



# Taller de Inmunohematología

## CD y AT positivos en el laboratorio

1. QFB Javier Bautista Juárez, Unidad de Terapia Celular y Banco de Sangre del Centro Médico “American British Cowdray” (ABC). Vocal de Comunicación de la AMMTac. [jbautistaj@abchospital.com](mailto:jbautistaj@abchospital.com)
2. QFB Catalina Arévalo Hernández, Química Adscrita al Laboratorio de Inmunohematología del Banco Central de Sangre del CMN SXXI IMSS. [catherinkah@gmail.com](mailto:catherinkah@gmail.com)
3. QFB Rocío Castillo Trigueros. Subdirector Técnico de Instituto LICON. [Rocio.castillo@licon.com.mx](mailto:Rocio.castillo@licon.com.mx)

## Objetivo

Los talleres en el área de inmunohematología tienen la función de actualizar tanto la práctica como la teoría para los congresistas, por lo que es necesario dejar plasmada la información para su consulta. En este resumen, el tema es el entendimiento y resolución de casos que en la práctica presentan resultados positivos en las pruebas de Coombs directo o el AutoTestigo positivo, por lo que es de vital importancia relacionar estos dos puntos (CD y AT) y aclarar sus similitudes y diferencias.

Los profesores de este taller les presentamos la información teórica de dichas situaciones, casos clínicos representativos de estos problemas, así como algunas técnicas accesibles para la elución de la reacción Antígeno-Anticuerpo y posterior identificación del anticuerpo presente que se puede realizar en cualquier laboratorio de inmunohematología, con lo que se busca facilitar y hacer más accesible la práctica.

## Antecedentes

La prueba de AutoTestigo (AT) se entiende como la prueba del laboratorio en la cual se agrega suero del paciente y eritrocitos extraídos de él mismo con el fin de detectar autoanticuerpos, anticuerpos contra la sangre transfundida y aquellos que se encuentren mezclados con los del paciente, o como en la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), buscar anticuerpos transferidos por la madre contra eritrocitos

del paciente. Esta reacción se puede detectar de manera directa, es decir, sin incubar las muestras, o mediante la inducción de la reacción anticuerpo-antígeno haciendo una incubación por tiempos preestablecidos y temperaturas específicas dependiendo del anticuerpo que se desea encontrar.

La prueba de Coombs directa (CD) o prueba de antiglobulina directa (PAD) se remonta a la década de 1940, cuando a los recién nacidos con ictericia se les tomaba una muestra que se lavaba y ponía en contacto con el suero de Coombs (recién descubierto en ese tiempo) para detectar anticuerpos pegados al eritrocito durante el tiempo de gestación.

El Coombs indirecto, en aquellos años, se realizaba poniendo en contacto (indirectamente para saber el pronóstico del feto) el suero de la madre y eritrocitos del padre, con el fin de predecir la EHRN. Hay que recordar que en aquellos años no existían los paneles de células con lo que en la actualidad se dispone para la búsqueda de anticuerpos, por lo que esta práctica era común para un pronóstico de probable inmunización.

Por otro lado, sabemos que se denominan anticuerpos incompletos a aquellos que no aglutinan los eritrocitos suspendidos en medio salino. Coombs introdujo a la práctica clínica la prueba de la antiglobulina directa para detectar la sensibilización de eritrocitos *in vivo* (como en la enfermedad hemolítica del recién nacido), reacciones transfusionales y/o inmunización por medicamentos. Cabe mencionar, que los diferentes reactivos de antiglobulina que existen en

la Inmunohematología son de utilidad para poner de manifiesto anticuerpos IgG, IgA e IgM sobre los eritrocitos, y para detectar distintos componentes del complemento (C4c, C4d, C3c, C3d, C5 y C6) que sirvan de modo mono-específico o poli-específico (mezcla).

De algunos años a la fecha, es posible emplear estos sueros incluso en tarjetas con gel con una buena sensibilidad.

Para detectar aloanticuerpos mediante la prueba indirecta de antiglobulina, es indispensable disponer de anti-IgG, en concentración de 20ug/mL; la presencia de anti-IgM o anti-IgA no es estrictamente necesaria. Se han descrito también, muchos casos de anticuerpos que podrían detectarse sólo con anti-complemento, en especial por medio de uso de anti-C3d a una concentración de 3ug/mL.

