incubar a 37°C durante 45 a 90 minutos, centrifugar y observar la presencia de hemólisis o aglutinación. Y anotar los resultados (Albúmina a 37°C).
4. Lavar cuatro veces con solución salina isotónica estéril, decantar a sequedad.
5. Agregar 2 gotas del suero de Coombs, centrifugar y observar la presencia aglutinación. Y anotar los resultados (Albúmina Coombs).
6. Realizar Consumo de Antiglobulina Humana (CAGH) para control de la prueba.

Interpretación: La aglutinación o hemólisis constituye una prueba positiva.

#### *Factores a controlar*

1. Los mismos realizados en la técnica salina.
2. Control de la albúmina: concentración, caducidad, aspecto físico, contaminación bacteriana.

#### **Enzimas**

Las enzimas de mayor uso son: Bromelina, Ficina, Papaína y Tripsina.

Alteran la membrana del eritrocito removiendo péptidos que contienen ácido siálico. La liberación del ácido siálico conduce a la pérdida de cargas eléctricas negativas del eritrocito y con ello la disminución del potencial Z.

Potencia la reactividad de algunos sistemas como el sistema Rh-Hr y Kidd, y destruye la estructura antigénica de los grupos M, N, S, Fya y Fyb, provocando que no haya reconocimiento del anticuerpo. Los anticuerpos: anti-I, anti-Lewis, anti-P1, anti-A y anti-B reaccionan bien con los eritrocitos tratados con enzimas.

#### *Procedimiento*

##### *Una fase*

1. Agregar 2 gotas de suero más una gota de eritrocitos al 3-5%, más 2 gotas de la enzima en solución

(bromelina o papaína). Mezclar e incubar 10 minutos a 22°C, centrifugar y leer (enzima a 22°C).

2. En tubos diferentes realizar los mismos pasos e incubar a 37°C por 15 minutos, centrifugar y leer (enzima a 37°C). Lavar las células 3 veces y realizar la prueba de la globulina antihumana.

#### *Dos fases*

1. Colocar 2 gotas de enzima más una gota de eritrocitos al 3-5% en estudio, mezclar, incubar a 37°C por 5 a 10 minutos, lavar 3 veces y agregar el suero en estudio. Incubar 10 minutos a 22°C, incubar 15 minutos a 37°C.
2. Lavar 3 veces y realizar la prueba de la globulina antihumana.

Interpretación: La aglutinación constituye una prueba positiva.

#### *Factores a controlar*

1. Los mismos empleados en la técnica salina, y además
2. Controlar la concentración enzimática, el pH de la solución (según la enzima empleada), la hemólisis espontánea de los eritrocitos tratados. Controlar el tiempo de exposición de los eritrocitos al tratamiento enzimático: al someter a sobrecalentamiento las células con enzimas, puede conducir a una reducción drástica del potencial Z, hasta un punto donde las células pueden autoaglutinarse espontáneamente en ausencia de anticuerpos (falsos positivos).

Técnica de Liss (Solución de Baja Fuerza Iónica). Incrementa la rapidez de asociación del antígeno con su respectivo anticuerpo. El empleo de este medio de reacción es valioso para detectar anticuerpos con constantes de equilibrio relativamente bajas.

#### *Procedimiento*

1. Poner 2 gotas de LISS en un tubo, agregar una gota de eritrocitos (del donador o del receptor) en suspensión al 3-5 % en solución salina isotónica estéril.
2. Mezclar y centrifugar un minuto, decantar el sobrenadante y resuspender los eritrocitos en 2 gotas de solución de LISS y agregar 2 gotas del suero problema. Incubar 15 minutos a 37°C.
3. Lavar 3 veces las células. Agregar 2 gotas del suero de Coombs.

4. Centrifugar y observar la presencia de aglutinación. Anotar los resultados. Realizar Consumo de Antiglobulina Humana (CAGH) para control de la prueba.

Interpretación: La aglutinación constituye una prueba positiva.

#### *Factores a controlar*

1. Los mismos descritos en la técnica salina, y además
2. Correcta suspensión de eritrocitos al 3-5 % en solución de LISS.
3. Control de la solución de LISS: concentración, pH, aspecto físico, contaminación bacteriana.

