

Fundamentos de genética e inmunología para bancos de sangre y medicina transfusional

Carlos Alberto Arbeláez García¹

Resumen: Más de 100 años han transcurrido desde el descubrimiento de los grupos sanguíneos A, B y O y hasta el presente se han reconocido 308 antígenos, de los cuales 270 están agrupados en 30 sistemas sanguíneos. Su importancia radica en la seguridad con la cual se transfunde la sangre de donantes a pacientes con pruebas tan sencillas en su elaboración, como la clasificación sanguínea ABO y Rh, las pruebas cruzadas y el rastreo de anticuerpos irregulares, con el fin de evitar la aloinmunización de los receptores. A partir de estas técnicas, inicialmente desarrolladas por el premio Nóbel en Medicina, Karl Lansteiner, en 1930, podemos contar en el presente con las nuevas pruebas de biología molecular que nos permiten el conocimiento del genotipo fetal en mujeres en embarazo que han desarrollado anticuerpos contra los grupos sanguíneos, hacer análisis de grupos sanguíneos en pacientes multitransfundidos, detectar donantes con baja expresión del antígeno D, hacer diagnóstico genético preimplantación y realizar pruebas que permiten la tipificación de donantes para los polimorfismos más importantes desde el punto de vista clínico, entre otros. Esta serie de módulos se inicia en el presente número con las bases genéticas e inmunológicas de los grupos sanguíneos y pretende llevar al lector de forma clara y concisa en un viaje placentero, desde el punto de vista del conocimiento, a disfrutar del estudio de los grupos sanguíneos, sus antígenos y anticuerpos, y la importancia que éstos tienen en la práctica clínica. En módulos posteriores se revisarán la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, las pruebas empleadas para el diagnóstico de las anemias hemolíticas autoinmunes, el diagnóstico e interpretación de las pruebas necesarias para el estudio de las reacciones transfusionales, la realización de las pruebas inmunohematológicas en banco de sangre y su interpretación adecuada a fin de aportar elementos suficientes para el manejo clínico y quirúrgico de los pacientes. Finalmente, se revisará la serología de los leucocitos y las plaquetas, y las pruebas de laboratorio empleadas y su importancia clínica.

Palabras clave: grupos sanguíneos, leucocitos, plaquetas, inmunología, genética, banco de sangre, medicina transfusional.

García-Arbeláez CA. Fundamentos de banco de sangre y medicina transfusional. Medicina & Laboratorio 2009; 15: 37-68.

Módulo 22 (Banco de sangre), número 2. Editora Médica Colombiana S.A., 2009®

Recibido el 19 de enero, 2009; aceptado el 23 de enero, 2009.

¹ Médico especialista en Medicina de Laboratorio. Coordinador Laboratorio Clínico, Instituto Neurológico de Antioquia. Clínica Universitaria Bolivariana. Medellín, Colombia. E-mail: arbelaez_carlos@hotmail.com

El descubrimiento de los grupos sanguíneos en el año 1900 por Karl Landsteiner abrió una nueva era para la transfusión sanguínea, demostrando la presencia en el suero de las isoaglutininas A, B y C, esta última denominada posteriormente O [1, 2]. Al año siguiente, Landsteiner clasificó la sangre humana en tres grupos sanguíneos, de acuerdo a las reacciones serológicas de los eritrocitos con estas isoaglutininas [3]. La publicación inicial de Landsteiner fue en la forma de pie de página en un artículo sobre fermentación bacteriana. Infortunadamente, varios años tuvieron que pasar para que las pruebas fueran introducidas en la práctica diaria. Aparentemente ninguna de las personas del laboratorio de Landsteiner tenía el grupo sanguíneo AB, menos común, pero en 1901 este grupo sanguíneo fue descubierto por los investigadores austriacos von Decastello y Sturli [4]. Hektoen en Chicago fue el primero en proponer el uso de las pruebas de grupo sanguíneo para la selección de donantes y receptores [5], pero fue Ottenberg el primero en hacer la tipificación ABO en pacientes y donantes antes de las transfusiones y también fue el primero en realizar las pruebas de compatibilidad antes de las transfusiones [6].

En el año 1927 Landsteiner y Levine reportaron los grupos sanguíneos M, N y P [7]. Posteriormente en 1939, Levine y Stetson publicaron en menos de dos páginas en la revista *Journal of the American Medical Association* su artículo clásico, un reporte de caso, describiendo la enfermedad hemolítica del recién nacido y el descubrimiento de un grupo sanguíneo que posteriormente se llamó sistema Rh [8].

Karl Landsteiner nació en Viena el 14 de junio de 1868. Estudió medicina en la Universidad de Viena, graduándose en 1891. Posteriormente realizó estudios de bioquímica y anatomía patológica, obteniendo el título de Profesor de Anatomía Patológica en la Universidad de Viena.

A pesar de que Landsteiner hizo numerosas contribuciones en anatomía patológica, histología e inmunología, su nombre siempre será honrado por su descubrimiento de los grupos sanguíneos, motivo por el cual recibió el Premio Nóbel en Medicina en 1930. Landsteiner continuó investigando en grupos sanguíneos, en la química de los antígenos, anticuerpos y otros eventos inmunológicos que ocurren en la sangre.

En 1939 recibió el título de Profesor Emérito del Instituto Rockefeller, trabajando con la misma energía que lo caracterizó. El 24 de junio de 1943, padeció un infarto de miocardio en su laboratorio y murió dos días después en el hospital del instituto en el cual había realizado su distinguido trabajo [9].

En 1908, Moreschi [10] describió la reacción de antiglobulina, pero su aplicación en la detección de los grupos sanguíneos no fue apreciada hasta 1945, cuando Coombs, Mourant y Race publicaron su trabajo en *Lancet* y en *British Journal of Experimental Pathology* en 1945 y 1946, sobre el uso de anticuerpos de conejo contra la IgG para detectar eritrocitos cubiertos con IgG [11]. En pocos años la “prueba de antiglobulina” o “prueba de Coombs” se adoptó virtualmente en todos los laboratorios de hematología y en los servicios de transfusión de sangre de todo el mundo, permaneciendo como la “prueba de oro” hasta la fecha.

La prueba de antiglobulina mejoró la seguridad de la transfusión sanguínea y también llevó al descubrimiento de muchos antígenos y grupos sanguíneos. Adicionalmente, esta prueba es la base de la prueba inmunoabsorbente ligada a enzima o ELISA (en inglés, *enzyme linked immunosorbent assay*) y de muchas otras usadas en microbiología y otras especialidades.

Robert Royston Amos (“Robin”) Coombs nació en 1921 en Londres, se educó en Sudáfrica y Escocia, donde se graduó en Veterinaria. Posteriormente obtuvo su PhD en Cambridge, en donde trabajó toda su vida en el Departamento de Patología. Recibió títulos honorarios de las universidades de Guelph, Netherlands y Edimburgo, y fue nombrado *Fellow* de la *Royal Society* en 1965. Murió en Cambridge el 25 de enero de 2006 a la edad de 85 años [12].

Genética de los grupos sanguíneos

La herencia de características transmisibles o rasgo, incluyendo los antígenos de los grupos sanguíneos, forma la base de la genética. El material genético que determina cada rasgo se encuentra en el núcleo de la célula. Este material nuclear se llama cromatina, la cual está constituida principalmente por ácido desoxirribonucleico (DNA). Cuando la célula se divide, la cromatina pierde su apariencia homogénea y conforma unas organelas en forma de bastones denominadas cromosomas. Cada cromosoma está formado por cadenas de DNA. Dentro del DNA cromosómico están los genes, que poseen la información genética, los cuales están constituidos por secuencias específicas de nucleótidos. Los genes están ubicados en un orden específico a lo largo del cromosoma, ubicados en una posición fija conocida como *locus*, *loci* en plural [13], como se observa en la **figura 1**.

Cromosomas

El número de cromosomas y la morfología de los cromosomas son específicos para cada especie. Las células somáticas humanas tienen 46 cromosomas que existen como 23 pares (la mitad de cada par se hereda de cada padre). Veintidós de los pares son semejantes en hombres y mujeres, denominados autosomas; los cromosomas sexuales, XX en las mujeres y XY en los hombres, son el par restante.

Cada cromosoma consiste en dos brazos unidos en una constricción primaria, llamada centrómero. Los dos brazos poseen diversas longitudes: el brazo corto se llama “p”, y el brazo largo se llama “q”. Los brazos de cromosomas individuales son indicados por el número del cromosoma seguido por una “p” o una “q” (por ejemplo, Xp es el brazo corto del cromosoma X; 12q es el brazo largo del cromosoma 12). Cuando son coloreados, cada cromosoma exhibe un patrón único de bandas, que se enumeran del centrómero hacia afuera. Los cromosomas son identificados por la localización del centrómero y de sus patrones de bandas. La identificación de genes individuales a lo largo del cromosoma se puede trazar físicamente, de acuerdo a la ubicación específica de las bandas [14], como se observa en la **figura 1**.

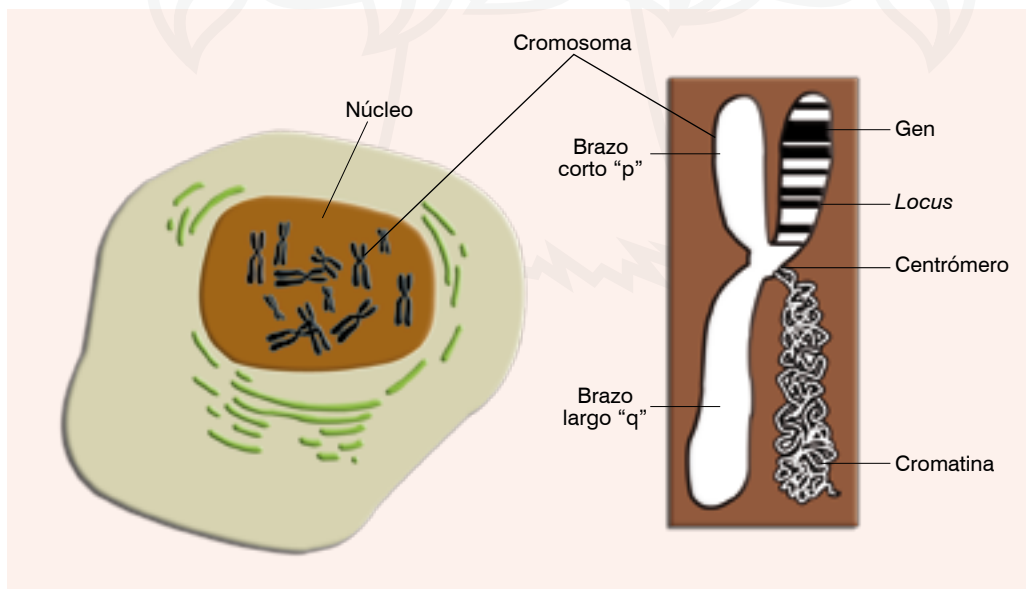


Figura 1. Representación esquemática de la ubicación (*locus*) de los genes en los cromosomas.

Genética y herencia

Los genes de los grupos sanguíneos están localizados en los 22 pares de autosomas. Ningún antígeno de grupo sanguíneo se ha encontrado en el cromosoma Y, y en el cromosoma X sólo los genes Xg y Xk.

Alelos

Cada gen tiene un *locus* específico sobre un cromosoma, y genes alternos que ocupan un solo *locus* se denominan alelos, los cuales son responsables de la especificidad de los antígenos. La terminología de la Sociedad Internacional de Medicina Transfusional, ISBT (por sus siglas en inglés, *International Society of Blood Transfusion*) distingue entre los alelos para los antígenos de los grupos sanguíneos (polimorfismos genéticos) y los antígenos que ellos codifican [22]. Por ejemplo, los antígenos principales del sistema del ABO son A, B y O, y los alelos son A¹, B¹ y O¹. En el sistema Kell, dos alelos, K y k, determinan los antígenos K y k, respectivamente. Los individuos que tienen alelos idénticos en un *locus* específico en ambos cromosomas se denominan *homocigotos* para el alelo (por ejemplo A¹/A¹ o K/K o k/k). En el estado *heterocigoto*, los alelos presentes en el *locus* en cada cromosoma no son idénticos (por ejemplo A¹/O¹ o A¹/B¹ o K/k). La **tabla 1** presenta los genotipos y las localizaciones cromosómicas para los 30 sistemas de antígenos de los grupos sanguíneos [15].

Cuando se heredan dos alelos silenciosos o amórficos, el resultado es un fenotipo nulo o “menos-menos”. Existen fenotipos nulos en la mayoría de los sistemas de grupos sanguíneos humanos. Los ejemplos más comunes son las personas de grupos sanguíneos O, Fy(a-b-), más frecuente en población negra, y Le(a-b-) [16].

Efecto de dosis

Los individuos que son homocigotos para un alelo en algunos sistemas de grupo sanguíneo pueden tener mayor cantidad de antígeno expresado en sus eritrocitos que las personas que son heterocigotas para ese alelo. Por ejemplo, los eritrocitos de una persona con fenotipo Jk(a+b-) tienen una “dosis doble” del alelo Jk^a y, consecuentemente, expresan más antígeno Jk^a en la superficie del eritrocito que un individuo cuyo fenotipo es Jk(a+b+) (una sola dosis del alelo de Jk^a). La diferencia en la cantidad de antígeno expresado en la membrana del eritrocito, entre un fenotipo homocigoto y heterocigoto se puede detectar por técnicas serológicas, como se muestra en el siguiente ejemplo:

Fenotipo	Genotipo	Reacción con anti-E
E	E/E	Fuerte (4+)
Ee	E/e	Débil (2+)
E	e/e	Negativa (O)

El efecto de dosis no se presenta en todos los antígenos de grupo sanguíneo o aun en todos los anticuerpos de una especificidad dada. Los anticuerpos que demuestran típicamente efecto de dosis, son los que pertenecen a los sistemas de grupos sanguíneo Rh, MNS, Kidd y Duffy. Los alelos se originan por cambios genéticos en el DNA y pueden dar lugar a diferentes expresiones de fenotipos [13].