Es raro que se requiera de anti-IgA junto al anti-IgG para detectar la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) por medio de la prueba directa de antiglobulina. Los principales componentes del complemento que encontramos en estos pacientes son C3d y C4d, por lo que se hace más accesible tener en el laboratorio anti-IgG + anti-C3d. En la práctica habitual el anti-C3d sólo es suficiente para comprobar la presencia de complemento en los eritrocitos *in vivo* en los cuales se sospecha de una reacción reciente.

### Técnica de las pruebas de antiglobulina

En la prueba directa (PAD o CD), los eritrocitos recién obtenidos del paciente se lavan y ponen en contacto con un reactivo antiglobulina y/o anticomplemento con el fin de observar si existió una reacción reciente en el individuo en estudio. Es importante recalcar que la prueba debe realizarse lo más pronto posible para evitar la destrucción de los eritrocitos por la reacción y activación del complemento.

En la prueba indirecta (PAI o CI) de antiglobulina, los eritrocitos se incuban con suero para facilitar la fijación del anticuerpo y en algunos casos del complemento durante un tiempo y temperatura adecuados para el anticuerpo que se desea detectar. Acto seguido, se lavan y estudian con un reactivo antiglobulina y/o anticomplemento, con posterior control de la prueba con eritrocitos sensibilizados.

### Anemias hemolíticas

En cuanto a la AHAI, se trata de un tipo de anemia adquirida producida por la acción de los anticuerpos que reaccionan contra los propios eritrocitos del paciente (autoanticuerpos), lo que conduce a su destrucción.

Los tipos de AHAI se pueden clasificar, según los estudios de laboratorio, en:

- AHAI causada por anticuerpos calientes (IgG)
- AHAI causada por anticuerpos fríos (IgM)
- AHAI causada por anticuerpos mixtos (IgG e IgM)
- AHAI causada por hemoglobinuria paroxística a frigore

- La **AHAI causada por anticuerpos calientes** es mediada por autoanticuerpos que reaccionan de forma óptima a 37°, la mayoría son IgG1 o IgG3 y es raro que estén implicados los IgM o IgA capaces de reaccionar a 37°. Lo habitual es que se produzca una hemólisis extravascular en el sistema retículo endotelial.
- La **AHAI causada por anticuerpos fríos** es mediada por autoanticuerpos que reaccionan a temperaturas bajas, idealmente a 4°C. El grado de anemia depende del grado de exposición al frío. En estos casos, las muestras de sangre pueden presentar auto aglutinación a temperatura ambiente (22 a 25°C), lo cual dificulta la realización de frotis o conteos celulares. La autoaglutinación se intensifica a 4°C y se revierte al calentar la muestra a 37°C. En la mayoría de los pacientes, los anticuerpos encontrados son IgM que inducen a la fijación del complemento sobre los eritrocitos.
- La **AHAI mixta** es causada tanto por IgG como por IgM, además de complemento pegado al eritrocito del propio paciente. Los anticuerpos IgM suelen presentar un título de hasta 1:64 a 4°C. El Coombs directo (poli-específico) es positivo para IgG y C3d, y en el extracto se encuentra el autoanticuerpo IgG esperado.
- En el caso de la **hemoglobinuria paroxística a frigore**, la cual representa menos del 1% de los casos de AHAI, los auto-anticuerpos relacionados son IgG que reaccionan con los eritrocitos en las zonas más frías del organismo, lo que provoca la fijación del complemento, y se disocian a temperaturas más elevadas. El anticuerpo principalmente involucrado es el anti-P.

La AH por medicamentos, puede ser causada por diferentes vías, las tres principales que se han identificado en el laboratorio son:

**Adsorción del medicamento**, la cual se podrá detectar con la prueba de Coombs directo IgG acompañado, algunas veces, de C3. Los más representativos de los medicamentos implicados esta vía de activación de inmunización son las penicilinas y las cefalosporinas. La suspensión del contacto con el medicamento elimina la producción del anticuerpo.

**Complejo inmune**, en cuyo caso, en la prueba de Coombs directo normalmente se detecta C3, y en algunas ocasiones, también IgG. Los medicamentos representativos de esta vía de inmunización son las fenacetinas, quinidinas y cefalosporinas de tercera generación. La eliminación del medicamento hace que desaparezca la producción del anticuerpo.