#### **Elusión**

Eluir significa despegar los anticuerpos unidos a eritrocitos sensibilizados (opsonizados). Esta técnica es de gran utilidad para el estudio de la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) y reacción transfusional asociada a aloanticuerpos (hasta 120 días posterior a la transfusión). Existen varios métodos de elución: Calor, Frío en medio ácido, Cloroformo, Xileno, Congelación-descongelación, Cloruro de metileno, Éter, Tricloro etileno más cloroformo.

#### *Procedimiento*

Lavar 5 veces un volumen de eritrocitos (no mayor a 0.7 ml) en un tubo de 13X100 mm, con solución salina isotónica estéril a 4°C.

Seguir posteriormente la técnica elegida.

#### **Adsorción**

Es el proceso de fijar un anticuerpo a su antígeno específico en la superficie del eritrocito. Los autoanticuerpos calientes pueden enmascarar la presencia concomitante de aloanticuerpos en un suero. La adsorción del suero con eritrocitos autólogos puede eliminar los autoanticuerpos.

#### *Procedimiento*

1. Lavar 4 veces 2 ml de eritrocitos con solución salina y desechar el último sobrenadante, añadir un volumen igual de albúmina al 6% a los eritrocitos concentrados. Mezclar e incubar a 56°C durante 3-5 minutos, agitando constantemente la mezcla suavemente.

2. Centrifugar por 2 minutos, y recoger el sobrenadante. Este puede utilizarse como eluido (en el caso de haber pocos eritrocitos del paciente).
3. Lavar los eritrocitos 3 veces con solución salina y desechar el último sobrenadante, añadir 1 ml de papaína al 1% o ficina al 1% a los eritrocitos concentrados. Mezclar e incubar a 37°C durante 15 minutos.
4. Lavar los eritrocitos 3 veces con solución salina. Centrifugar el último lavado por 5 minutos. Eliminar por aspirado el máximo sobrenadante posible, fraccionar los eritrocitos en dos alícuotas iguales, añadir a una alícuota 2 ml de suero del paciente. Mezclar e incubar a 37°C durante 30 minutos.
6. Centrifugar por 2 minutos y transferir el suero a la segunda alícuota de eritrocitos. Mezclar e incubar a 37°C durante 30 minutos, centrifugar 2 minutos y recoger el suero adsorbido, y analizar la actividad del anticuerpo del suero adsorbido utilizando técnica de Coombs.<sup>6,7</sup>

Para separar mezclas de aloanticuerpos se pueden hacer adsorciones sobre eritrocitos de diferentes fenotipos: R1R1, R2R2, rr, etc.

#### Factores a controlar

Recuperar el 100% de los eritrocitos manejados, períodos de incubación a 37° y 22°, escoger los fenotipos adecuados en la mezcla de anticuerpos.

Columnas de Gel.<sup>8</sup> Es una técnica relativamente nueva, que presenta ciertas ventajas y desventajas comparadas con las técnicas tradicionales empleadas en la detección de anticuerpos eritrocitarios. En el mercado existen dos tipos de columnas:

1. *Por gradiente de peso.* Se basa en la sensibilización de eritrocitos por anticuerpos que se aglutinan por acción de la IgG antihumana del suero de Coombs y que, no pasan por la barrera del gel, formándose así, una banda de eritrocitos en la parte superior, interpretándose la prueba como positiva; cuando los eritrocitos quedan en el fondo de la columna, la prueba será negativa. Estas columnas pueden modificarse para determinación de grupos sanguíneos ABO y Rh-Hr, agregar enzimas, o cargarlas con suero de Coombs poliespecífico.
2. *Por intercambio de cargas.* El gel está formado por proteínas de *Staphylococcus aureus* y de *Streptococcus* grupo G obtenidas por ADN recombinante. Las dos

proteínas se fijan especialmente a la porción Fc de la molécula de IgG unida al eritrocito opsonizado *in vitro* o *in vivo*, dando en ese caso bandas positivas en la parte superior del gel y la prueba será negativa cuando los eritrocitos van al fondo de la columna.

#### Ventajas

- Puede ser una gran herramienta de documentación, por conservarse por bastante tiempo.
- Rapidez.
- Es una técnica limpia que evita riesgos de contaminación o accidentes por rupturas.
- Se emplea una menor cantidad de reactivos.
- Gran sensibilidad para la detección de anticuerpos clase IgG.
- Detecta anticuerpos débiles (por ejemplo anti-S)
- Ocupan poco espacio y se pueden emplear en combinación con técnicas tradicionales.
- Se pueden fotocopiar y archivar.