Frecuencia de los alelos

La frecuencia de un alelo (o la frecuencia del gen) es la proporción que contribuye al grupo total de alelos en un *locus*, en una población y en un momento dados. Esta frecuencia se puede

Tabla 1. Genotipos y localizaciones cromosómicas de los sistemas sanguíneos

Número	Sistema	Símbolo	No. de antígenos	Gen	Cromosoma
.001	ABO	ABO	4	<i>ABO</i>	9
.002	MNS	MNS	46	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i>	4
.003	P	P1	1	<i>P1</i>	22
.004	Rh	RH	57	<i>RHD, RHCE</i>	1
.005	Lutheran	LU	21	<i>LU</i>	19
.006	Kell	KEL	34	<i>KEL</i>	7
.007	Lewis	LE	6	<i>FUT3</i>	19
.008	Duffy	FY	6	<i>DARC</i>	1
.009	Kidd	JK	3	<i>SLC14A1</i>	18
.010	Diego	DI	21	<i>SLC4A1</i>	17
.011	Yt	YT	2	<i>ACHE</i>	7
.012	Xg	XG	2	<i>XG, MIC2</i>	X/Y
.013	Scianna	SC	7	<i>ERMAP</i>	1
.014	Dombrock	DO	6	<i>ART4</i>	12
.015	Colton	CO	3	<i>AQP1</i>	7
.016	Landsteiner-Wiener	LW	3	<i>ICAM4</i>	19
.017	Chido/Rodgers	CH/RG	9	<i>C4A, C4B</i>	6
.018	Hh	H	1	<i>FUT1</i>	19
.019	Kx	XK	1	<i>XK</i>	X
.020	Gerbich	GE	8	<i>GYPC</i>	2
.021	Cromer	CROM	15	<i>CD55</i>	1
.022	Knops	KN	9	<i>CR1</i>	1
.023	Indian	IN	4	<i>CD44</i>	11
.024	Ok	OK	1	<i>BSG</i>	19
.025	Raph	RAPH	5	<i>CD151</i>	11
.026	John Milton Hagen	JMH	1	<i>SEMA7A</i>	15
.027	I	I	1	<i>GCNT2</i>	6
.028	Globoside	GLOB	1	<i>B3GALNT1</i>	3
.029	Gill	GIL	1	<i>AQP3</i>	9
.030	Glicoproteína asociada a Rh	RHAG	3	<i>RHAG</i>	6

calcular de las frecuencias del fenotipo observadas dentro de una población. La suma de frecuencias de los alelos en un *locus* debe ser igual a 1.

La ley de Hardy-Weinberg se utiliza para calcular las frecuencias de alelos y genotipos en una población, cuando la frecuencia de un rasgo genético (por ejemplo fenotipo del antígeno) se conoce. Sin embargo, tiene en cuenta ciertas premisas: que no existan mutaciones ni migraciones (hacia adentro o hacia fuera) de la población, que no haya presencia selectiva de ventajas o desventajas de un rasgo en particular y que se analice una población suficientemente grande, de modo que un solo hecho no pueda alterar la frecuencia de un alelo. Si todas estas condiciones están presentes, el grupo de genes está en equilibrio y las frecuencias del alelo no cambiarán de una generación a la siguiente. Si estas premisas no se aplican, pueden ocurrir cambios en la frecuencia de los alelos en algunas generaciones, lo cual puede explicar muchas de las diferencias en frecuencias de los alelos entre poblaciones [13].

Segregación

El término segregación se refiere al concepto que dos alelos de un gen nunca se encuentran en el mismo gameto, pero siempre se segregan y pasan a diferentes gametos. En genética de grupos sanguíneos, esto puede ser ilustrado por la herencia de los alelos ABO. En el ejemplo de la **figura 2**, la generación parental (P) son homocigotos para el alelo A y el alelo O. Todos los miembros de la primera generación filial (F1) serán heterocigotos (A/O) pero expresarán el antígeno del grupo sanguíneo A (O es un alelo silencioso). Si una persona F1 se aparea con una persona de genotipo A/O, la prole resultante, llamada la segunda generación filial F2, será de grupo sanguíneo A (heterocigoto u homocigoto) o grupo sanguíneo O. Si una persona F1 se aparea con una persona heterocigoto del grupo B (B/O), la descendencia podría tener el grupo sanguíneo A, B, AB u O, como se observa en la tabla de Punnett de la **figura 2**.

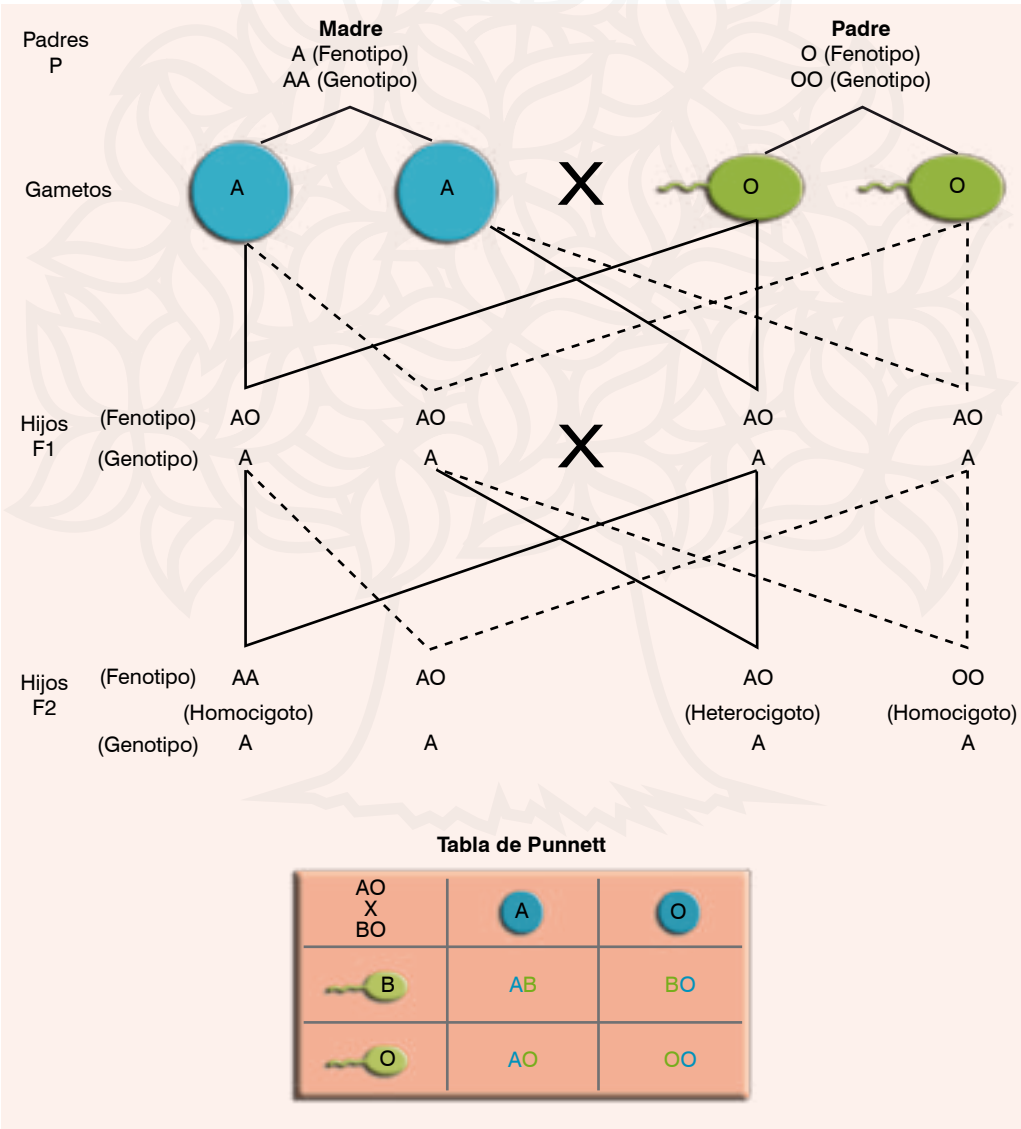


Figura 2. Segregación. Ejemplo de segregación de los grupos sanguíneos donde se observa la presencia de un solo alelo por gameto.

Herencia independiente

La ley de Mendel de herencia independiente establece que los genes que determinan varios rasgos son heredados independientemente uno del otro. Por ejemplo, si un padre es del grupo A (homocigoto para A) y K+k+, y el otro padre es del grupo B (homocigoto para B) y K-k+ (homocigoto para k), todos los niños F1 serán el grupo AB; la mitad serán K+k+ y la otra mitad K-k+. Una segunda generación filial puede presentar cualquiera de los siguientes fenotipos: grupo A, K+k+; grupo AB, K+k+; grupo B, K+k+; grupo A, K-k+; grupo AB, K-k+; grupo B, K-k+. Las proporciones serán 1:2:1:1:2:1, como se observa en la **figura 3**.

La herencia independiente se aplica si los genes están en diferentes cromosomas o en porciones distantes del mismo cromosoma. Una excepción a esta regla es que los genes que están estrechamente ligados en el mismo cromosoma no se heredan independientemente, permaneciendo juntos de una generación a otra, esto se denomina **ligamiento**.

Ligamiento

El ligamiento genético se define como la tendencia de que alelos que están muy cerca en el mismo cromosoma, se transmitan juntos. Durante la mitosis, cada par de cromosomas homólogos experimenta una serie de recombinaciones. El resultado del intercambio recíproco de segmentos entre las cromátides se denomina **entrecruzamiento** (ver **figura 4**). Los genes que están muy cerca en un cromosoma tienden a ser transmitidos juntos durante estas recombinaciones y sus alelos, por lo tanto, no se segregan independientemente. Algunas veces el ligamiento es muy estrecho, así que la recombinación raramente ocurre.

La fuerza de ligamiento se puede utilizar como unidad de medida para estimar la distancia entre diferentes *loci*. Este tipo de análisis puede ayudar en identificar, trazar y diagnosticar los genes responsables de ciertas enfermedades heredables. La demostración de ligamiento entre el gen que controla la secreción de ABH (Se) y la expresión de los antígenos del grupo sanguíneo Lutheran (Lu^a, Lu^b) fue el primer ejemplo reconocido de ligamiento autosómico en humanos [17].

El análisis de esta relación también proporcionó la primera evidencia en los seres humanos de la recombinación debido a entrecruzamiento, y ayudó a demostrar que ocurre más frecuentemente en hembras que en varones.

Desequilibrio de acoplamiento

Cuando dos *loci* están muy cerca, los alelos en estos *loci* tienden a heredarse juntos y se dice que constituyen un haplotipo. El ligamiento estrecho entre los *loci* que controlan la expresión de

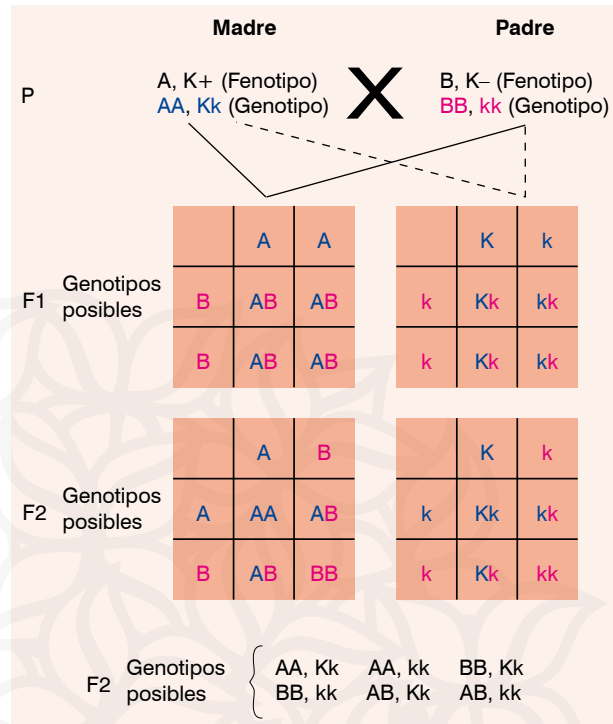


Figura 3. Herencia independiente de los grupos sanguíneos ABO y Kell.

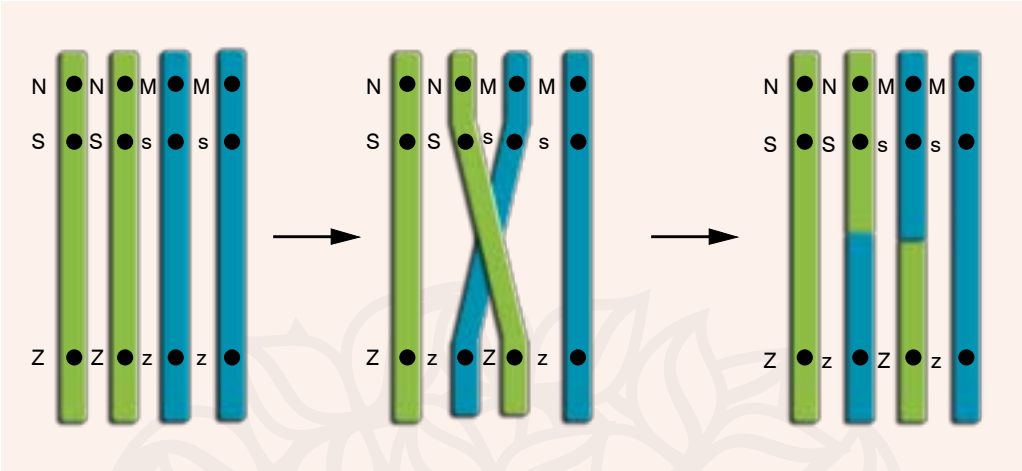


Figura 4. Los *loci* que se encuentran muy cerca unos de otros, raramente se afectan por el entrecruzamiento, por lo tanto los alelos de estos *loci* se heredan juntos (N y S, M y s). Los *loci* que están en el mismo cromosoma, pero no muy cerca (*loci* Ss y Zz), pueden presentar entrecruzamiento. El entrecruzamiento ocurre entre cromátidas homólogas durante la meiosis, dando como resultado segregación de los alelos en el mismo cromosoma.

M, de N, de S y de s, es un ejemplo de desequilibrio de ligamiento. Las frecuencias aproximadas de cada uno de los cuatro alelos son:

Alelo	Frecuencia (%)	Alelo	Frecuencia (%)
M	0,53	S	0,33
N	0,47	s	0,47

Si los alelos de los antígenos M, N, S, y s, se segregan independientemente, la frecuencia esperada de cada haplotipo, sería el producto de las frecuencias de los alelos individuales. Sin embargo, las frecuencias observadas no son las que se esperan:

Alelos	Frecuencia esperada	Frecuencia observada
MS	$0,53 \times 0,33 = 0,17$	0,24
Ms	$0,53 \times 0,47 = 0,36$	0,28
NS	$0,47 \times 0,33 = 0,16$	0,08
Ns	$0,47 \times 0,47 = 0,31$	0,40
Total	1,00	1,00

Este es un ejemplo de desequilibrio del acoplamiento: la tendencia de combinaciones específicas de alelos en dos o más *loci* ligados, se heredan juntos más frecuentemente de lo que se podría esperar por azar.

