



PALABRAS CLAVE:

Prueba de antiglobulina directa, donantes de sangre, Inmunohematología, Banco de Sangre.

Significado clínico y laboratorio de la prueba de antiglobulina directa positiva en donantes de sangre: implicaciones y reporte de casos

Dr. César Cerdas-Quesada *

Introducción

La prueba de antiglobulina es la técnica más utilizada en inmunohematología y fue primeramente descrita como un ensayo para detectar aloanticuerpos no aglutinantes en suero; posteriormente se conocería como prueba de antiglobulina indirecta.¹ En 1946, se usó la prueba para detectar anticuerpos anti-Rh en los glóbulos rojos de recién nacidos con enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido.² Posteriormente, el uso se extendió incluso a maneras inapropiadas. El uso más apropiado se da en pacientes con anemia hemolítica con una etiología inmune en estudio, pero no es recomendado en pruebas de tamizaje en pacientes.

Esta prueba detecta, como mínimo, entre 200 y 500 moléculas de IgG, 120 moléculas de IgA y 30 moléculas de IgM por eritrocito. La máxima intensidad de aglutinación se alcanza cuando recubren a los eritrocitos más de 700 moléculas de IgA o más de 100 moléculas de IgM.^{3,4}

La repercusión clínica del resultado de la prueba de antiglobulina directa (PAD) es un tema de estudio, debido al hallazgo de casos clínicos con PAD intensamente positiva con hemólisis ligera, así como de otros con PAD débil positiva e incluso negativa con anemia grave. Múltiples factores se invocan en relación con la intensidad de la hemólisis.

EN RESUMEN

La prueba de antiglobulina es la técnica más utilizada en inmunohematología y detecta, como mínimo, entre 200 y 500 moléculas de IgG, 120 moléculas de IgA y 30 moléculas de IgM por eritrocito. La máxima intensidad de aglutinación se alcanza cuando recubren a los eritrocitos más de 700 moléculas de IgA o más de 100 moléculas de IgM. En este informe se describen varios casos controversiales donde dicha prueba adquiere un significado ambiguo, incluso en algunos casos donde podría interferir con el reporte de resultados e incluso de entrega de unidades de hemocomponentes.

ABSTRACT

The antiglobulin test is the most used technique in immunohematology and detects at least between 200 and 500 molecules of IgG, IgA molecules 120 and 30 molecules per erythrocyte IgM. Maximum intensity is achieved when agglutination of erythrocytes coated with more than 700 molecules over 100 IgA or IgM molecules. This report describes several controversial cases where the test becomes ambiguous meaning in some cases may interfere with the reporting of results and even delivery of units of blood products.

* División de Inmunohematología y Banco de Sangre Hospital La Católica, San José, Costa Rica; e-mail: cesar.cerdas@hotmail.com

sis, tales como: la detección de autoanticuerpos de varios isotipos, las subclases de IgG presentes y la función del sistema mononuclear fagocítico de los pacientes, entre otros.^{5,6}

Del 1 al 15% de los pacientes hospitalizados y del 0.01% al 0.1% de los donantes han sido reportados con PAD positivas.^{7,8} Muchas de estas PAD podrían ser positivas debido a las uniones no específicas de IgG del plasma.⁹ En donantes aparentemente sanos un resultado de PAD positivo puede estar asociado con autoanticuerpos sin ninguna evidencia de hemólisis inmune. Está documentado que altos niveles de IgG sérica se asocian con un incremento en la cantidad de IgG citofílicas (asociaciones no inmunológicas) presentes en los glóbulos rojos. Niveles

normales de IgG citofílicas, y en particular la manera no específica en la cual están unidos a los eritrocitos (la porción Fc no completamente disponible para la unión con la anti-IgG), pueden ser detectados mediante las técnicas tradicionales.^{10,11} Varios reportes indican que del 65 al 80% de las muestras con PAD positiva presenta eluidos no reactivos, lo cual sugiere que no hay anticuerpos presentes en el glóbulo rojo.⁹

La proporción de PAD positiva es más alta en los donadores mayores y se han asociado varios factores de riesgo, como por ejemplo los anticuerpos anticardiolipinas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, drogas o fármacos, cáncer, hipergammaglobulinemia, tumores sólidos, entre otros.¹²