**Autoinmunidad**, en donde, lo habitual es encontrar en la prueba de Coombs directo solo IgG pegado a la membrana del eritrocito, y rara vez C3. Los medicamentos que con mayor frecuencia causan esta inmunización son alfa-metildopa (aldomet) y procainamida. En estos pacientes, aunque se deje de administrar el medicamento, el organismo sigue produciendo los autoanticuerpos.

Hablando ahora de la enfermedad hemolítica del recién nacido o de la eritroblastosis fetal, es importante recalcar que los anticuerpos involucrados son únicamente los IgG, y en específico IgG1 e IgG3, que son los que pueden atravesar la placenta. No se encuentra otra clase de anticuerpos ni presencia de complemento. Habitualmente, el Coombs directo es positivo débil, por lo que es importante realizar la prueba inmediatamente después del alumbramiento del recién nacido, pues el retraso arrojará resultados falsos negativos.

Los anticuerpos encontrados son muy variados en cuanto su especificidad, hallándose sobre todo el anti-D y en segundo plano anti-E, anti-c, anti-e, anti-K, anti-Jk, anti-Fy y otros, dependiendo de la zona geográfica o frecuencia en el país. Sin embargo, es bueno recordar que la inmunización puede ser causada por cualquier grupo sanguíneo de los 33 sistemas que se encuentran en los eritrocitos.

## Reacciones transfusionales

En cuanto a las reacciones transfusionales, las que más interesan son las de tipo inmunológico, como las siguientes:

1) **Inmunológicas inmediatas**: hemolíticas, febril no hemolítica, alérgicas (urticaria y anafiláctica) y daño pulmonar agudo asociado a la transfusión.

2) **Inmunológicas tardías**: hemolíticas, enfermedad injerto contra hospedero, púrpura postransfusional, inmunomodulación por transfusión y aloinmunización contra antígenos eritrocitarios, leucocitarios, plaquetarios y a proteínas plasmáticas. Dentro de estas, las que más dan resultados de AutoTestigo positivo o una prueba de Coombs directo positivo son:

**La hemólisis intravascular**, se caracteriza por signos y síntomas como: ansiedad, sensación de muerte inminente, dolor retroesternal, lumbar o en el sitio de la venopunción, fiebre, calofríos, náusea, vómito, hipertensión inicial, hipotensión, taquicardia, disnea, coluria, anuria y choque. En el paciente anestesiado con sangrado en capa (en lecho quirúrgico y en sitios de venopunción) suele ocurrir oliguria, coluria e hipotensión. La etiología más común es la incompatibilidad ABO; sin embargo, pueden estar involucrados otros sistemas como Kidd, Duffy y P.

**La hemólisis intravascular** es mediada por anticuerpos de las clases IgM y/o IgG fijadores de complemento hasta C9. En cuanto a la hemólisis extravascular, los signos y síntomas más comunes son: ictericia, fiebre, transfusión inefectiva, ocasionalmente calofríos, y coluria que puede pasar inadvertida. La etiología de la incompatibilidad es la presencia de anticuerpos de los sistemas Rh, Kidd, Duffy, Diego, Kell y otros diferentes al ABO, y está mediada por anticuerpos clase IgG fijadores o no fijadores de complemento hasta C3.

## Casos clínicos

Sin lugar a dudas, los casos clínicos son un ejercicio que ayuda a establecer la correlación entre lo teórico y lo práctico, por lo que en esta ocasión se presentarán varios de ellos, los cuales son representativos de cada etiología mencionada y que causan “desconcierto” en el laboratorio, aunque una vez que se analizan a fondo son de fácil resolución.

### CASO CLÍNICO 1

Paciente femenino de 45 años de edad, con antecedentes de enfermedad renal crónica (ERC) de 15 años de evolución, en actual tratamiento con diálisis peritoneal automatizada (DPA), antecedente de trasplante renal de donador vivo relacionado hace 15 años, sin complicaciones inmediatas, hasta hace dos años que presentó disfunción renal.

Cuenta también con antecedente de sangrados menstruales desde hace seis meses, con ciclos cada 30 días, los cuales fueron aumentando en número, duración y volumen, con presencia de coágulos. Fue tratada con manejo farmacológico y cauterización. La paciente presenta astenia, adinamia, debilidad generalizada sin compromiso cardiopulmonar; abdomen con presencia de catéter de diálisis con cojinete externo visible, extremidades íntegras sin edema. Resultados de laboratorio: Hb=5.82 g/dL, Hto=37.1, VCM=105, HCM= 36, Leuc=6x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>, plaquetas= 322,000/mm<sup>3</sup>. Se cruzan paquetes globulares y se reportan pruebas inco *diabetes mellitus* mpatibles. Se solicita transfusión sanguínea con productos fenotipificados.