Patrones de herencia

Rasgo dominante y recesivo

Los *rasgos* son la expresión observada de los genes. Un rasgo que se observa cuando el alelo determinante está presente se llama *dominante*. Cuando diferentes alelos en cromosomas homólogos producen un rasgo observable, se utiliza el término *codominante*. Los antígenos de los grupos sanguíneos se expresan como rasgos codominantes. Por ejemplo, si una persona hereda el gen E de un padre y el gen e (antígenos E y e del sistema Rh) del otro padre, entonces ambos

antígenos E y e se expresan sobre la superficie de los eritrocitos, como se observa en la **figura 5**.

Un rasgo recesivo se observa únicamente cuando el alelo no se aparea con un alelo dominante, o sea cuando dos alelos recesivos están presentes. Los rasgos observables se llaman *fenotipos*. La tipificación de los antígenos de los grupos sanguíneos con antisueros identifica el fenotipo. En algunos casos, los *genotipos* se pueden deducir del fenotipo, especialmente cuando se realizan estudios familiares, pero los genotipos usualmente no se determinan tipificando los eritrocitos.

Asignación cromosómica

La expresión antigénica se puede alterar por la interacción de los genes. Genes reguladores o modificadores, no necesariamente localizados en el mismo *locus*, pueden modificar un grupo sanguíneo. Además, los genes supresores o modificadores pueden afectar la expresión de otros genes a través de mecanismos poco conocidos. La interacción de tres *loci* separados (*H*, *Le* y *Se*), determina el fenotipo Lewis. *In(lu)* es un gen modificador que inhibe la expresión del antígeno Lutheran junto con *P₁*, *i*, *Au^a* y otros [18, 19]. Algunas observaciones en serología de los grupos sanguíneos han sido explicadas por la interacción genética: debilitamiento de la expresión del antígeno de D cuando el alelo C está presente en *cis* (en el mismo cromosoma) o en *trans* (en el cromosoma par), como se observa en la **figura 6** [20].

Genética poblacional

En situaciones clínicas para predecir la probabilidad de encontrar sangre compatible con un suero que contiene múltiples anticuerpos, es importante el conocimiento de la genética poblacional. Para los cálculos se utilizan las publicaciones de las frecuencias de los fenotipos.

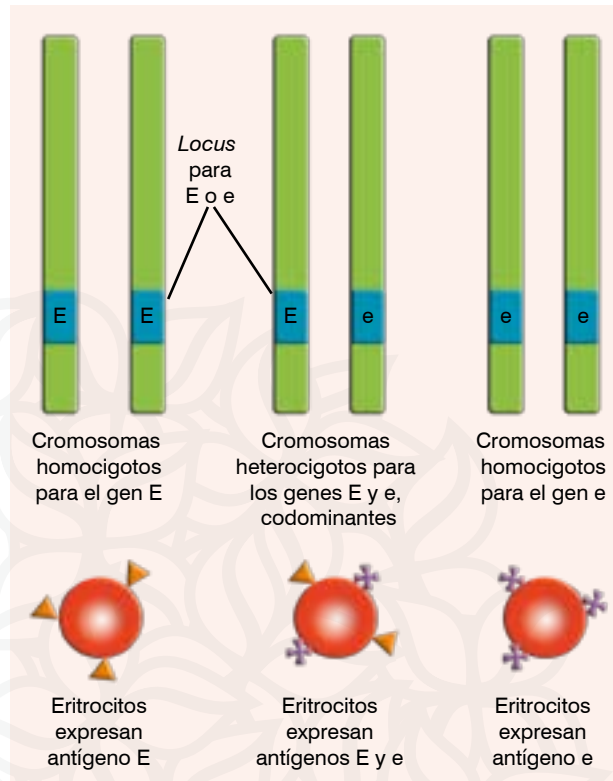


Figura 5. Ejemplo de combinaciones de los genes E y e, sobre el cromosoma 1, brazo corto q.

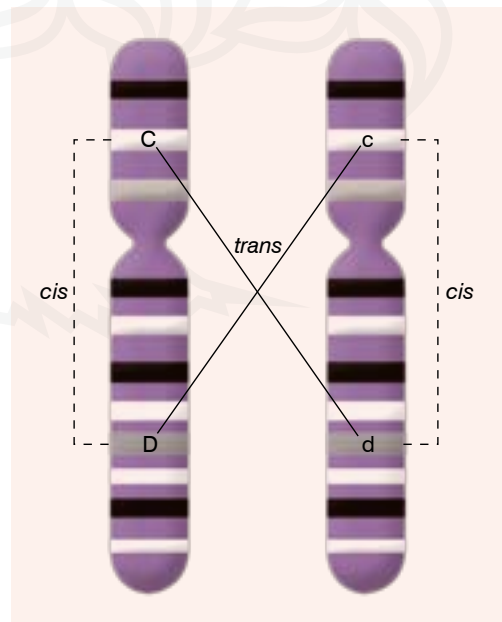


Figura 6. Localización de los alelos en *cis* (en el mismo cromosoma) y en *trans* (en el cromosoma par).

Frecuencia de los fenotipos

Las frecuencias de los fenotipos de los grupos sanguíneos se obtienen analizando muchas personas seleccionadas de forma aleatoria, de la misma raza o grupo étnico y observando la proporción de reacciones positivas y negativas con un anticuerpo específico para un grupo sanguíneo. En un sistema de grupo sanguíneo, la suma de las frecuencias del fenotipo debe ser igual al 100%. Por ejemplo, en una población caucásica, 77% de los individuos seleccionados aleatoriamente son Jk(a+). La frecuencia de los individuos de Jk(a-) debe ser el 23%. Si se necesita sangre para un paciente con anti-Jk^a, el 23% o aproximadamente una en cuatro unidades de sangre ABO-compatibles, deben ser compatibles.

Cálculos para fenotipos combinados

Si un paciente tiene múltiples anticuerpos de grupos sanguíneos, puede ser útil estimar el número de unidades que deben ser analizadas para encontrar unidades de sangre negativa para todos los antígenos. Por ejemplo, si un paciente tiene anti-c, anti-K, y anti-Jk^a, ¿cuántas unidades de sangre ABO-compatibles tendrían que ser analizadas para encontrar 4 unidades con el fenotipo apropiado?

Anticuerpo	Frecuencia del fenotipo (%)
c-	20
K-	91
Jk(a-)	23

Para calcular la frecuencia del fenotipo combinado, las frecuencias individuales se multiplican porque los fenotipos son independientes unos de los otros. Entonces, la proporción de las personas que son c- es 20%. Del 20% de individuos c-, el 91% son K-; por lo tanto 18% ($0,20 \times 0,91 = 0,18$) son c- y K-. De este 18% de individuos c-K-, el 23% deben ser Jk(a-); por lo tanto, solamente el 4% de individuos tendrán sangre c-K-Jk(a-) ($0,2 \times 0,91 \times 0,23 = 0,04$). Es así como de 100 unidades analizadas, 4 unidades son compatibles. Para la toma de decisiones se debe solicitar ayuda a los bancos de sangre, con el fin de encontrar sangre compatible en pacientes aloinmunizados [13].

Pruebas de paternidad

Los antígenos de los grupos sanguíneos, muchos de los cuales se expresan como rasgos codominantes, con modelos simples de herencia mendeliana, son útiles en los análisis de paternidad. Si uno asume que los resultados de las pruebas son exactos, la paternidad se puede excluir de dos maneras:

1. La exclusión *directa* de la paternidad se establece cuando un marcador genético está presente en el niño pero está ausente en la madre y en el supuesto padre. Ejemplo:

Fenotipo de grupo sanguíneo		
Niño	Madre	Supuesto padre
B	O	O

El niño ha heredado un gen B, el cual no se puede heredar ni de la madre ni del padre supuesto. De acuerdo con los fenotipos de la madre y del niño, el gen B se debe haber heredado del padre biológico y se llama un gen *obligatorio* paterno.

2. La exclusión es *indirecta* cuando el niño carece de un marcador genético que el padre alegado (dado su fenotipo observado) debe transmitir a su descendencia. Ejemplo:

Fenotipo de grupo sanguíneo		
Niño	Madre	Supuesto padre
Jk(a+b-)	Jk(a+b-)	Jk(a-b+)

En este caso, el supuesto padre es probablemente homocigoto para Jk^b y debe haber transmitido Jk^b al niño. La exclusión directa es más convincente que la exclusión indirecta cuando se trata de establecer paternidad. La exclusión indirecta puede resultar algunas veces por la presencia de un alelo silencioso. En el ejemplo anterior, el padre supuesto podría tener un alelo silencioso (Jk), el cual fue transmitido al niño.

El genotipo del niño podría ser Jk^aJk en vez de Jk^aJk^a , mucho más común. La interpretación de datos fenotípicos debe considerar todos los factores biológicos y analíticos conocidos para influenciar resultados. Cuando el supuesto padre no puede ser excluido de la paternidad, es posible calcular la probabilidad de la paternidad. La probabilidad que el padre supuesto transmita los genes obligatorios paternos se compara con la probabilidad que cualquier otro hombre aleatoriamente seleccionado de la misma población racial/étnica pueda transmitir los genes.

El resultado se expresa como un cociente de probabilidad (índice de paternidad) o como porcentaje (probabilidad posterior de paternidad dada una probabilidad anterior). Los métodos para el análisis de paternidad incluyen a menudo el estudio de muchos sistemas genéticos diferentes a los grupos sanguíneos (por ejemplo HLA y repeticiones cortas al azar (STR, en inglés *short tandem repeat systems*)). Muchos laboratorios de pruebas de paternidad emplean el método STR para el análisis de DNA como una medida para evaluar los casos de disputa de paternidad. La Asociación Americana de Bancos de sangre (AABB, en inglés *American Association of Blood Banks*) ha desarrollado estándares para los laboratorios que realizan estudios de paternidad [21].

Nomenclatura de los grupos sanguíneos

El grupo de trabajo de la Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre (ISBT, en inglés *International Society of Blood Transfusion*) ha establecido un sistema estandarizado para clasificar los antígenos de los grupos sanguíneos. Sin embargo, se deben conservar las terminologías anteriores, para evitar confusión con las nuevas, por lo tanto ahora existen convenciones comunes para su uso correcto. La Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre ha descrito 30 sistemas de grupos sanguíneos [22].

La terminología de la Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre para los antígenos de los eritrocitos, fue ideada como una nomenclatura numérica para facilitar su automatización. Una designación de seis dígitos indica la especificidad de cada grupo sanguíneo. Los primeros tres números identifican el sistema del grupo sanguíneo y los últimos tres números identifican la especificidad individual. Esta terminología numérica está diseñada principalmente para las bases de datos de computadores.

Para la clasificación de la Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre, cada sistema de grupo sanguíneo debe ser genéticamente distinto. La asignación de antígenos a un sistema específico de grupo sanguíneo depende de las relaciones genéticas, serológicas, y bioquímicas. La clonación de genes ha hecho posible la asignación definitiva y ha permitido algunas designaciones no aprobadas previamente por los estudios tradicionales de familias (por ejemplo, la expansión del sistema de Diego para incluir un número de antígenos de baja incidencia). Sin embargo, aún no se ha demostrado que algunos antígenos son parte de un sistema reconocido.

Las colecciones (llamadas series 200) son al parecer sistemas de antígenos relacionados para los cuales aún no existe información genética definitiva. Otros antígenos aislados de alta incidencia (serie 901) o baja incidencia (serie 700) se listan juntos hasta que la información genética esté disponible. En estos últimos años, el número de antígenos de estas tres series ha declinado drásticamente debido a que la información genética y bioquímica ha permitido su reasignación.

Terminología correcta

Las siguientes son las convenciones aceptadas para expresar los fenotipos y genotipos de los eritrocitos [23].

1. Los genes que codifican la expresión de los antígenos de los grupos sanguíneos se escriben en *itálica* (o subrayado si la *itálica* no está disponible). Si el nombre del antígeno incluye un subíndice (A_1), el gen que lo codifica se expresa con un superíndice (A^1).
2. Los nombres de los antígenos identificados por un superíndice o un número (por ejemplo Fy^a , $Fy:1$) se escriben normal (romana). Las identificaciones numéricas se escriben en la misma línea que las letras. Las letras del superíndice son minúsculas. (Algunas excepciones ocurren, basados en el uso histórico: hr^S , hr^B).
3. Cuando se expresan los fenotipos del antígeno usando identificaciones con letras, los resultados se escriben generalmente como + ó -, en la misma línea que la(s) letra(s) del antígeno: $K+$ $K-$.
4. Para expresar los fenotipos de los antígenos identificados con una letra en superíndice, la letra se pone entre paréntesis en la misma línea que el símbolo que define el antígeno: $Fy(a+)$ y $Fy(a-)$.
5. Para los antígenos identificados por números, el símbolo que define el sistema se escribe con letra mayúscula seguido por dos puntos, y seguido por el número que representa el antígeno analizado. El signo más (+) no aparece cuando los resultados de la prueba son positivos ($K:1$), pero el signo menos (-) se pone antes si los resultados son negativos: $K:1$, $K:-1$. Si las pruebas para varios antígenos en un grupo sanguíneo se han realizado, el fenotipo se identifica por la(s) letra(s) del *locus* o del sistema del grupo sanguíneo seguido por dos puntos, y seguido por los números del antígeno separados por comas: $K:-1,2, -3,4$. Solamente los antígenos analizados se enumeran; si un anticuerpo que define un antígeno específico no fue analizado, el número del antígeno no se enumera: $K:-1, -3,4$.

Aunque la terminología numérica se ha ideado para varios sistemas y antígenos, no se debe sustituir la terminología convencional. El uso de los nombres convencionales de los antígenos también es aceptable. En algunos sistemas, principalmente el Rh, existen múltiples terminologías y no todos los antígenos dentro del sistema tienen nombres.