REPORTE DE CASOS

INCIDENCIA DE DONANTES CON PAD POSITIVA EN LAS PRUEBAS INICIALES

Se analizaron 1950 muestras de 1950 donaciones con una edad promedio de 35 ± 9 años. De estos donadores, 1002 fueron hombres y 948 mujeres. Se les realizó un hemograma completo y se excluyó a individuos con VDRL reactivo o ID-PaGIA Syphilis positivo. Se realizó una prueba de antiglobulina directa (PAD) con tarjetas de gel DC-Screening II (IgG, C3d, cti BioRad). Todos los resultados positivos fueron analizados posteriormente con la tarjeta de gel DC-Screening I (IgG, IgA, IgM, C3c, C3d, cti BioRad). Tres PAD positivas de 1950 donadores fueron analizadas en los últimos dos años. Los donantes no refirieron estar tomando medicamentos y presentaron una entrevista predonación normal, al igual que una presión sanguínea y de temperatura. Las muestras fueron detectadas durante las pruebas de tamizaje del donante. Al 100% de los donantes se le realiza la PAD como parte de la batería de estudios para validar la donación en nuestro banco de sangre. Dos muestras reaccionaron fuertemente en el gel IgG (1 eluato positivo) y una reaccionó moderadamente contra el C3d (eluato negativo). Las pruebas con anti-IgM e -IgA resultaron negativas. Los eluatos fueron moderadamente reactivos. No se encontró especificidad (amplia) de los anticuerpos encontrados. A los donantes se les da seguimiento cada seis meses durante al menos 24 meses y, a la fecha, no existe causa aparente para estos hallazgos. Ninguno de los donadores ha mostrado señales de hemólisis y las pruebas de función hepática y hemograma se encontraron dentro de los rangos de referencia.¹³

DONADORES SIN MEDICAMENTOS:

Se determinó un resultado positivo en la PAD de cinco donadores de sangre (mujeres de 25, 33, 34 y 58 años) de un total de 5572 donantes, es decir un 0.089% que interfirió con las pruebas de compatibilidad en pacientes con rastreos de anticuerpos irregulares negativos. Ningún donador refirió estar tomando medicamentos en la entrevista predonación ni en la consulta telefónica posterior.

En el primer caso, los glóbulos rojos fueron despachados en situación de emergencia sin pruebas pretransfusionales a un paciente que ingresó con herida de arma de fuego. El RAI y las pruebas de compatibilidad se realizaron de inmediato, dando como resultado una incompatibilidad y un RAI negativo; se dio aviso al quirófano, decidiendo suspender la transfusión con esta unidad.

En el segundo, tercero y cuarto caso, las unidades fueron descartadas por PAD positiva.

En el quinto caso, los glóbulos rojos también fueron enviados en situación de emergencia; no obstante, esta unidad fue transfundida en su totalidad sin causar alguna reacción transfusional al paciente, al igual que la unidad correspondiente al cuarto caso.

ANTIGLOBULINA DIRECTA POSITIVA POSTALMACENAMIENTO

Se analizaron 72 unidades que vencieron a los 35 días de almacenamiento. Todos los donantes presentaron una PAD negativa en la muestra empleada para hacer las pruebas de tamizaje. La prueba de antiglobulina indirecta también fue negativa en todas las muestras. Se realizó una prueba de antiglobulina directa (PAD) con tarjetas de gel DC-Screening I (IgG, IgA, IgM, C3c, C3d, cti BioRad). Los ensayos en gel fueron realizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, 50 μ L de una suspensión de glóbulos rojos al 0.8% en LISS (ID-Diluent 2) fue agregado en la celda de cada microtubo de la tarjeta. Las tarjetas se centrifugaron a 1030 rpm por 10 minutos usando la ID-Centrifuge 12SII. Las reacciones de aglutinación fueron clasificadas como fuertemente positivas (4+ y 3+), moderadamente positivas (2+ y 1+) y positivo débil (w+).¹³ Un 95% de las unidades presentó PAD positiva a los 35 días de almacenamiento (Fig. 1), del donde 63 unidades tuvieron C3c positivo, tres por IgG y dos por IgG y C3d. Hubo variabilidad en las reacciones de aglutinación entre 1-3+. No se observó relación entre la reacción de aglutinación y el porcentaje de hemólisis, pero las PAD positivas por IgG fueron las que presentaron mayor porcentaje de hemólisis.