Tabla 1. Resultados del caso clínico 1

Estudio	Resultado
Grupo sanguíneo	O positivo
Coombs directo (PAD)	Positivo, título 1:2, 12 puntos, clase IgG
Búsqueda de anticuerpos irregulares	Probable anti-e detectado en tarjeta de gel-Coombs
Pb. fenotipo	ccDEE (R2R2) MNSs P(pos)Fy(a+b-)kkJK(a+b-) Le(a-b-)Dia-
Resultado de prueba cruzada	Compatible por prueba cruzada mayor y por fenotipo e(neg)

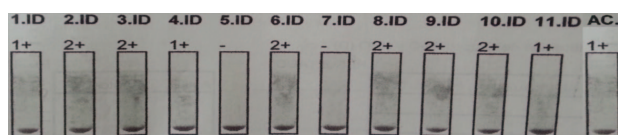


Imagen 1. Caso 1. Búsqueda de anticuerpos irregulares en suero. Técnica DGgel-Coombs. Panel Identisera Lote:11256F, cad. 04/05/2013

### CASO CLÍNICO 2

Se trata de paciente femenino de 81 años de edad, con antecedentes transfusionales interrogados y negados, diabetes mellitus tipo 2, ginecoobstétricos, G-11, P-10, A-1, C-0, sin indicar complicaciones. En la interconsulta con el hematólogo se informó el diagnóstico de una anemia macrocítica normocrómica con neutropenia y linfopenia, sugiriendo que puede tratarse de una anemia megaloblástica.

En los estudios de laboratorio se encuentra una hemoglobina de 6.4 g/dL y hematocrito de 20.6%. Considerando la edad de la paciente y el riesgo de cardiopatía isquémica, se sugiere transfundir de dos a tres concentrados eritrocitarios para alcanzar un hematocrito de 30%, la cual se realizó sin éxito, ya que tras varios cruces se reporta incompatible. Por lo anterior, se solicita apoyo al Banco Central de Sangre Centro Médico Nacional SXXI para la realización de más pruebas.

Tabla 2. Resultados del caso clínico 2

Estudio	Resultado
Grupo sanguíneo	O positivo
Coombs directo	Positivo, título SP, 8 puntos, Clase IgG
Búsqueda de anticuerpos irregulares	Probable anti-Fyb detectado en salina-Coombs y bromelina-Coombs
Eluído, anticuerpos despegados de los eritrocitos	Pb. Anti-C
Pb. fenotipo	ccDEe (R2r) MMSS P(pos) Fy(a+b-)JK(a+b+) Le(a-b+)Dia-
Resultado de prueba cruzada	Compatible por prueba cruzada mayor y por fenotipo C (neg) y Fyb(neg)

### CASO CLÍNICO 3

Paciente femenino de 60 años de edad. Ingresa con astenia, adinamia, tinte icterico. Fue tratada en un servicio particular como hepatitis. Diagnóstico de anemia hemolítica hace 13 años; tratada con esteroides (prednisona). Antecedentes ginecoobstétricos G-1, P-1 A-0, sin EHRN. Se desconocen sus antecedentes transfusionales. Exámenes de laboratorio: Hb 4.7 g/dL; leucocitos 15 900/mm<sup>3</sup>, DHL 1112, bilirrubina total 11g/dL, bilirrubina indirecta 7.31 g/dL, en la uresis se presenta coluria, AST 106, ALT 76.