Inmunología básica de los grupos sanguíneos

Antígenos

Un antígeno se define como cualquier sustancia que, cuando ingresa en el organismo y se reconoce como extraña, provoca una respuesta inmune. Ésta podría inducir la producción de anticuerpos específicos que determinan una reacción observable [24]. Los antígenos de los grupos sanguíneos pueden ser proteínas o glicoproteínas estructurales de membrana del eritrocito. Los anticuerpos reconocen principalmente su cadena polipeptídica o de carbohidratos y los glicolí-

pidos. La mayoría de las proteínas de superficie son glicosiladas con excepción de las proteínas Rh y Kx [25].

Los antígenos de los eritrocitos se pueden expresar exclusivamente en los eritrocitos (como en el caso de los antígenos Rh) o simultáneamente en otras células sanguíneas (como el antígeno P1) y en los tejidos (antígenos ABO) [26].

Anticuerpos

Un anticuerpo es el producto de la respuesta inmune que reacciona con el antígeno correspondiente en forma observable. Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son proteínas plasmáticas que se ubican en la fracción de las gammaglobulinas. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos están formados por cadenas de aminoácidos unidos por puentes peptídicos. Los anticuerpos IgG poseen cuatro cadenas, dos pequeñas o livianas y dos más grandes o pesadas. Por su parte, la IgM se compone de 10 cadenas livianas y 10 pesadas. La **figura 7** ilustra la diferencia entre las dos moléculas [24].

¿Qué es un grupo sanguíneo?

Un grupo sanguíneo se define como “una característica heredada sobre la superficie del eritrocito, la cual se puede detectar por medio de un anticuerpo específico”.

Definición de sistema de grupo sanguíneo

Un sistema de grupo sanguíneo está compuesto por antígenos heredados como grupo. Cada sistema está constituido por antígenos producidos por alelos en un *locus* genético único o en *loci* tan estrechamente ligados, que no se presenta entrecruzamiento. Los antígenos de los eritrocitos, que representan un grupo sanguíneo único, están controlados genéticamente por genes alélicos heredados independientemente los unos de los otros.

La identificación de un sistema de grupo sanguíneo sigue una secuencia natural. Un anticuerpo que detecta un nuevo antígeno es descubierto, usualmente en pacientes multitransfundidos o en mujeres multíparas. Una vez que el correspondiente antígeno es identificado, el patrón de

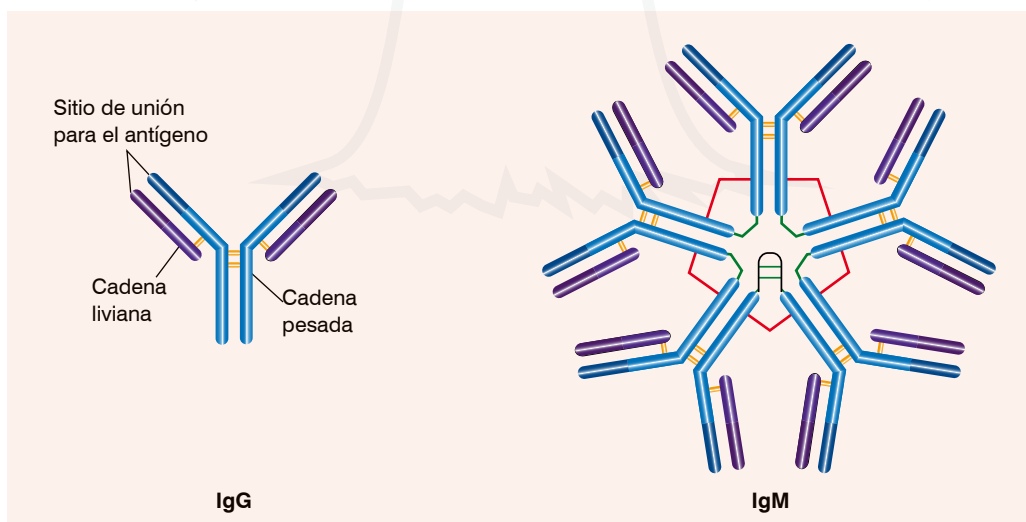


Figura 7. Representación esquemática de las moléculas de inmunoglobulinas G y M.

herencia es estudiado y se inicia una investigación para la identificación del antígeno. Posteriormente se pueden establecer relaciones genéticas más complejas; por ejemplo, cuando alelos múltiples sobre un cromosoma único son heredados como grupo, como en el caso del sistema de grupo sanguíneo MNSs, o varios *loci* están comprometidos, como en el caso del sistema de grupo sanguíneo Lewis.

Luego se realizan estudios de población para calcular las frecuencias del gen. Una vez que se confirma la relación genética, se puede hacer la asignación de un sistema de grupo sanguíneo. Si es posible, se determina la estructura bioquímica del antígeno y se describe su biosíntesis. Por lo tanto, los grupos sanguíneos primero se definen inmunológicamente, luego genética y bioquímicamente.

Los grupos sanguíneos se pueden clasificar de la siguiente forma: 1) por su importancia clínica (es decir que causan reacción transfusional hemolítica o enfermedad hemolítica del recién nacido), 2) por la fuente de sensibilización (exposición a antígenos similares en el ambiente o por estimulación inmune de antígenos extraños introducidos por transfusión o embarazo), o 3) por relaciones bioquímicas.

Inmunohematología

Los anticuerpos que definen los antígenos de los grupos sanguíneos se dividen en tres grupos: aloanticuerpos, autoanticuerpos y anticuerpos heterólogos [27]. Los aloanticuerpos pueden ser naturales o inmunes, estimulados por transfusión o por embarazo. Los autoanticuerpos reaccionan con antígenos de la misma persona que formó el anticuerpo y generalmente se dirigen contra antígenos de alta frecuencia. Los anticuerpos heterólogos contra los eritrocitos humanos, se originan de otras especies.

Un antígeno induce la formación de un anticuerpo específico, el cual es capaz de combinarse con el antígeno. La porción que se une fuertemente con el anticuerpo, es el determinante inmunodominante. Los determinantes antigénicos pueden ser polipéptidos y polisacáridos lineares o también pueden ser proteínas.

La especificidad depende de la estructura química del antígeno, la cual permite el contacto estereoquímico entre el antígeno y el anticuerpo. El determinante antigénico es el área accesible que se combina con el anticuerpo. El número y la localización de los determinantes antigénicos varían ampliamente de sistema a sistema y se correlaciona con la fuerza con la cual diferentes antígenos reaccionan con sus anticuerpos. [28, 31].

Los anticuerpos inducidos por un antígeno específico pueden presentar reacciones cruzadas con otros antígenos. Un antígeno generalmente tiene más de un determinante antigénico, que también se puede encontrar en antígenos no relacionados. La reactividad cruzada ocurre cuando los determinantes compartidos son similares.

La inmunogenicidad de un antígeno se debe a su capacidad para estimular la formación de anticuerpos. No todos los antígenos son igualmente inmunogénicos. La antigenicidad relativa se puede estimar calculando el número de personas negativas para un antígeno específico, quienes desarrollarán el correspondiente anticuerpo, y se compara con la posibilidad de recibir sangre positiva para un antígeno. De los anticuerpos, los Rh son los más comunes, seguidos por los que pertenecen a los sistemas de grupo sanguíneo Kell, Kidd y Duffy [27].

La formación de anti-D ocurre casi en 1% de las exposiciones antigénicas potenciales, anti-K en aproximadamente 0,1%, y anti-c y anti-E en cerca de 0,04% [32].

Importancia biológica de los antígenos de los grupos sanguíneos

La importancia biológica de muchos antígenos de los grupos sanguíneos se debe principalmente a su estructura. Las siguientes funciones se han atribuido a los antígenos de los grupos sanguíneos [25]:

- Transportadores de moléculas biológicamente importantes a través de la membrana del eritrocito
- Receptores de estímulos externos y células de adhesión
- Reguladores del complemento para prevenir la destrucción de los eritrocitos
- Enzimas
- Anclaje de la membrana del eritrocito al citoesqueleto
- Proveedor de matriz extracelular de carbohidratos para proteger a la célula de daños mecánicos y ataques por agentes infecciosos.

Importancia clínica de los anticuerpos de los grupos sanguíneos

La importancia clínica se determina de acuerdo a si el anticuerpo es capaz de destruir los eritrocitos *in vivo*, si el anticuerpo puede cruzar la placenta (y el antígeno está bien desarrollado en el feto), y por la frecuencia relativa del antígeno. Usando estos criterios, los anticuerpos ABO, los cuales causan destrucción intravascular inmediata, son los más importantes en las transfusiones, seguidos por los anticuerpos Rh, los cuales ya se han formado por la estimulación inmune y pueden causar enfermedad hemolítica del recién nacido severa o destrucción inmune de las células transfundidas. Otros factores importantes son la clase y subclase de inmunoglobulina y el rango térmico del anticuerpo. En general, los anticuerpos clínicamente importantes son IgG que reaccionan a 37°C.

Los anticuerpos clínicamente significativos se presentan entre el 1% y 2% de todos los pacientes transfundidos [33]. Los pacientes con enfermedad de células falciformes tienen una incidencia aproximadamente del 25% [34, 36] y los receptores de transplante hepático desarrollan anticuerpos entre el 6% y el 12%. Las personas con enfermedades autoinmunes también presentan una frecuencia elevada de aloanticuerpos [37].

Otro factor importante es la diferencia en la distribución de los antígenos sobre los eritrocitos, en la población. Como se observa en la **tabla 2** [38, 39], la distribución de antígenos en algunos sistemas de grupo sanguíneo, es diferente entre los grupos étnicos, por lo tanto el potencial de transfundir glóbulos rojos que porten los antígenos a receptores que no los poseen, es mucho mayor.

Anticuerpos IgG

Los anticuerpos IgG constituyen alrededor del 73% de las inmunoglobulinas totales. Tienen un peso molecular de 150.000 daltons. Por su tamaño, atraviesan con facilidad la placenta, causando la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, la cual se presenta cuando los anticuerpos maternos cruzan la placenta y destruyen los eritrocitos fetales que poseen los antígenos correspondientes. Los anticuerpos IgG no producen aglutinación de los glóbulos rojos antigénicos suspendidos en solución salina; sólo los recubren y sensibilizan [24].

Tabla 2. Distribución de grupos sanguíneos en población de los Estados Unidos

Prevalencia en porcentaje			
Sistema sanguíneo	Antígeno	Blancos	Negros
Rh	C	68	27
	c	80	96
	E	29	22
	e	98	98
Kell	K	9	2
	k	99.8	100
	Js ^a	0	20
Duffy	Js ^b	100	99
	Fy ^a	65	10
	Fy ^b	83	23
Kidd	Jk ^a	77	91
	Jk ^b	72	43
MNS	S	55	31
	s	89	87

Tabla 3. Diferencias entre los anticuerpos IgG e IgM		
	IgG	IgM
Porcentaje del total de inmunoglobulinas	73%	8%
Peso molecular	150.000	900.000
Aglutinación eritrocitaria	No	Sí
Cruce placentario	Sí	No
Activación del complemento	Sí	Sí
Temperatura óptima de reacción	37°C	4°C
Tipo de anticuerpo	Inmune	Natural

eritrocitos se representa como “nulo”; esto significa que los antígenos de un grupo sanguíneo en particular están ausentes en los eritrocitos. Un ejemplo es el fenotipo Rh nulo: en personas de este fenotipo, todos los antígenos del sistema de grupo sanguíneo Rh están ausentes en los eritrocitos. Los eritrocitos muestran una forma anormal y las personas presentan anemia leve compensada. Otro ejemplo es el fenotipo McLeod, el cual se manifiesta en los eritrocitos por la ausencia o debilitamiento de los antígenos del sistema de grupo sanguíneo Kell. La forma de los eritrocitos es anormal (ovalocitos) y el defecto genético se asocia con la aparición tardía de síntomas neurológicos. Estos ejemplos representan enfermedades asociadas debidas a defectos de membrana heredados.

Los antígenos de los grupos sanguíneos son de hecho receptores para ciertos patógenos. La proteína del grupo sanguíneo Duffy ha mostrado ser el receptor exclusivo para *Plasmodium vivax*, uno de los parásitos causantes de la malaria. Como consecuencia, una selección genética importante ha ocurrido en áreas endémicas del occidente de África, en donde al 100% de la población le falta la proteína Duffy en los eritrocitos. Esta selección se refleja en la población americana de origen africano, en quienes la prevalencia del fenotipo Duffy negativo es del 68% [40].

Anticuerpos IgM

Los anticuerpos IgM constituyen alrededor del 8% de las inmunoglobulinas totales. Son mucho más grandes que los IgG y tienen un peso molecular de 900.000 daltons. No pueden atravesar la placenta, de manera que no provocan enfermedad hemolítica del recién nacido. Aglutinan con facilidad los glóbulos rojos suspendidos en solución salina y su vida media es de apenas 10 días. Durante las reacciones antígeno-anticuerpo, a menudo activan el complemento, causando hemólisis de los eritrocitos, más que aglutinación. La **tabla 3** muestra la diferencia entre los anticuerpos IgG e IgM [24].

Grupo sanguíneo y enfermedad

La asociación de grupos sanguíneos y enfermedad se puede dividir en dos categorías: 1) la asociación del fenotipo de grupo sanguíneo con la expresión de enfermedad y 2) el papel de los grupos sanguíneos como receptores de patógenos [38]. En la primera categoría, la identidad de un fenotipo anormal ha llevado al descubrimiento de una anomalía en la membrana del eritrocito [39]. Usualmente el fenotipo de los

Los antígenos de grupos sanguíneos también poseen receptores para bacterias, como en el caso de *E. coli* que se une al antígeno DR, sobre el CD55. En el caso del parvovirus B19, éste se une por medio de un receptor de membrana al grupo sanguíneo P [41, 42].

Respuesta inmune

Cuando el organismo se expone por primera vez a un antígeno extraño, desencadena una respuesta primaria. Ésta se desarrolla con lentitud y podrían pasar varios meses hasta la aparición de anticuerpos detectables. El segundo contacto con el mismo antígeno determina una respuesta secundaria. Ésta es mucho más fuerte, y en general se sintetizan concentraciones más altas de anticuerpos en poco tiempo. La respuesta primaria a menudo se asocia con niveles altos de IgM, mientras que en la secundaria predomina la IgG [24]. Ver **figura 8**.