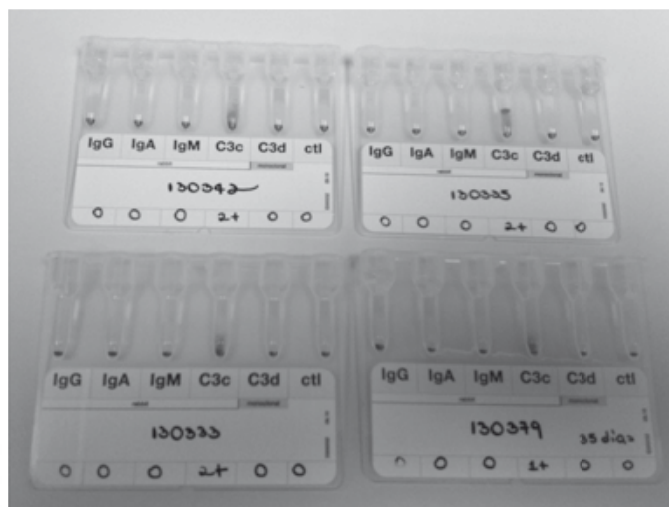


Figura 1. Evaluación de la prueba de antiglobulina directa (PAD) de las unidades de glóbulos rojos empacados a los 35 días de almacenamiento en el Banco de sangre.

IgG CITOFÍLICA

Se realizó una prueba pretransfusional (grupo ABO/D y rastreo de anticuerpos irregulares) a un paciente para cirugía histerectomía total abdominal y se le reservaron dos unidades de glóbulos rojos empacados (GRE). El rastreo de anticuerpos irregulares (RAI) se reportó negativo, pero hubo reacción de 1+ con una de las unidades en la prueba de compatibilidad. La prueba de antiglobulina directa del paciente es negativa. Las de antiglobulina directa (PAD) e indirecta (PAI) son negativas en el estudio posdonación. Se le realizó una PAD a la unidad y el resultado fue IgG1+. Posteriormente, se incubó la muestra de los GRE a 37°C por 15 minutos y se repitió la PAD. El resultado obtenido luego de la incubación fue negativo.

Discusión

Los resultados de las pruebas de antiglobulina revelan la naturaleza inmune de un episodio hemolítico. En la PAD, un resultado fuertemente positivo de un reactivo de antiglobulina poliespecífico y monoespecífico demostró la presencia de anticuerpos y fracciones del complemento capaces de causar hemólisis.¹⁴

Una PAD positiva ocurre ocasionalmente en donadores normales, y en algunos casos se descubre cuando los glóbulos rojos empacados del donador son incompatibles en la prueba de compatibilidad. En la mayoría de los casos, el seguimiento por largos períodos no ha revelado condición clínica relacionada con la PAD positiva.¹⁵

El aumento en la incidencia de las PAD positivas entre los donadores de sangre puede ser atribuida a la alta sensibilidad de los métodos utilizados en la actualidad, especialmente las técnicas en gel. Si no

existe evidencia de hemólisis inmune, no son necesarios estudios más detallados, a menos que el paciente requiera de una transfusión de glóbulos rojos y el suero contenga anticuerpos irregulares no identificados, en cuyo caso un eluido puede ser de utilidad para identificar el o los anticuerpos.¹⁶

Debido a la baja incidencia de la PAD positiva (tres en 1950), la magnitud del problema parece pequeña; sin embargo, hay que tomar en cuenta que en muchos laboratorios estas unidades son regularmente detectadas durante las pruebas de compatibilidad, incluso en situaciones de emergencia, y que dicho teste puede realizarse con una centrifugación inmediata, la cual no podría detectar donadores PAD positivo dada la sensibilidad de la prueba (las pruebas en gel son tres diluciones más sensibles que las de tubo). Hay que tomar en cuenta que muchos laboratorios usan de rutina la prueba rápida de compatibilidad la cual no podría detectar a los donadores PAD positiva. Por otro lado, una PAD positiva puede ser benigna y relacionada con la edad, pero también podría significar una enfermedad autoinmune.¹⁵