Tabla 3. Resultados del caso clínico 3

Estudio	Resultado
Grupo sanguíneo	B positivo
Coombs directo	Positivo, título 64,64 puntos, clase IgG más complemento
Búsqueda de anticuerpos irregulares	Probable auto-anti-I activo a 22°C y que fija complemento, técnica salina-Coombs y técnica en gel Coombs
Eluido, anticuerpos despegados de los eritrocitos	Pb. auto anti-Sistema Rh-Hr
Pb. fenotipo	ccDEe (R2r) MMSS P(pos)Fy(a+b-) JK(a+b+) Le(a-b+)Dia-
Genotipo	Fenotipo no concluyente por observar doble población Er. tratados con elución ácida ccDEE (R2R2) Ss P(pos)Fy(a+b+) JK(a+/-b+/-)Dia-
Resultado de prueba cruzada	Compatible por prueba cruzada mayor y por genotipo C(neg) Jka(neg)

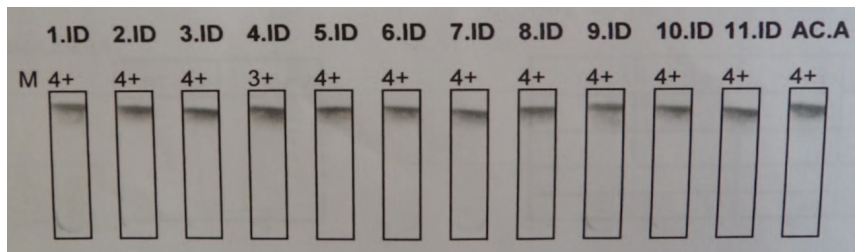


Imagen 2. Caso 3. Búsqueda de anticuerpos irregulares en suero. Técnica DG gel Coombs

### CASO CLÍNICO 4

Femenino de 26 años, grupo sanguíneo O Rh (D) positivo; G-3, C-2, embarazo gemelar previo. No hay antecedentes de transfusión. No ha presentado enfermedad hemolítica de recién nacido en sus partos anteriores. La hija recién nacida, de seis días de vida, cuenta con grupo O Rh (D) positivo, presenta hiperbilirrubinemia desde el segundo día de vida (23.7 mg/dL de bilirrubina indirecta y bilirrubina total de 24.1 mg/dL), hemoglobina de 15 g/dL, hematocrito de 45%, plaquetas 345,000/mm<sup>3</sup>, Coombs directo positivo. Se inicia tratamiento con fototerapia.

Se requiere sangre para realizar exanguinotransfusión; sin embargo, el servicio informa que no existen datos de

hemólisis. El control de las bilirrubinas a las 24 horas fue de 28.3 mg/dL, a las 23 horas era de 23.1 mg/dL y hematocrito de 39%. No se realizó exanguinotransfusión por no encontrar sangre compatible en su hospital de procedencia. Se envía el caso al Banco Central de Sangre Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se determinó la presencia de anticuerpos anti-c y anti-E en el suero de la madre y pegados en los eritrocitos de la recién nacido.

Con frecuencia se estudian las exanguineotransfusiones e hiperbilirrubinemias en recién nacidos cuyas madres son Rh(D) negativo; no obstante, en este caso se nota la importancia del control y rastreo de anticuerpos en la madre durante el periodo prenatal, de manera independiente al Rh(D) que esté presente.

Tabla 4. Resultados del caso clínico 4			
Estudio	Resultado		
	Madre	Hija	Padre
Grupo sanguíneo	O positivo	O positivo	O positivo
Coombs directo	Negativo	Positivo, título 1:128, clase IgG	Negativo
Búsqueda de anticuerpos irregulares	Probable mezcla de anti-E y anti-c, técnica salina-Coombs		
Eluido, anticuerpos despegados de los eritrocitos		Probable mezcla de anti-E y anti-c, técnica salina-Coombs	
Pb. fenotipo	CCDee(R1R1) NNSsP(pos) Fy(a+b+)kk JK(a+b+) Le(a+b+) Dia-		CcDEe(R2R2) Fy(a+b-) JK(a+b)Le(a-b+) Dia-

#### Caso clínico 5

Paciente masculino de 79 años de edad diagnosticado con macroglobulinemia, proveniente del Servicio de Hematología en el Hospital de Oncología. El expediente refiere cinco años de evolución con macroglobulinemia, tratado con talidomida y fluconazol y transfusiones positivas FUT el 21 de noviembre de 2012. Los resultados de laboratorio informan: prueba de autotestigo positivo.