Anticuerpos naturales e inmunes

Si analizamos el suero de una persona normal, encontramos anticuerpos de grupo sanguíneo ABO, en tanto que el suero del cordón umbilical o del recién nacido revela concentraciones mínimas o nulas de anticuerpos de ese tipo. No obstante, si examinamos el suero del lactante 12 a 20 semanas más tarde, observamos títulos moderados. Estos anticuerpos aparecen sin inmunización obvia del bebé con antígenos de grupo sanguíneo A o B. Por lo tanto, se consideran naturales; es decir, que surgen en ausencia de un estímulo antigénico conocido. Como ya se mencionó, los anticuerpos se sintetizan como resultado del ingreso de un antígeno, de modo que el término “natural” podría causar confusión. Ahora se sabe que los virus, bacterias y muchos alimentos poseen antígenos AB muy similares a los de los grupos sanguíneos humanos. Entonces, estos anticuerpos “naturales” se deben a antígenos que entran al organismo y promueven la respuesta adecuada, casi siempre de tipo IgM. Los anticuerpos inmunes de grupo sanguíneo suelen ser IgG y se producen en presencia de anticuerpos eritrocitarios extraños. Este evento puede tener lugar como consecuencia de una transfusión de sangre o en caso de embarazo, por el paso de sangre fetal a la circulación materna [24].

Reacciones antígeno-anticuerpo eritrocitarias

La mayoría de las técnicas empleadas en banco de sangre para detectar las reacciones entre antígenos y anticuerpos se basan en la aglutinación y en ocasiones, en la lisis de los glóbulos rojos (hemólisis).

Aglutinación

La aglutinación resulta de la fijación de los anticuerpos a los antígenos que están en la membrana de los eritrocitos, formando una red que mantiene unidas las células. Este proceso se divide en dos etapas:

- Los anticuerpos se fijan a los antígenos eritrocitarios en cuanto se ponen en contacto con ellos. Este fenómeno no causa aglutinación, sólo recubrimiento y sensibilización de los glóbulos rojos.

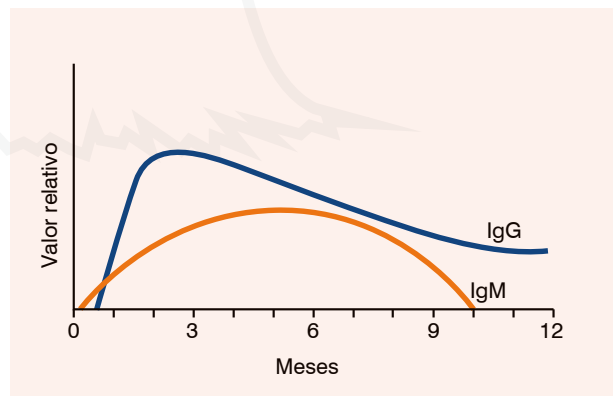


Figura 8. Respuesta inmune a antígenos extraños. La respuesta inicial se caracteriza por la generación de anticuerpos tipo IgM, los cuales desaparecen gradualmente con el tiempo. Posteriormente aparecen los anticuerpos tipo IgG, que permanecen detectables de por vida.

- Se forma una red que determina la aglutinación. Esta etapa es una continuación de la primera etapa, en la cual, si las condiciones son apropiadas, los anticuerpos provocan aglutinación física de las células.

Los anticuerpos IgM son grandes y exhiben 10 puntos de combinación antigénica. Pueden sensibilizar y producir aglutinación de los eritrocitos de manera directa, como se observa en la **figura 9**. Los anticuerpos IgG son más pequeños y no aglutinan los glóbulos rojos en forma directa, sólo recubren y sensibilizan, como se observa en la **figura 10**.

Para conocer si se produjo sensibilización eritrocitaria y reacción antígeno-anticuerpo, se emplean los siguientes reactivos: albúmina, reactivos antiglobulínicos y enzimas proteolíticas, los cuales serán descritos más adelante.

Hemólisis

Hemólisis es la ruptura de los eritrocitos con la correspondiente liberación de la hemoglobina intracelular. La hemólisis *in vitro* mediada por anticuerpos depende del ataque del complemento a la membrana de la célula roja. La hemólisis no ocurre si el antígeno y el anticuerpo interactúan en el suero, al cual le falta el complemento, o en el plasma, en el cual el anticoagulante ha quedado los cationes de calcio y magnesio, necesarios para la activación del complemento.

La hemólisis indica un resultado positivo en las pruebas en las cuales se buscan anticuerpos contra antígenos en los eritrocitos, ya que confirma que ha ocurrido la unión del anticuerpo al antígeno y la activación de la cascada del complemento, lo cual se percibe visualmente como sobrenadante de color rojo o rosado en el suero. Algunos anticuerpos que son líticos (por ejemplo anti-Vel, anti-le^a, Jk^a), pueden causar hemólisis intravascular en pacientes transfundidos con sangre.

Factores que afectan las reacciones antígeno-anticuerpo eritrocitarias

Fuerza iónica

En condiciones fisiológicas normales (*in vivo*) o en un tubo de ensayo (*in vitro*), los glóbulos rojos nunca hacen contacto, debido a su carga eléctrica negativa en la membrana que hace que se rechacen entre sí. La distancia que separa los eritrocitos es mínima, pero suficiente para evitar que las moléculas pequeñas de IgG que se adhieran a las células causen aglutinación, como se aprecia en la **figura 9**. Sin embargo, las moléculas de IgM más grandes, pueden unirlos, como se muestra en la **figura 10**. En consecuencia, los anticuerpos IgM pueden provocar aglutinación

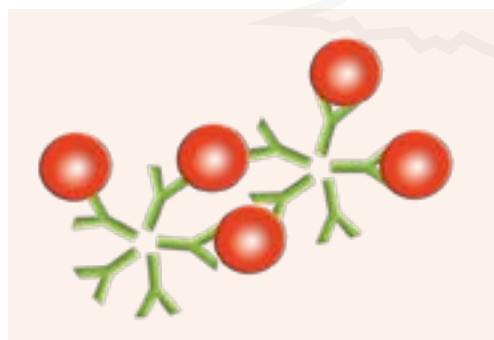


Figura 9. Reacción de los eritrocitos con los anticuerpos IgM que conlleva a la aglutinación.

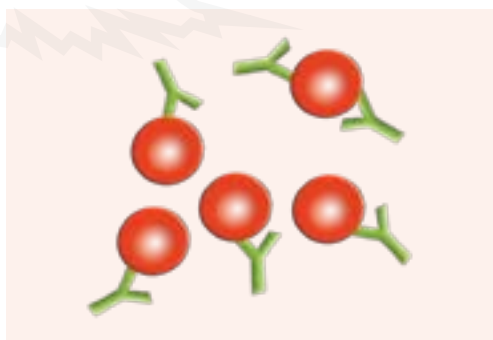


Figura 10. Eritrocitos sensibilizados por anticuerpos IgG.

directa de los glóbulos rojos, pero los anticuerpos IgG sólo los recubren y sensibilizan.

La carga negativa de los eritrocitos deriva de los grupos de ácido neuramínico de la membrana. La fuerza que mantiene la separación entre las células se denomina potencial zeta (ver **figura 11**). Con el fin de reducir la fuerza iónica e incrementar la velocidad de la reacción antígeno-anticuerpo, en los bancos de sangre se utiliza solución salina de baja fuerza iónica (LISS), la cual será revisada más adelante.

Temperatura

Los anticuerpos de los grupos sanguíneos difieren con respecto a su actividad térmica óptima y son reactivos en un rango de temperatura restringido. Los anticuerpos fríos, generalmente IgM, reaccionan de forma óptima a bajas temperaturas, entre 4°C y 25°C. Por otro lado, los anticuerpos calientes, generalmente IgG, reaccionan mejor a 37°C. Los anticuerpos que reaccionan *in vitro* sólo a temperaturas por debajo de 37°C se considera que no tienen significado clínico y raramente causan destrucción de los glóbulos rojos.

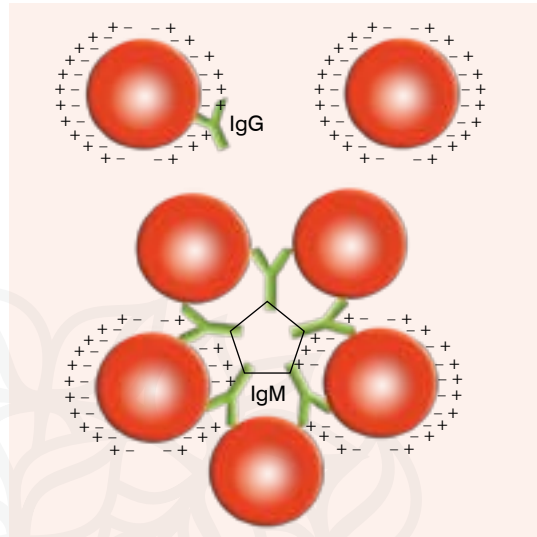


Figura 11. Potencial Z. Las cargas iónicas en la superficie de los eritrocitos los mantienen separados unos de otros. La molécula de IgG es muy pequeña y no puede servir de puente entre los eritrocitos, como sí lo hace la molécula de IgM.

pH

El pH óptimo de la mayoría de los anticuerpos de los grupos sanguíneos es de 6,5 a 7,5. Cuando el pH es demasiado ácido o demasiado alcalino, las reacciones se inhiben. Para pruebas de rutina se debe usar un pH de 7,0.

Antigüedad del suero y los eritrocitos

Las reacciones más satisfactorias se obtienen cuando se utilizan suero y eritrocitos frescos. Se aconseja entonces utilizar glóbulos rojos recién preparados y conservar el suero a -20°C o menos.

Proporción entre anticuerpos y antígenos

La proporción entre anticuerpos y antígenos es importante. Cuanto mayor es la concentración de anticuerpos en relación con la de los antígenos eritrocitarios, más intensa es la reacción. Por lo tanto, la potencia de la suspensión de glóbulos rojos es esencial, porque si es excesiva, podría enmascarar la presencia de anticuerpos débiles. Para las pruebas de aglutinación, la preparación de los eritrocitos debe estar entre el 2% y el 5%.

En serología, una proporción de glóbulos rojos comúnmente usada es dos gotas de suero por una gota de una suspensión de glóbulos rojos entre el 2% y el 5%. Si el anticuerpo reacciona muy débil, aumentar la cantidad de anticuerpo puede incrementar la sensibilidad de la prueba.

La reducción de la concentración de eritrocitos a partir del 5% hasta el 2% o al 3% dobla la relación célula-suero, al igual que agregando 4 gotas del suero a la suspensión estándar de los eritrocitos. A veces, es útil aumentar el volumen del suero a 10 o aun 20 gotas, particularmente

durante una investigación de una reacción hemolítica transfusional, en la cual las pruebas de rutina no revelan ningún anticuerpo. Las alteraciones en el volumen de suero o de plasma afectan de forma importante la fuerza iónica de las pruebas en las cuales LISS ha reducido la constante dieléctrica, así que los procedimientos deben ser modificados para mantener la relación apropiada entre suero y LISS.

Tiempo de incubación

Las reacciones antígeno-anticuerpo tienen un tiempo óptimo de incubación que favorece la máxima unión del anticuerpo al antígeno. Periodos de incubación cortos no permiten que cantidades significativas de anticuerpo se unan, y periodos prolongados de incubación pueden resultar en disociación del anticuerpo del antígeno.

Para los sistemas en solución salina en los cuales se utiliza el suero de antiglobulina humana (AGH) para demostrar la unión del anticuerpo, la incubación entre 30 a 60 minutos a 37°C es adecuada para detectar la mayoría de los anticuerpos clínicamente significativos. Para algunos anticuerpos débilmente reactivos, la asociación puede no alcanzar el equilibrio en 30 minutos y la prolongación del tiempo de la incubación puede aumentar la sensibilidad de la prueba. Prolongar el tiempo de la incubación más allá de 60 minutos tiene pocas desventajas, con la excepción de retrasar el tiempo de los resultados.

El tiempo de incubación a 37°C se puede disminuir entre 10 y 15 minutos si se utiliza solución salina de baja fuerza iónica, LISS. El uso de polímeros solubles en agua como el glicol de polietileno (PEG, por sus siglas en inglés *polyethylene glycol*) también reduce el tiempo, como se revisará más adelante [43].

Lectura e interpretación de las reacciones de aglutinación

La mayoría de los procedimientos de rutina realizados en los bancos de sangre dependen de aglutinación y/o hemólisis como punto final. En las pruebas serológicas, la hemólisis o la aglutinación que constituye el punto final de la reacción, debe ser descrito con precisión. Inmediatamente después de la centrifugación, se debe observar el sobrenadante para hemólisis y el botón de glóbulos rojos se debe desagregar suavemente para observar la aglutinación. La manera en la cual los eritrocitos son despegados del botón del tubo, afecta la detección de la aglutinación [43].

La fuerza de la aglutinación observada con cada muestra debe ser registrada una vez se ha leído. Todo el personal en el laboratorio debe usar el mismo esquema de interpretación. Un sistema comúnmente usado es el siguiente:

- 4+ aglutinados sólidos
- 3+ varios aglutinados grandes
- 2+ aglutinados de tamaño medio, fondo claro
- 1+ pequeños aglutinados, fondo turbio
- + aglutinados muy pequeños, fondo turbio
- O no aglutinación o hemólisis
- HP hemólisis parcial, algunas células rojas permanecen
- H hemólisis completa, no hay células rojas
- mf campo mixto, algunos aglutinados de células rojas y algunas células libres

Para una máxima reproducibilidad, se deben usar una fuente de luz y un lente óptico. Las lecturas al microscopio no se usan de rutina en el banco de sangre, pero pueden ser útiles para diferenciar fenómeno de *rouleaux*. La formación de *rouleaux* es una pseudoaglutinación en la cual los eritrocitos se adhieren uno a otro sobre su superficie plana, dando la apariencia de una pila de monedas. Esta adherencia no inmunológica de los eritrocitos, se debe a altas concentraciones de globulina en el suero, los cuales se observan en pacientes con mieloma múltiple, muestras tomadas del cordón umbilical que se contaminan con la gelatina de Warthon y en pacientes a quienes se les administra dextrán como expansor del plasma. El *rouleaux* se dispersa con la adición de solución salina a la reacción. Este procedimiento se conoce como la técnica del reemplazo de solución salina. La verdadera aglutinación no se dispersa con esta técnica. En la **figura 12** se observa aglutinación de los eritrocitos.

Reactivos utilizados para la detección de anticuerpos

Albúmina

Las moléculas como la albúmina aproximan los eritrocitos entre sí, de manera que los anticuerpos IgG pueden fijarse a los antígenos de células adyacentes y formar aglutinados. Si los eritrocitos no están cubiertos, la albúmina no actúa.