#### Desventajas

- No detectan anticuerpos del tipo IgM.
- No detectan el complemento pegado en los eritrocitos.
- Se debe contar con todo el equipo necesario para su manejo: centrífugas especiales, lectores, equipo adicional, etc.
- Su costo.
- En caso de fallas en el suministro eléctrico, se deberá terminar el trabajo de forma manual.

#### Referencias

1. **Issitt PD.** Applied blood group serology. Miami, FL, USA: Montgomery Scientific Publications; 1989.
2. **Beattie K.** Detection and identification of alloantibodies. In: Mallory D, editor. Immunohematology methods and procedures. Rockville: American National Red Cross; 1993;III-1-III-9.
3. **Moreno Rodríguez J.** Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. México: Noriega Editores; 1996.
4. **Linares GJ.** Principios de inmunología. En: Inmunohematología y transfusión. Venezuela; 1986.
5. **Madoz P.** Detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. En: Libro de ponencias y comunicaciones. VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Diputación provincial. España 1996.
6. **Vengelen-Tyler V,** ed. Technical manual. 13th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 1999.
7. **Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M.** ed. Blood transfusion in clinical medicine. 10<sup>th</sup> ed. London: Blackwell Scientific Publications; 1997.
8. **Radillo A.** Control de calidad en los bancos de sangre. México: En: Medicina transfusional. Prado; 1999.

# V. Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes

Jesús Linares

El sistema inmune en el humano está regulado de tal manera que bajo condiciones normales puede reconocer antígenos extraños al organismo y sintetizar anticuerpos contra ellos, estableciendo de esta forma un mecanismo que le permite defenderse contra agentes patógenos.

Al mismo tiempo, parece estar programado para no reconocer sus antígenos autóctonos, a través de un mecanismo de autotolerancia. Esta propiedad es conocida como Tolerancia Inmunológica de lo propio. Dicho balance es mantenido a través de un complejo y multifactorial mecanismo, que ocasionalmente y por razones todavía no bien entendidas, puede ser alterado, entrando en un mal funcionamiento que conduce a un proceso de autoinmunidad, formando autoanticuerpos que ocasionan daño y destrucción prematura de sus propias células. Algunos piensan que en la etiología de las enfermedades autoinmunes no existen mecanismos especiales, células, tipos de anticuerpos o reacciones específicas responsables. En su lugar, la patogénesis envuelve el inapropiado o alterado mecanismo de control de la inmunidad.

Burnett en 1959 y posteriormente Nossal (1980) y Pike (1982), postularon que la tolerancia inmunológica se adquiere mediante el contacto de los propios antígenos durante la vida embrionaria. Se ha encontrado evidencia que durante la ontogénesis, una variedad de linfocitos T/B inmaduros pueden ser eliminados en el timo y en la médula ósea (supresión clonal) o también pueden ser funcionalmente inactivados (anergia clonal). La presencia de autoanticuerpos sugeriría entonces que clones de estos linfocitos bajo ciertas condiciones escapan de los mecanismos de regulación o de tolerancia y se hacen autoreactivos. Aún cuando la causa desencadenante no esta claramente definida se ha descubierto que existen factores contribuyentes, entre los que se citan: La existencia de predisposición genética, disminución de linfocitos T o alteración de la función supresora, alteración de la estructura antigénica de las células y estimulación por bacterias o virus.<sup>1,2</sup>

**Definición.** La anemia hemolítica autoinmune (AHAI) se caracteriza por: 1) el acortamiento de la sobre vida in vivo de los glóbulos rojos y 2): la presencia de anticuerpos reactivos contra las propias células rojas.. El mecanismo hemolítico en las AHAi sigue dos vías: a) destrucción

intravascular mediada por complemento, rara en adultos pero frecuente en niños (hasta un 20%). Para inducir a lisis intravascular, el anticuerpo debe ser capaz de activar toda la cascada del complemento de manera eficiente hasta llegar a hemólisis; b) destrucción extravascular, mediada por macrófagos (dentro del sistema retículo endotelial), es la forma más frecuente y generalmente está asociada a autoanticuerpos de la clase IgG.<sup>3,4</sup>