Tabla 5. Resultados del caso clínico 5	
Estudio	Resultado
Grupo sanguíneo	B positivo con AT positivo
Coombs directo	Negativo
Búsqueda de anticuerpos irregulares	Negativa en salina-Coombs y en gel-Coombs
Pb. fenotipo	No concluyente por observar doble población CCDee (R1R1) MMss P(pos)Fy(a+b+/-) JK(a+b+/-)Le(a-b+)Dia-
Resultado de prueba cruzada	Compatible por prueba cruzada mayor y por fenotipo R1R1, Fyb(neg)

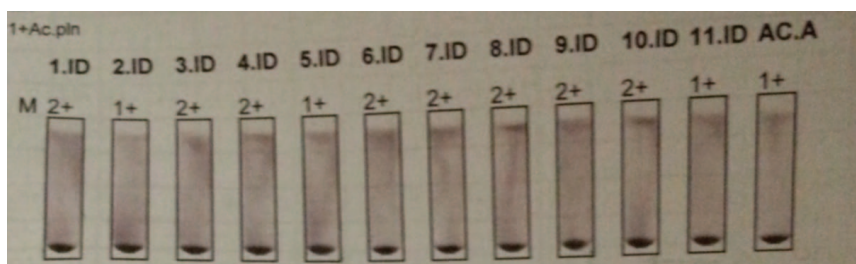


Imagen 3. Caso 5. Búsqueda de anticuerpos irregulares en suero. Técnica DG gel-Coombs.

### CASO CLÍNICO 6

Paciente de 26 años de edad, originaria del Distrito Federal. Inicia hace 10 años con molestias en articulaciones de tobillos y manos, presenta mialgias, disnea y caída de cabello. Fue tratada y diagnosticada en Denver, Estados Unidos, por Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y su manejo fue a base de esteroides. También es diagnosticada con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF). En enero de 2008 ingresa al Hospital de Especialidades en estado de coma, a cargo del servicio de Reumatología. Presenta reacción postransfusional a eritrocitos fenotipi-

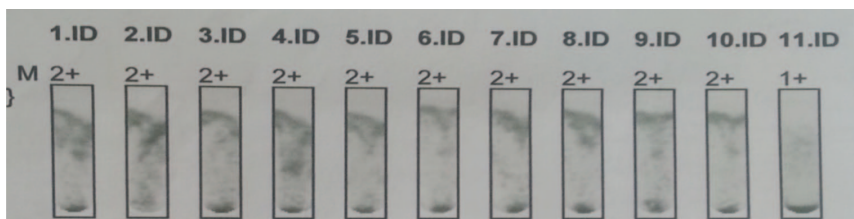
ficados Dib positivo obtenidos de su hermano, la cual se caracteriza por fiebre, hipertensión e ictericia.

En abril de 2013, por segunda ocasión presenta reacción transfusional de concentrado eritrocitario compatible por fenotipo e incompatible por autoanticuerpos. Se anexa estudio realizado en el año 2008 cuando previamente se le detectó anti-Dib, estudio que probablemente se realizó en los Estados Unidos. En México no contamos con antisuero para detectar el antígeno en los eritrocitos, ni reportes de su frecuencia en nuestra población.

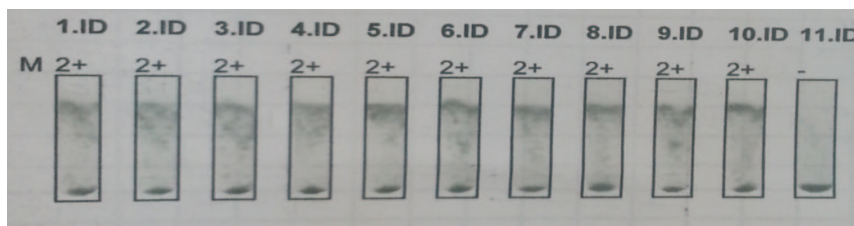
Tabla 6. Resultados del caso clínico 6

Estudio	Resultado	
	PRE	POST
Grupo sanguíneo	A1 Rh positivo	A1 Rh positivo
Coombs directo	Positivo, clase IgG	Positivo, clase IgG
Búsqueda de anticuerpos irregulares	No definida. Técnica gel Coombs	No definida. Técnica gel Coombs
Eluído, anticuerpos despegados de los eritrocitos		No definido. Eluído-Coombs
Pb. fenotipo		Se observa doble población CCD <sub>ee</sub> (R1R1) MMS(+/-) s P(pos) Fy(a+b+/-) JK(a+b-)Le(a+b+) Dia-
Fenotipos Reportados en 2008	Hermana con LES CCD <sub>ee</sub> (R1R1) MNssFy (a+b-) kkJka+Jkb- Dia+b-  Hermano (donador) CCD <sub>ee</sub> (R1R1) MNssFy (a+b-) kkJka+Jkb- Dia+b+	

Imagen 4. Caso 6. Búsqueda de anticuerpos irregulares en suero. Técnica DG gel-Coombs.