Su efecto se debe a que actúa como un estabilizador de baja fuerza iónica, facilitando la aglutinación al reducir la repulsión entre las células. La albúmina de suero bovino está disponible como soluciones al 22% y al 30% [13].

Enzimas

Las cargas negativas de los glóbulos rojos los mantienen separados. Este fenómeno se debe a la presencia de ácido neuramínico en la superficie de las células. Algunas enzimas como la bromelina, ficcina, papaína y tripsina, remueven parte del ácido neuramínico, disminuyendo la carga negativa. Los eritrocitos se aproximan y los anticuerpos IgG pueden aglutinarlos. Los anticuerpos IgM también aglutinan los eritrocitos tratados con enzimas y su reacción puede ser más intensa, como en el caso de anti-A y anti-B.

Sin embargo, las enzimas eliminan algunos antígenos eritrocitarios principalmente M, N, S, Fy^a y Fy^b. Por lo tanto, estas pruebas son complementarias y no reemplazan las pruebas básicas (solución salina, albúmina y antiglobulina) [13].

Glicol de polietileno

Glicol de polietileno (PEG) es un polímero lineal soluble en agua usado como un aditivo para potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo [44]. Se ha sugerido que el PEG promueve la captación del anticuerpo a través de la exclusión de moléculas de agua en el diluyente, de tal forma que los antígenos y los anticuerpos entran en un contacto muy estrecho, facilitando la unión entre los eritrocitos y los anticuerpos. Múltiples estudios han

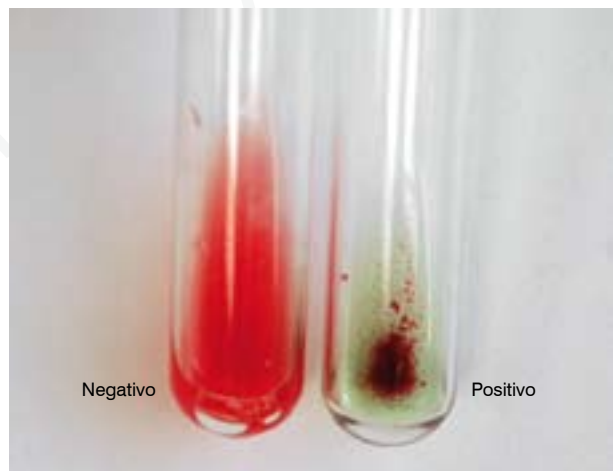


Figura 12. Lectura de las reacciones de aglutinación (Coombs) en tubo.

demostrado que el PEG incrementa la detección de anticuerpos clínicamente significativos y disminuye la detección de anticuerpos no significativos [45].

Solución salina de baja carga iónica

La solución salina de baja carga iónica o LISS (aproximadamente 0,03 M), al reducir la fuerza iónica del medio, incrementa la velocidad de la sensibilización de los anticuerpos contra antígenos eritrocitarios, comparada con la solución salina normal (aproximadamente 0,17 M). Para prevenir la lisis de los eritrocitos debido a la fuerza iónica tan baja, se adiciona glicina como aditivo al LISS.

Actualmente la mayoría de los bancos de sangre utilizan LISS con aditivo, el cual se encuentra disponible comercialmente y puede contener albúmina, además de sales y estabilizadores. Las soluciones LISS aumentan la velocidad de asociación del anticuerpo (etapa 1) cuando las proporciones del volumen están correctas. Aumentando el volumen del suero, aumentará la fuerza iónica de la prueba; por lo tanto, cualquier alteración en los volúmenes del suero usados requiere el ajuste del volumen de LISS o la omisión de LISS. Por esta razón, el uso de LISS para los estudios de rutina de titulación y otras pruebas, se debe hacer siguiendo las instrucciones del fabricante.

Prueba de antiglobulina o Coombs

Como ya se mencionó, algunas moléculas pequeñas como la IgG pueden sensibilizar los eritrocitos y no producir aglutinación. En 1945, Coombs y colaboradores [11] describieron una prueba para detectar estos anticuerpos no aglutinantes. Posteriormente, esta misma prueba se utilizó para demostrar la unión del complemento a los eritrocitos. Esta prueba se conoce como la prueba de antiglobulina o prueba de Coombs.

Todas las moléculas de anticuerpos son globulinas. Estas globulinas humanas son inyectadas a animales para que fabriquen anticuerpos dirigidos contra esas proteínas extrañas. El suero del animal es sometido luego a procedimientos de adsorción para eliminar las aglutininas indeseadas. Este suero tendrá la capacidad de reaccionar específicamente contra globulinas humanas, por lo tanto se denomina suero de antiglobulina humana (AGH). Los sueros de AGH se pueden producir con diferentes especificidades, principalmente contra IgG y contra diferentes fracciones del complemento.

Las moléculas de AGH forman un puente entre los eritrocitos adyacentes cubiertos con anticuerpos, para producir aglutinación visible. Las células que no tienen ninguna globulina unida no serán aglutinadas. La fuerza de la aglutinación observada es generalmente proporcional a la cantidad de globulina unida. El suero de AGH reaccionará con los anticuerpos y fracciones del complemento de origen humano, que están unidos a los eritrocitos, por lo tanto los eritrocitos deben ser lavados para eliminar las proteínas no unidas, antes de la adición de AGH.

Prueba de antiglobulina directa

La prueba de antiglobulina directa o Coombs directo se utiliza para demostrar el recubrimiento *in vivo* de eritrocitos con anticuerpos o con el complemento, principalmente IgG y C3d. Los eritrocitos lavados de un paciente o de un donante se prueban directamente con los reactivos de antiglobulina humana-AGH. La prueba de antiglobulina directa se utiliza en la investigación de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, anemia hemolítica autoinmune, hemólisis inducida por drogas y en el estudio de las reacciones aloinmunes contra eritrocitos transfundidos recientemente.

Prueba de antiglobulina indirecta

En la prueba de antiglobulina indirecta o Coombs indirecto, el suero (o plasma) se incuba con eritrocitos, luego se hace un lavado para remover las globulinas no unidas. La aglutinación que ocurre cuando se agrega antiglobulina humana AGH, indica que el anticuerpo se ha unido a un antígeno específico presente sobre el eritrocito. La especificidad del anticuerpo puede ser conocida y la del antígeno no, como en el caso de la fenotipificación de grupos sanguíneos, o pueden ser desconocidas. También se usa para realizar la prueba cruzada de compatibilidad, en donde el suero y los antígenos eritrocitarios son desconocidos. En la **figura 13** se esquematiza la prueba de antiglobulina directa e indirecta y en la **figura 12** se observa su lectura.

Reactivos de antiglobulina

Se pueden preparar anticuerpos contra las globulinas humana, inyectando animales con IgG, IgA, IgM, C3, o C4 purificado. Estos antisueros obtenidos de animales son policlonales por naturaleza. También se pueden preparar reactivos monoclonales a partir de hibridomas. Anticuerpos derivados de animales o de hibridomas pueden ser mezclados en las preparaciones de los reactivos para obtener cualquier combinación con las especificidades deseadas, o también se pueden juntar en un mismo reactivo diferentes clones de anticuerpos que reconocen un mismo antígeno. Por lo tanto, los reactivos pueden ser policlonales, monoclonales, mezclas de monoclonales o mezclas de anticuerpos monoclonal y policlonal.

Los anticuerpos monoclonales producidos a partir de un clon de una célula única y específicos para un solo antígeno, se pueden producir en grandes cantidades usando tecnología de hibridomas. Este proceso involucra la fusión de la célula del bazo de un ratón normal que produce el anticuerpo deseado, con una célula anormal de un ratón que tiene mieloma. En cultivo estas células híbridas producen clones que crecen rápidamente y producen grandes cantidades del anticuerpo deseado, como se observa en la **figura 14**. Las células del hibridoma pueden ser inyectadas intraperitonealmente a un ratón, para producir la efusión de grandes cantidades de líquido rico en anticuerpos a la cavidad peritoneal. Posteriormente, el líquido ascítico del ratón es obtenido para la producción de reactivos para los bancos de sangre, entre otros usos.

La Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) ha establecido las definiciones para una variedad de los reactivos de AGH, como se muestra en la **tabla 4**. Los antisueros específicos para otras inmunoglobulinas (IgA, IgM) o las subclases (IgG1 e IgG3, entre otras) existen, pero raramente se utilizan para las pruebas de rutina [46].

Otros métodos para detectar las reacciones antígeno-anticuerpo

Los siguientes métodos representan alternativas a las pruebas tradicionales realizadas en tubo, usando AGH. Algunos métodos no permiten la detección de anticuerpos IgM e IgG, y pueden no aportar información sobre la fase y la temperatura de la reactividad de los anticuerpos, que se obtiene cuando se utilizan pruebas en tubo.

Pruebas de adherencia de células rojas en fase sólida

Las técnicas en microplato usan antígenos o anticuerpos inmovilizados en fase sólida. En una prueba directa, el anticuerpo se fija a los pozos del microplato, luego se adicionan los eritrocitos. Si las células expresan el correspondiente antígeno, ellas se adhieren a las paredes del pozo, si no ocurre reacción antígeno-anticuerpo, las células se van al fondo del pozo formando un botón cuando se centrifugan [47].

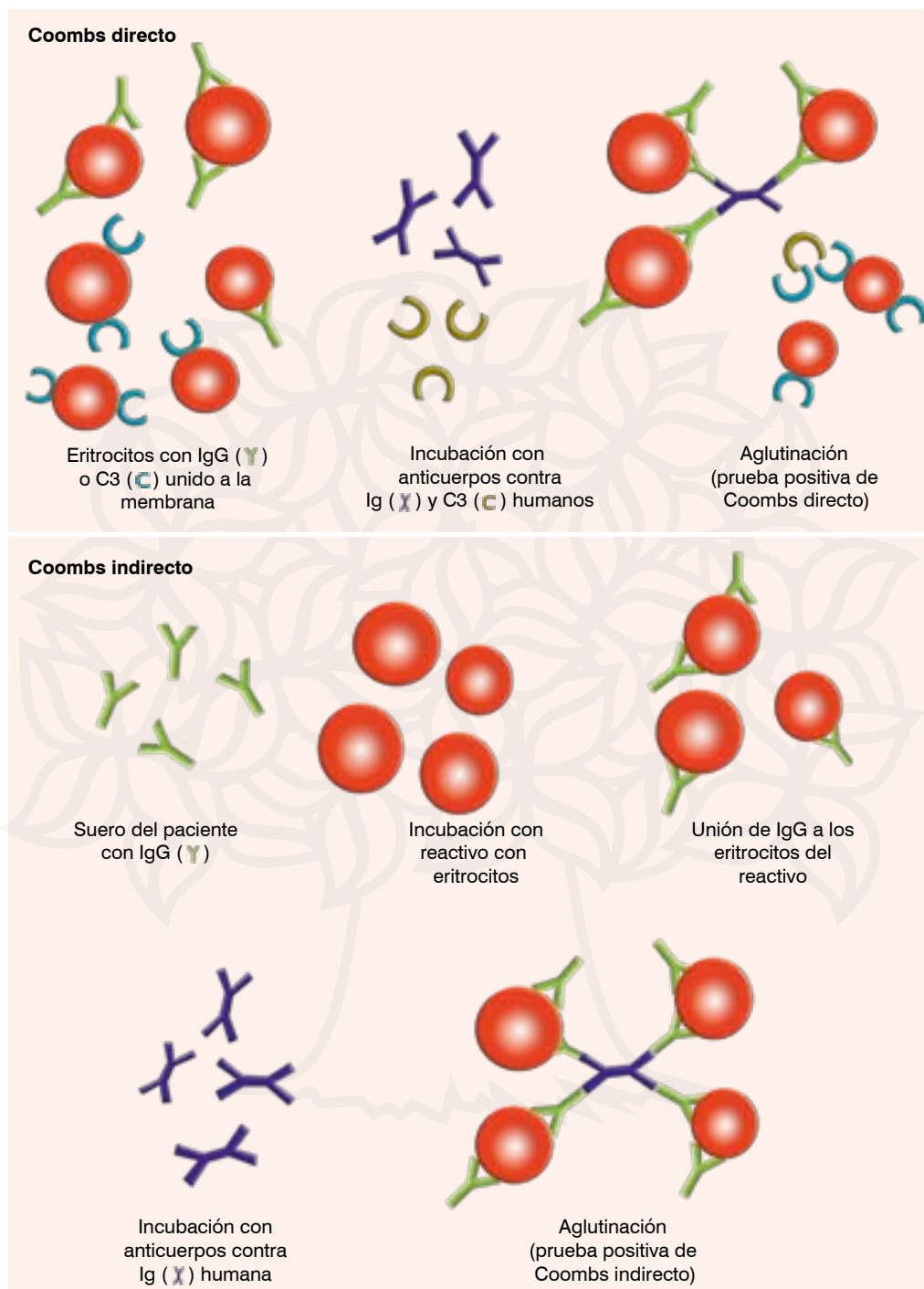


Figura 13. Prueba de antiglobulina o Coombs. El Coombs directo se usa para determinar si hay anticuerpos (IgG) o complemento (C3) unidos a la membrana de los eritrocitos. Los eritrocitos del paciente son incubados con anticuerpos anti-IgG y anti-C3. Si hay presencia de IgG o C3 en la membrana de los eritrocitos, se presenta aglutinación y la prueba es positiva. El Coombs indirecto se usa para detectar si hay anticuerpos IgG en el suero del paciente contra los eritrocitos. El suero del paciente se incuba con el reactivo con eritrocitos. Posteriormente se agrega el suero de Coombs (que contiene anticuerpos anti-IgG). Si hay autoanticuerpos o aloanticuerpos contra los eritrocitos, se presenta aglutinación y la prueba es positiva.