La mayoría de los hospitales reciben unidades que no son tamizadas por lo que no identificarían a los donadores PAD positiva. De ser aceptadas, se ha reportado que un 72% de las unidades tiene una sobrevivencia reducida. Por otro lado, se ha reportado que las unidades con PAD positiva en donantes de sangre pueden considerarse como un resultado falso positivo: después de 15 días de almacenamiento, el 16% desarrolla una PAD positiva *in vitro*, y cerca del día 24, 91% presenta una prueba positiva. Esto parece tener su explicación en un fenómeno *in vitro*, debido a la unión inespecífica de IgG plasmática, por lo que el resultado positivo puede revertirse con la suspensión de glóbulos rojos de los donadores en solución salina pH 6.8 o solución de Alsever. A los 35 días de almacenamiento, más de 90% de las unidades presenta una PAD positiva principalmente por complemento (C3c).^{16,17}

Bibliografía

1. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. Detection of Peak and incomplete Rh agglutinins: a new test. *Lancet* 1945; II: 15-16.
2. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. *In vivo* isosensitisation of red cells in babies with haemolytic disease. *Lancet* 1946; II: 264-6.
3. Bencomo-Hernández A, Alfonso-Valdés ME. Detección de anticuerpos IgA e IgM en la prueba de antiglobulina (Coombs). *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2010; 26:4-10.
4. Bencomo A, Alfonso M, Valdés O, Alfonso ME. Quantitation of red cell-bound IgG, IgA, and IgM in patients with autoimmune hemolytic anemia and blood donors by enzyme-linked immunosorbent assay. *Immunohematology* 2003;19:47-53.
5. Garraty G. The James Blundell Award Lecture 2007: Do we really understand immune red cell destruction? *Transf Med* 2008; 18:321-34.
6. Bencomo-Hernández A, Alfonso-Valdés ME, Ávila-Cabrera OM, Espinosa-Martínez E, Jaime-Fagundo JC, Hernández-Ramírez. Relación entre hemólisis con la presencia y cuantificación de inmunoglobulinas en hematíes, en la anemia hemolítica autoinmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2010; 26
7. Garraty G. The clinical significance (and insignificance) of red blood cell bound IgG and complement. En Wallace ME, Levitt JS.(eds). *Current applications and Interpretation of the Direct Antiglobuline Test*. Arlington, VA: American Association of Blood Banks, 1988:1-24.
8. Garraty G. The significance of IgG on the RBC surface. *Transfus Med Rev* 1987; 1:47-57.
9. Toy P, Chin CA, Reid ME. Factors associated with positive direct antiglobuline tests in pretransfusion patients. A case-control study. *Vox Sang* 1975; 1:47-57.
10. De Figueiredo M, Lima M, Morais S, Porto G, Justicia B. The gel test: some problems and Solutions. *Transf Med* 1992; 2:115-8.
11. Shanwell A, Sallander S, Bremme K, Westgren M. Clinical evaluation of a solid-phase test for red cell antibody screening of pregnant women. *Transfusion* 1999; 39: 26-31.
12. Rottenberg Y, Yahalom V, Shinar E, Barchana M, Adler B, Paltiel O. Blood donors with positive direct antiglobulina tests are at increased for cancer. *Transfusion* 2009; 49: 838-843.
13. Cerdas-Quesada C, Balaguera, A. Incidencia de donaciones de sangre con prueba de antiglobulina directa positiva. *Revista Argentina de Transfusión* 2012; 38:215-216.
14. Martinengo M, Ardenghi DF, Tripodi G, Reali G. The first case of drug-induced immune hemolytic anemia due to hydrocortisone. *Transfusion* 2008;48:1925-9.
15. Bellia M, Georgopoulos J, Tseveris V, Nomikou E, Vgontza N, Kontopoulou-Griva I. The investigation of the significance of a positive direct antiglobulin test in blood donors. *Immunohematology* 2002; 18:78-81.
16. Marsh WL. Scoring of hemagglutination reactions. *Transfusion* 1972; 12:352-3.
17. Cerdas-Quesada C. La Prueba de Antiglobulina Directa: el dilema entre lo clínicamente significativo y lo no significativo. *Revista Argentina de Transfusión* 2013; 39:55-61.