Búsqueda de anticuerpos pretransfusión. Panel Panocell



Búsqueda de anticuerpos postransfusión. Panel Identisera

Para resolver estos casos, el eluío, técnica que nos ayuda a despegar los anticuerpos pegados en los eritrocitos en estudio para su posterior análisis, resulta en una herramienta muy importante. Estas técnicas pueden ser comerciales, o bien, realizadas con el uso de reactivos comunes en el laboratorio, y así tener un fácil control de ellas una vez que se establecen de rutina:

## Técnicas de elución

Las técnicas de elución resultan de gran ayuda en el laboratorio de Inmunoematología, pues son una herramienta para la resolución de problemas en este campo. Cuando nos enfrentamos a muestras con un Coombs directo positivo y necesitamos saber cuál es el anticuerpo que se ha unido al eritrocito, o cuando necesitamos conocer el fenotipo de eritrocitos que están cubiertos por anticuerpos, es necesario realizar alguna técnica de elución, mediante las cuales se pueden despegar moléculas de anticuerpos unidos a la membrana eritrocitaria, las cuales impiden la determinación adecuada de grupo AB0-Rh.

Asimismo, con ellas es posible la fenotipificación de los diferentes sistemas sanguíneos en pacientes con Coombs directo positivo. Además, con los eluíos es posible identificar los anticuerpos unidos con el fin de hacer una adecuada selección del concentrado eritrocitario que deba transfundirse.

Para estas técnicas se hacen modificaciones fisicoquímicas al medio de reacción, de esta manera se realiza la separación de los anticuerpos con sus correspondientes antígenos. Dicha reacción antígeno-anticuerpo es firme pero reversible, pues los enlaces que mantienen unidas a estas dos estructuras son relativamente débiles: enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y enlaces hidrofóbicos. Este tipo de enlaces se pueden romper con las variaciones en el medio, entre las que se encuentran:

- a) **Cambios de pH.** Desde 1964, Hughes-Jones y colaboradores comprobaron que el pH ideal para que se lleve a cabo la reacción antígeno-anticuerpo es entre 6.5 y 7. Sin embargo, es importante destacar que algunos anticuerpos como el Anti-M o el Anti-I reaccionan mejor en un pH ácido.
- b) **Temperatura.** De manera general, se puede decir que los anticuerpos de tipo IgM reaccionan de

forma ideal a temperaturas bajas, entre 4 y 27°C, mientras que los anticuerpos IgG lo hacen mejor a 37°C. Esta regla se rompe con algunos anticuerpos que pueden presentar reactividad con su correspondiente antígeno tanto a 4°C como a 37°C.

- c) **Fuerza iónica.** Cuando los eritrocitos se encuentran suspendidos en solución salina, los iones de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> neutralizan parcialmente las cargas opuestas entre el antígeno y el anticuerpo, por lo que el aumento o la disminución de la cantidad de iones en el medio favorece o disocia la reacción antígeno-anticuerpo.

En las técnicas de elución se modifica alguna de las variables antes mencionadas para disociar las inmunoglobulinas fijadas a la membrana eritrocitaria, con lo que se rompen los enlaces no covalentes.

Existen dos diferentes tipos de elución:

- 1) Elución para estudiar antígenos
- 2) Elución para estudiar anticuerpos

A continuación detallaremos algunos puntos de cada una.

**Elución para estudiar antígenos.-** Cuando los glóbulos rojos se encuentran recubiertos con inmunoglobulinas pueden aglutinarse de forma espontánea, lo que suele dar origen a resultados falsos positivos en su tipificación, en especial cuando se requiere hacer la prueba de D débil o la fenotipificación de ciertos antígenos en las que los eritrocitos deben llevarse hasta la prueba de Coombs. El tipo de elución no debe dañar la membrana eritrocitaria, de tal manera que una vez que hemos hecho el procedimiento, el anticuerpo del eritrocito pueda ser fenotipificado sin riesgo mayor de resultados falsos positivos.



De igual manera, para realizar una autoadsorción (en pacientes que no han sido recientemente transfundidos), y los eritrocitos autólogos tienen un Coombs



directo positivo, se requiere hacer este tipo de elución con el fin de dejar la membrana eritrocitaria con sus sitios de unión libres para que se adsorban los autoanticuerpos del suero.