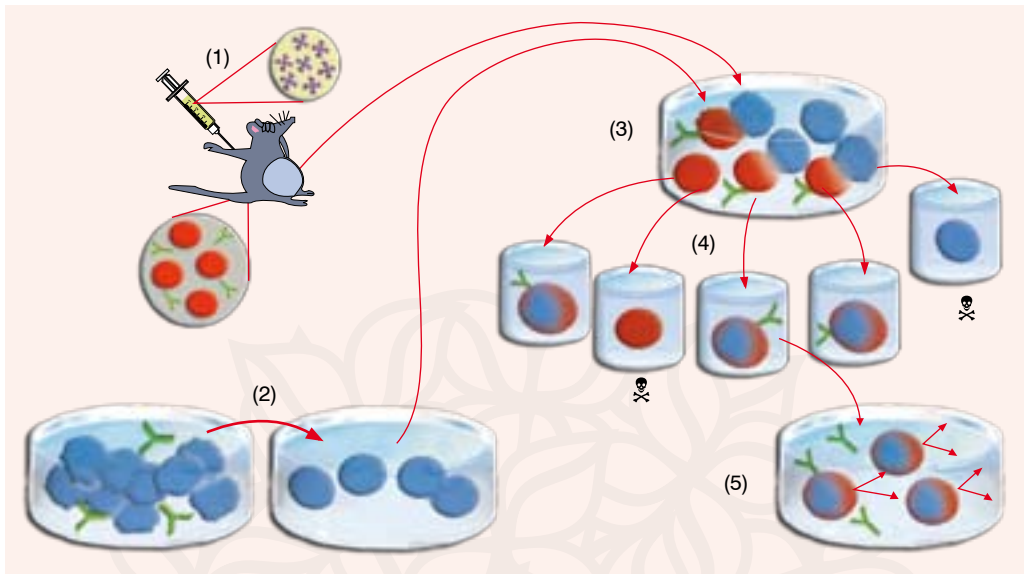


Figura 14. Producción de anticuerpos a partir de hibridomas: (1) El ratón es inmunizado con un antígeno. El bazo del ratón produce células plasmáticas que secretan anticuerpos contra el antígeno; (2) se seleccionan las células de mieloma que no sintetizan anticuerpos ni la enzima hipoxantin-guanin-fosforribosil transferasa (HGPRT); (3) se aíslan las células plasmáticas a partir del bazo del ratón inmunizado, las cuales son mezcladas con las células de mieloma. Se induce la fusión de ambos tipos de células para producir hibridomas; (4) las células son incubadas en medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Las células no fusionadas mueren; (5) se seleccionan los hibridomas que producen anticuerpos específicos contra el antígeno inyectado y se producen en forma masiva.

Tabla 4. Reactivos de antiglobulina humana	
Nombre del reactivo	Definición
Anti-IgG, C3d; poliespecífico	Contiene anti-IgG y anti-C3d (puede contener otros anticuerpos como anti-C3c y anti-inmunoglobulinas)
Anti-IgG	Contiene anti-IgG sin actividad anticomplemento, no necesariamente específico de cadenas gamma
Anti-IgG, cadenas pesadas	Contiene sólo anticuerpos reactivos contra cadenas gamma humanas
Anti-C3b	Contiene sólo anticuerpos C3b sin actividad anti-inmunoglobulina
anti-C3d	Contiene sólo anticuerpos C3d sin actividad anti-inmunoglobulina
Anti-C4b	Contiene sólo anticuerpos C4b sin actividad anti-inmunoglobulina
Anti-C4d	Contiene sólo anticuerpos C4d sin actividad anti-inmunoglobulina

En las pruebas indirectas se utilizan componentes de los eritrocitos, por ejemplo proteínas específicas de membrana, que son fijados al microplato. Posteriormente, se adiciona el suero o plasma problema a los pozos cubiertos con eritrocitos, luego los pozos se lavan para eliminar proteínas no unidas. El indicador para la unión de los anticuerpos es una suspensión de eritrocitos cubiertos con anti-IgG. La reacción es positiva si los eritrocitos se adhieren a las paredes del pozo. Si se forma un botón en el fondo cuando se centrifuga el microplato, se demuestra que no ocurrió reacción antígeno-anticuerpo, como se observa en la **figura 15** [48].

La unión de antígenos o anticuerpos a la fase sólida es una parte integral de otras pruebas tal como la inmovilización específica de anticuerpos monoclonales de antígenos eritrocitarios (MAIEA, del inglés *monoclonal antibody-specific immobilization of erythrocyte antigens*), que será discutida más adelante.

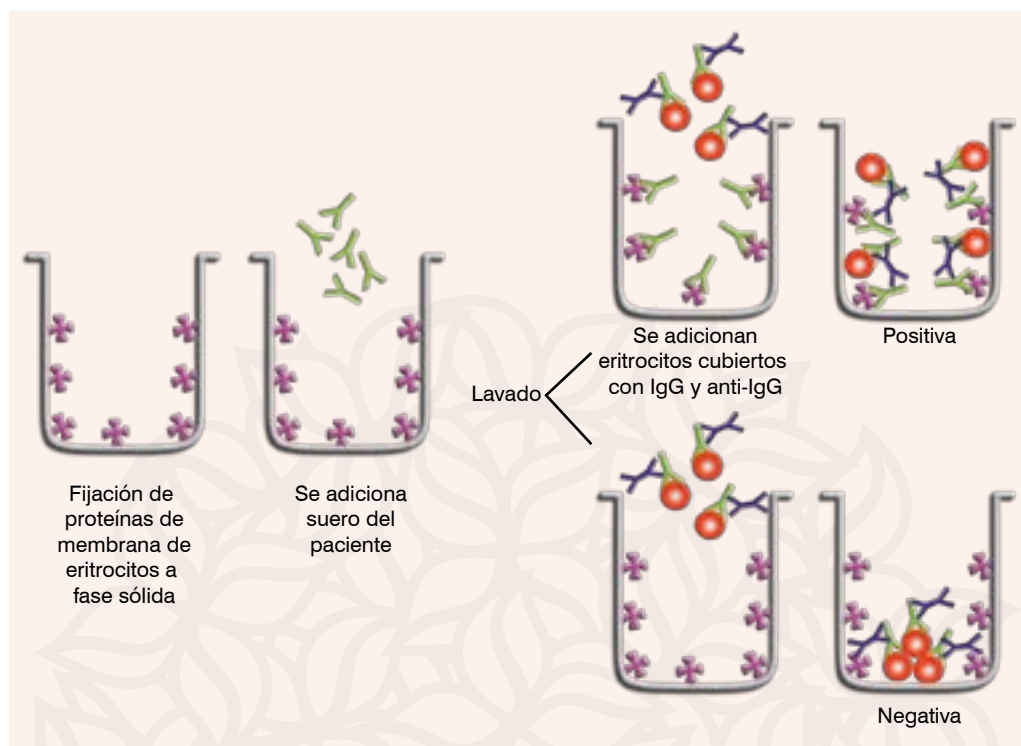


Figura 15. Prueba indirecta de antiglobulina en fase sólida. En una prueba positiva, el reactivo con eritrocitos se observa en las paredes del micropozo. En una prueba negativa, el reactivo con eritrocitos no se une y el botón de células cae al centro del micropozo cuando se centrifuga. Las reacciones débiles dan resultados intermedios.

También se han diseñado sistemas en fase sólida para la detección de anticuerpos antiplaquetarios, pruebas microbiológicas para sífilis, citomegalovirus y antígeno de superficie de la hepatitis B [48-51].

Tecnología de aglutinación en columna

Se han diseñado varios métodos en los cuales los eritrocitos son filtrados a través de una columna que contiene un medio que separa los eritrocitos. Los sistemas comerciales emplean una tarjeta o tira de microtubos, a diferencia de los tubos convencionales. Estos permiten el procesamiento de varias pruebas en forma simultánea. Un espacio o cámara en la parte superior de cada columna se usa para los eritrocitos o para incubar las células y el suero o plasma. Cuando los eritrocitos pasan a través de la columna durante la centrifugación, el medio de la columna separa los eritrocitos aglutinados de los no aglutinados, de acuerdo al tamaño del agregado, como se observa en la **figura 16** [48]. En las pruebas de columna, el botón de células en las pruebas negativas se va para el fondo. En las pruebas positivas, las células son capturadas en la parte superior o en el cuerpo de la columna. Una ventaja de estos sistemas es la estabilidad al final de la reacción, la cual puede ser leída por varias personas, o en algunos casos, documentarla por medio de fotocopiado. Las pruebas de columna tienen generalmente una sensibilidad similar a los métodos de antiglobulina en LISS, pero estas pruebas tienen un menor desempeño en la detección de anticuerpos débiles, especialmente los del sistema ABO [52, 53].

Alternativamente, en algunas pruebas se puede incluir en el medio un antisuero específico o proteínas. Las células que portan el antígeno específico son capturadas selectivamente cuando pasan a través del gel.

En 1986, Lapierre y colaboradores desarrollaron un proceso que llevó esta tecnología al uso de una columna con un gel de partículas [54]. El procedimiento utiliza microtubos que contienen una mezcla del gel, estabilizador y reactivo. Dependiendo de la prueba a realizar, se utiliza un gel neutro que no contiene reactivo (los reactivos se adicionan en la parte superior) o un gel específico que contiene reactivos (por ejemplo suero de antiglobulina o anti-A, B, D, etc.). Una suspensión de eritrocitos (para clasificación sanguínea o para la prueba de antiglobulina directa) o una mezcla de eritrocitos y suero (para la clasificación ABO reversa o para la identificación de anticuerpos) es centrifugada bajo condiciones controladas. En las reacciones negativas, las células rojas pasan a través del gel y se forma un botón rojo en el fondo del tubo, mientras que en las reacciones positivas, los eritrocitos quedan atrapados en el gel, permitiendo que la reacción se pueda leer aun horas después. La prueba es fácil de realizar, sensible y reproducible. Se puede hacer la prueba de antiglobulina sin necesidad de lavar los eritrocitos, por lo tanto se eliminan reacciones inespecíficas y el riesgo por el uso de material contaminado.

Otra tecnología similar a la aglutinación en gel, es el uso de columnas con micropérlas de vidrio en un diluyente. Como en las pruebas con gel, las perlas pueden atrapar las células aglutinadas o antisuero, o también se puede adicionar anti-IgG al diluyente [55].

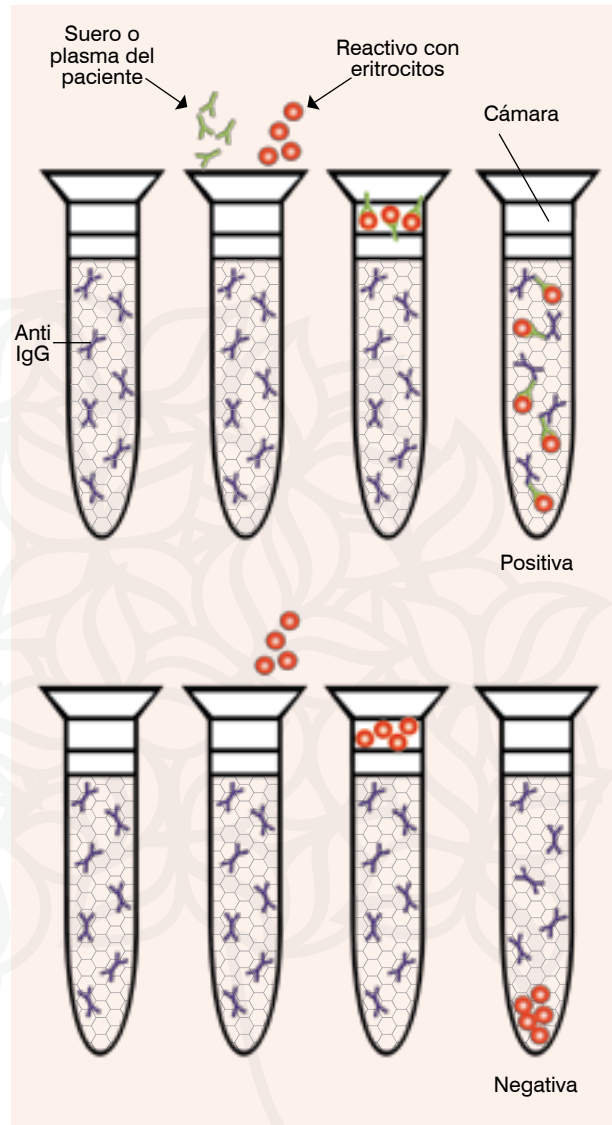


Figura 16. Prueba indirecta de antiglobulina en gel. El gel contiene anticuerpos anti-IgG. Se adiciona el suero o plasma del paciente (que puede o no tener anticuerpos) y el reactivo con los eritrocitos, los cuales son incubados en la cámara antes de centrifugarse la columna. En una prueba positiva, el reactivo con eritrocitos se observa adherido al gel en la columna. En una prueba negativa, el reactivo con eritrocitos no se une y el botón de células cae al fondo de la columna cuando se centrifuga. Las reacciones débiles dan resultados intermedios.

Equipos automatizados

Se han desarrollado varios equipos automatizados para la detección de reacciones antígeno-anticuerpo. Todos los pasos en el procesamiento de las pruebas, desde la separación de las muestras hasta el reporte de los resultados, son hechos por el equipo. Estos equipos permiten la realización de múltiples pruebas, usando tecnología en fase sólida, gel en columna y platos para microtitulación. Los equipos son controlados por un programa de computador, utilizando iden-

tificación de las muestras por medio de código de barras. El equipo se puede integrar al sistema de información del laboratorio para el reporte de los resultados. Estos equipos son muy útiles en instituciones donde se procesan grandes volúmenes de pruebas tanto de donantes de sangre como de pacientes.

Inmunofluorescencia

Las pruebas de inmunofluorescencia permiten la identificación y localización de antígenos por dentro o en la superficie de las células. Un fluorocromo, como la fluoresceína o ficoeritrina, se puede unir a una molécula de anticuerpo, sin alterar su especificidad o su capacidad para unirse al antígeno. La unión del anticuerpo marcado con fluoresceína al antígeno de la célula, hace que la célula cubierta con el anticuerpo aparezca de un color verde amarillo brillante o rojo, dependiendo del fluorocromo.

Los anticuerpos fluorescentes pueden ser usados en procedimientos directos o indirectos, siendo la fluorescencia análoga a la aglutinación como punto final. En las pruebas directas, el anticuerpo marcado con fluoresceína es específico para el antígeno de interés. En la prueba indirecta, antiglobulina marcada con fluoresceína se adiciona a las células que han sido incubadas con un anticuerpo no marcado de especificidad conocida. Recientemente los anticuerpos inmunofluorescentes se han usado en citometría de flujo, para cuantificar la hemorragia feto-materna, para identificar las células transfundidas y medir su vida media en los receptores, para medir niveles bajos de IgG unida a las células y para distinguir la expresión homocigota de la heterocigota de los antígenos de los grupos sanguíneos [56].