## Clasificación

La anemia hemolítica puede ser clasificada en dos formas que se complementan.. La mayoría de los casos (80-90 % en adultos) la destrucción de las células rojas es mediada por autoanticuerpos que exhiben su óptima reactividad a 37°C (anticuerpos calientes). Una pequeña proporción se atribuye a la presencia de autoanticuerpos que muestran mayor afinidad por los eritrocitos a temperatura por debajo de 37°C (anticuerpos fríos). Esta distinción es importante no solo por las diferencias en la fisiopatología del cuadro de destrucción eritrocitaria, sino también por el tratamiento a seguir. Queda todavía un escaso grupo de pacientes con AHAi, causada por autoanticuerpos que pueden exhibir ambas actividades. (mezcla de anticuerpos calientes y fríos), los cuales aparentemente reconocen diferentes antígenos de la membrana eritrocitaria, señalándose que el cuadro hemolítico en estos casos es más severo. Se ha mencionado que otros mecanismos independientes del complemento o de la fagocitosis por macrófagos pueden estar envueltos en la destrucción celular, como es por ejemplo la destrucción por células asesinas (NK cells), sin embargo, tal mecanismo no esta demostrado.

Desde el punto de vista clínico, también es útil clasificar la AHAi basada en la presencia o ausencia de una enfermedad subyacente. Si no hay evidencia de enfermedad agregada al momento del diagnóstico, se denomina primaria o idiopática, (50% de los casos aproximadamente), pero cuando parece ser la manifestación o complicación de un proceso subyacente, se clasifica como secundaria. Generalmente esta asociada con enfermedades autoinmunes, procesos malignos, infecciosos o ingestión de drogas.

## Diagnóstico

La historia clínica recoge la sintomatología de la AHAI, la cual esta asociada con el cuadro de anemia y/o de la enfermedad subyacente. El perfil usual de laboratorio incluye: anemia, reticulocitosis y prueba de antiglobulina humana positiva. La morfología de sangre periférica muestra policromasia y esferocitosis. Hay aumento de la bilirrubina indirecta, del urobilinógeno urinario, de la dehidrogenasa láctica y disminución de la haptoglobina en algunos casos. El diagnóstico serológico de AHAI requiere la demostración de IgG y/o C3 unido a los eritrocitos del paciente, empleando reactivos de AGH poli y monoespecíficos, título de Coombs Directo positivo, identificación del anticuerpo en el eluato de los eritrocitos del paciente, estudio del suero para detectar e identificar auto y/o aloanticuerpos, su actividad hemolítica, rango térmico y temperatura de reacción óptima.

## Tratamiento

Aunque la mayoría de los pacientes no requiere de transfusiones, ésta puede ser necesaria en casos de anemia sintomática. La selección de la sangre para transfusión implica múltiples dificultades en el banco de sangre, pueden-

do presentarse discrepancias en la tipificación ABO/Rh y pruebas cruzadas incompatibles por la presencia de auto y/o aloanticuerpos. Los corticosteroides son la primera línea de tratamiento en los casos de AHAIAC primaria, por su capacidad de disminuir la intensidad de la hemólisis. La esplenectomía esta indicada en los pacientes que requieren de prolongado mantenimiento con altas dosis de corticosteroides. La inmunoglobulina intravenosa puede inducir remisión de la hemólisis por corto plazo. Drogas inmunosupresoras y el Danazol han demostrado ser útiles en casos de refractoriedad del proceso hemolítico. En los casos de AHAIAC secundaria, el tratamiento de la enfermedad subyacente generalmente controla el proceso hemolítico.<sup>5,6</sup>

## Referencias

1. **Garratti G.** Target antigens for red-cell-bound autoantibodies. In: Nance SJ, editors. Clinical and basic aspects of immunehematology. Arlington, VA, USA: AABB; 1991.
2. Autoimmune disease. In: Silberstein LE, editors. Autoimmune disorders of blood. Bethesda, MD, USA: AABB; 1999.
3. **Jefferies LC, Eder AF.** Transfusion therapy in autoimmune hemolytic anemia. In: Mintz PD, editors. Transfusion therapy: clinical principles and practice. Bethesda, MA, USA: AABB Press, 1999.
4. **Garratti G.** Pathophysiology of autoimmune hemolytic anemia. In: The Compendium, AABB; 2001.
5. **Shlomchik MJ.** Mechanisms of immune self-tolerance and how they fail in autoimmune disease. In: Silberstein LE, editors. Autoimmune disorders of blood. Bethesda, MD, USA: AABB; 1996.
6. AABB Technical Manual, ch. 20. 14<sup>th</sup> ed. Bethesda, MD, USA; 2002.