De este tipo de elución existen los siguientes métodos:

- a) **Calor.** Se utiliza cuando los eritrocitos están recubiertos por IgG. Los glóbulos rojos deben ser incubados a 45°C durante 10 min.
- b) **Difosfato de cloroquina.** Para la disociación de IgG de la membrana eritrocitaria. Por la eficacia de este método así como por el volumen de células que se pueden trabajar, es una buena opción para realizar técnicas de autoadsorción aunque también se utiliza para tipificar los diferentes sistemas sanguíneos. Es importante mencionar que los antígenos del sistema Rh, Jka y Jkb pueden expresar cierto debilitamiento o desnaturalización. El tiempo máximo de tratamiento es de dos horas.
- c) **EDTA-glicina ácida.** Es un método rápido para la disociación de IgG. En un tiempo máximo de cinco minutos, los eritrocitos que inicialmente tenían un Coombs directo positivo, pueden usarse para realizar autoadsorción y/o tipificación sanguínea. Por este método se desnaturalizan los antígenos del sistema Kelly, Vg. y Er.

**Elución para estudiar anticuerpos.-** El objetivo de este tipo de elución es separar los anticuerpos unidos a la membrana eritrocitaria sin que sean dañados, de tal modo que el eluido (también llamado eluato) permita el estudio y así definir cuál es la especificidad del anticuerpo. La membrana puede ser dañada físicamente por calor, ultrasonido, congelamiento-descongelamiento, detergentes o solventes orgánicos; los enlaces de los complejos antígeno-anticuerpo se pueden romper por variaciones en el pH.

Al igual que en la elución para estudiar antígenos, existen diferentes métodos de elución para estudiar anticuerpos, de los cuales describiremos solo algunos de los que actualmente se utilizan más.

- a) **Disolventes orgánicos.** Este tipo de elución es adecuado para las pruebas de antiglobulina directa positiva por autoanticuerpos calientes o aloanticuerpos calientes (IgG). La temperatura a la que se trabaje la técnica depende del tipo de disolvente orgánico que se utilice y será de 37°C o 56°C. A pesar de que estas técnicas de elución son rela-

tivamente rápidas (aproximadamente 30 minutos) el resultado final de la identificación de anticuerpos se obtiene en dos horas +/- 20 minutos.

- b) **Elución ácida o elución EDTA-glicina ácida.** Si bien aún no está completamente definido por qué se despegan los anticuerpos a pH bajo, se piensa que se debe a la disociación de uniones electrostáticas en las proteínas y al cambio que sufren éstas en su estructura terciaria. Al igual que con los disolventes orgánicos, éste es un buen método para la recuperación de autoanticuerpos y aloanticuerpos de tipo IgG. El tiempo para obtener el resultado de la especificidad del anticuerpo presente en la muestra estudiada es de aproximadamente 30-40 minutos.
- c) **Elución por calor.** Este tipo de elución se recomienda cuando el anticuerpo involucrado es de tipo IgM o cuando se trata de anticuerpos del sistema ABO causantes de enfermedad hemolítica perinatal. El resultado final de la identificación de anticuerpos lo tenemos en 2 horas +/- 20 minutos.

Saber utilizar estas técnicas de elución en el momento adecuado y con las muestras adecuadas es una gran ayuda para el personal de laboratorio para tomar la decisión más apropiada sobre el concentrado eritrocitario que se debe transfundir a un paciente.

## Bibliografía

1. Manual Técnico de la AABB. Ed. aabb17<sup>o</sup> Edición. 2012
2. Manual Técnico de la AABB. Ed. aabb12<sup>o</sup> Edición. 1997
3. Serologic Problem Solving. Sally V. Rudmann Ed. aabb1<sup>a</sup> Edición. 2005
4. Trabajo Diario de muestras de pacientes del Banco Central de Sangre del CMN SXXI IMSS
5. Aplicación y práctica de la Medicina transfusional. Primera edición. 2013.
6. Petz LD, Garraty G. Immune Hemolytic anemias, 2nd ed. New-York: Churchill Livingstone. 2004:61-115
7. Inmunohematología. Recomendaciones de expertos de la Asociación Mexicana de Medicina Transfusional A.C. 2010