ELISA

Las pruebas inmunoabsorbentes ligadas a enzimas o ELISA (en inglés, *enzyme-linked immunosorbent assays*) se usan en banco de sangre para identificar antígenos o anticuerpos. La enzima fosfatasa alcalina se puede unir a moléculas de anticuerpo, sin destruir la especificidad del anticuerpo o la actividad enzimática. Esta prueba se ha usado para detectar y medir IgG unida a las células y así demostrar hemorragia feto-materna. Cuando se examinan eritrocitos, la prueba se denomina prueba de antiglobulina ligada a enzima o ELAT (en inglés, *enzyme-linked antiglobulin test*).

MAIEA

Significa inmovilización específica de anticuerpos monoclonales de antígenos eritrocitarios (MAIEA en inglés por, *monoclonal antibody-specific immobilization of erythrocyte antigens*). En la prueba de MAIEA, los eritrocitos se incuban con dos anticuerpos, uno contiene aloanticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno de grupo sanguíneo y el otro es un anticuerpo no humano (monoclonal de ratón) que reacciona con una porción diferente de la misma membrana proteica. Este método se ha usado principalmente para aislar estructuras de membrana de forma específica, para el estudio de antígenos de grupos sanguíneos [57, 58].

Métodos moleculares

Las técnicas moleculares se han desarrollado como pruebas suplementarias a las técnicas serológicas actuales [59]. Las pruebas de aglutinación, aceptadas como estándar de oro, para la fenotipificación de los grupos sanguíneos, pueden ser poco exactas como en el caso de pacientes multitransfundidos o en pacientes con autoanticuerpos [60]. Además, los antisueros específicos para algunos antígenos de grupos sanguíneos como Dombrock (Do^a, Do^b), Colton (Co^a, Co^b) y los antígenos de baja frecuencia, son escasos [60]. Las pruebas moleculares superan

estas limitaciones. El gen MN (GYPA) fue el primer gen de grupo sanguíneo clonado, en 1986 [61]. Al presente todos los genes de los 30 sistemas han sido identificados y secuenciados. Se han determinado las bases moleculares para todos los polimorfismos de los grupos sanguíneos clínicamente importantes, además de las variantes raras [62]. La asociación de la mayoría de los antígenos de los eritrocitos con polimorfismos de nucleótidos únicos o SNPs (por sus siglas en inglés, *single-nucleotide polymorphisms*), proveen las bases para la detección de la expresión del antígeno por medio de DNA [63]. Aunque estos métodos han permitido la identificación de alelos, aún no son prácticos para realizar a gran escala debido a su complejidad y a que son procedimientos muy laboriosos y poco rápidos para la obtención de los resultados. Además de lo anterior, los resultados de genotipificación por medio de DNA deben ser analizados cuidadosamente, debido a que no siempre reflejan el fenotipo [60]. Sin embargo, recientemente se han desarrollado nuevas técnicas que superan estas dificultades, permitiendo la genotipificación de los grupos sanguíneos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, ya que permite su automatización, flexibilidad en el uso de hardware y rapidez en el tiempo de procesamiento [64].

Las aplicaciones actuales de esta tecnología incluyen:

- Genotipificación fetal en mujeres en embarazo con anticuerpos contra los grupos sanguíneos, para evaluar si el feto está en riesgo de presentar enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido.
- Clasificación sanguínea en pacientes multitransfundidos (anemia hemolítica autoinmune), pacientes dependientes de transfusiones (anemia falciforme, talasemias, anemia aplásica), para proveer sangre con pruebas cruzadas compatibles.
- Definición de variantes del antígeno D.
- Detección de donantes con baja expresión del antígeno D.
- Clasificación de donantes y pacientes cuando no se dispone del antisuero específico.
- Investigación de casos difíciles, especialmente cuando los eritrocitos están cubiertos con inmunoglobulinas.
- Comprobación de que los paneles que se usan para la tamización e identificación de anticuerpos, tengan la dosis de antígenos de acuerdo al fenotipo determinado serológicamente.
- Diagnóstico genético preimplantación.

Abstract: Over 100 years have gone by since the discovery of the A, B, and O blood groups and until today there are 308 recognized antigens, 270 of which are clustered in 30 blood group systems. They are important as they allow blood transfusions with safety by means of simple tests such as the blood group analysis for ABO and Rh, compatibility testing and antibody screening in order to avoid alloimmunization of receptors. These tests, initially developed by Nobel price winner, Karl Landsteiner in 1930, paved the way for the development of today's molecular biology assays that allow genotyping analysis of the fetus in pregnant women who have produced antibodies against blood antigens, blood typing of multiple transfused patients, detection of donors with low expression of D antigen, preimplantation genetic diagnosis, and donor typing polymorphisms of clinical importance, among others. These series begin with the present module describing the genetic and immunological bases of blood groups and intends to take the reader across a

fascinating journey to knowledge, to enjoy the study of blood typing, its antigens and antibodies, and their clinical importance. In the upcoming modules, hemolytic disease of the fetus and the newborn, hemolytic anemia diagnostic tests, transfusion reactions analysis, immunohematologic assays and their correct interpretation in order to provide appropriate elements for the proper clinical and surgical management of patients. Finally, serological studies of leukocytes and platelets will be addressed, as well as the laboratory assays and their clinical importance.

Key words: blood groups, leukocytes, platelets, genetics, immunology, blood bank, transfusion medicine.

García-Arbeláez CA. Fundamentals of blood banking and transfusion medicine . Medicina & Laboratorio 2009; 15: 37-68.

Module 22 (Blood bank), number 2. Editora Médica Colombiana S.A., 2009®

Received on January 19, 2009; accepted on January 23, 2009.

Bibliografía

1. **Landsteiner K.** Zur kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden wirkungen des blutserums und der lymph. Zentrabl Bakeriol 1900; 27: 361.
2. **Landsteiner K.** On agglutination of normal human blood. Transfusion 1961; 1: 5-8.
3. **Oberman HA.** The history of blood transfusion. In: Petz LD, Swisher SN, eds. Clinical practice of blood transfusion. New York; Churchill Livingstone. 1981.
4. **Greenwalt TJ.** A short history of transfusion medicine. Transfusion 1997; 37: 550-563.
5. **Hektoen L.** Iso-agglutination of human corpuscles. JAMA 1907; 48: 1739-1740.
6. **Ottenberg R.** Studies in isohemagglutination, I: transfusion and the question of intravascular agglutination. J Exp Med 1911; 13: 425-438.
7. **Landsteiner K, Levine P.** Further observations on individual differences of human blood. Proc Soc Exp Biol Med 1927; 25: 941.
8. **Levine P.** An inusual case of intra-group agglutination. JAMA 1939; 113: 126-127.
9. **Nobel Lectures.** Physiology or Medicine 1922-1941. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1965.
10. **McCullough J.** Transfusion Medicine. 1st ed. Minneapolis, Minnesota USA: McGraw-Hill; 1998.
11. **Coombs RRA, Mourant AE, Race RR.** A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Br J Exp Pathol 1945; 26: 225.
12. **Kay AB.** Professor Robin Coombs FRS (1921-2006). Vox Sang 2006; 91: 93-94.
13. **American Association of Blood Banks.** Technical manual. 15th ed. Bethesda, Maryland, USA; 2005.
14. **Zelinski T.** Chromosomal localization of human blood group genes. In: Silberstein LE, ed. Molecular and functional aspects of blood group antigens. Bethesda, MD, USA 1995: 41-73.
15. **Storry JR, Olsson ML.** Genetic basis of blood group diversity. Br J Haematol 2004; 126: 759-771.
16. **Allen FH.** Null types of the human erythrocyte blood groups. Am J Clin Pathol 1967; 66: 467.
17. **Mohr J.** A search for linkage between the Lutheran blood group and other hereditary characters. Act Path Microbiol Scand 1951; 28:
18. **Crawford NM, Greenwait TJ, Sasaki T.** The phenotype Lu (a-b-) together with unconventional Kidd groups in one family. Transfusion 1961; 1: 228-232.
19. **Petz LD, Swisher SN, Kleinman S, Spence RK, Strauss RG.** Clinical practice of transfusion medicine. Blood groups. 3rd ed. New York, NJ, USA. Churchill Livingstone Inc;1996.
20. **Araszkiewicz P, Szymanski IO.** Quantitative studies on the Rh-antigen D. Effect of the C gene. Transfusion 1987; 27: 257-261.
21. **Gjertson D.** Standards for parentage testing laboratories. 4th ed. Bethesda, MD. AABB; 2004.

22. **Daniels G, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, et al.** International Society of Blood Transfusion Committee on terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sang* 2009; 96: 153-156.
23. **Garratty G, Dzik W, Issitt PD, Lublin DM, Reid ME, Zelinski T.** Terminology for blood group antigens and genes-historical origins and guidelines in the new millennium. *Transfusion* 2000; 40: 477-489.
24. **Organización Mundial de la Salud.** Sangre y sus componentes seguros. Grupos sanguíneos, Módulo 3. Ginebra; 1993.
25. **Daniels G, Brmilow I.** Essential guide to blood groups. 1st ed. Blackwell Publishing, Oxford; 2007.
26. **Murphy M, Pamphilon D.** Practical transfusion medicine. Human blood group systems. 1st ed. Blackwell Science, Oxford; 2001.
27. **Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M.** Blood transfusion in clinical medicine. 9th ed. Blackwell Scientific, Oxford; 1993.
28. **Economidou J, Hughes-Jones NC, Gardner B.** Quantitative measurements concerning A and B antigen sites. *Vox Sang* 1967; 12: 321-328.
29. **Doinel C, Ropars C, Salmon C.** Quantitative and thermodynamic measurements on I and i antigens of human red blood cells. *Immunology* 1976; 30: 289-297.
30. **Masouredis SP, Sudora EJ, Mahan L, Victoria EJ.** Antigen site densities and ultrastructural distribution patterns of red cell Rh antigens. *Transfusion* 1976; 16: 94-106.
31. **Masouredis SP, Sudora E, Mahan LC, Victoria EJ.** Immunoelectron microscopy of Kell and Cellano antigens on red cell ghosts. *Haematologia (Budap)* 1980; 13: 59-64.
32. **Salmon C, Cartron JP, Rouger PH.** Human blood groups. Masson Publishing USA, New York; 1984.
33. **Giblett ER.** Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. *Transfusion* 1977; 17: 299-308.
34. **Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moehr J, et al.** Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1990; 76: 1431-1437.
35. **Cox JV, Steane E, Cunningham G, Frenkel EP.** Risk of alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Arch Intern Med* 1988; 148: 2485-2489.
36. **Davies SC, McWilliam AC, Hewitt PE, Devenish A, Brozovic M.** Red cell alloimmunization in sickle cell disease. *Br J Haematol* 1986; 63: 241-245.
37. **Ramsey G.** Antibodies and the new immunology. *Lab Med* 1994; 25: 90-94.
38. **Reid ME, Lomas-Francis C.** Blood group antigen facts book. San Diego, Academic Press; 1996.
39. **Brecher ME.** Technical Manual. 14th ed. Bethesda, MD. American Association of Blood Banks; 2002.
40. **Moulds JM, Moulds JJ.** Blood group associations with parasites, bacteria, and viruses. *Transfus Med Rev* 2000; 14: 302-311.
41. **Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK.** Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 1975; 189: 561-563.
42. **Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH.** The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976; 295: 302-304.
43. **Rudmann SV.** Textbook of blood banking and transfusion medicine. 1st ed. Philadelphia, PA, USA. WB Saunders Company; 1995.
44. **Nance SJ, Garratty G.** A new potentiator of red blood cell antigen-antibody reactions. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 633-635.
45. **Issitt PD, Anstee DJ.** Applied blood group serology. 4th ed. Durham, NC. Montgomery Scientific Publications; 1998: 47-8.
46. The code of Federal regulations. Title 21 CFR 660. Washington, DC, US. Government Printing Office.
47. **Rolih SD, Eisinger RW, Moheng MC, Dean WD, Eatz RA.** Solid phase adherence assays: Alternatives to conventional blood bank tests. 1985; 16: 766-770.
48. **Walker P.** New technologies in transfusion medicine. *Lab Med* 1997; 28: 258-262.
49. **Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM, Beck ML, Coenen WM, Bayer WL.** A solid phase antibody screen. *Am J Clin Pathol* 1984; 82: 719-721.
50. **Rachel JM, Sinor LT, Beck ML, Plapp FV.** A solid-phase antiglobulin test. *Transfusion* 1985; 25: 24-26.
51. **Sinor LT.** Advances in solid-phase red cell adherence methods and transfusion serology. *Transfus Med Rev* 1992; 6: 26-31.
52. **Malyska H, Weiland D.** The gel test. *Lab Med* 1994; 25: 81-85.
53. **Phillips P, Voak D, Knowles S, Campbell G, Crane B, Downie DM, et al.** An explanation and the

- clinical significance of the failure of microcolumn tests to detect weak ABO and other antibodies. *Transfus Med* 1997; 7: 47-53.
54. **Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, et al.** The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 1990; 30: 109-113.
55. **Reis KJ, Chachowski R, Cupido A, Davies D, Jakway J, Setcavage TM.** Column agglutination technology: the antiglobulin test. *Transfusion* 1993; 33: 639-643.
56. **Garratty G, Arndt P.** Applications of flow cytometry to transfusion science. *Transfusion* 1995; 35: 157-178.
57. **Petty AC.** Monoclonal antibody-specific immobilisation of erythrocyte antigens (MAIEA). A new technique to selectively determine antigenic sites on red cell membranes. *J Immunol Methods* 1993; 161: 91-95.
58. **Petty AC, Green CA, Daniels GL.** The monoclonal antibody-specific immobilization of erythrocyte antigens assay (MAIEA) in the investigation of human red-cell antigens and their associated membrane proteins. *Transfus Med* 1997; 7: 179-188.
59. **Reid ME.** Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion* 2003; 43: 1748-1757.
60. **Westhoff CM.** Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 471-475.
61. **Daniels G.** Human Blood Groups. 2nd ed. Blackwell Science, Oxford; 2002.
62. **Daniels G.** Red Cell Blood Grouping by Molecular Genetics. *CPD News* 2008; 26: 4-5.
63. **Cavanagh G.** Red blood cell antigen genotyping using Bioarray Solutions BeadChip DNA Microarray. *Quest Biomedical* 2008; 88: 15-17.
64. **Polin H, Danzer M, Proll J, Hofer K, Heilinger U, Zopf A, et al.** Introduction of a real-time-based blood-group genotyping approach. *Vox Sang* 2008; 95: 125-130.



Piranga o abejero. *Piranga rubra*
Juan Alonso Restrepo Isaza