



INMUNOHEMATOLOGÍA Y REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN APLICADA A LOS GRUPOS SANGUÍNEOS

Historia de la inmunohematología

La historia de la inmunohematología está relacionada con la historia de la transfusión sanguínea:

Lower (1665): Realiza transfusiones entre perros con éxito (el antígeno más potente no tiene anticuerpos naturales contra él, por lo que la primera transfusión nunca provoca accidentes, sí las siguientes).

Dennis (1667): Transfunde glóbulos rojos de carnero (250 ml) en un hombre joven voluntario, provocándole la muerte por *aglutinación y hemólisis*.

Blundel (1829): Realiza una transfusión de sangre humana a un receptor humano (paciente obstétrica); el resultado fue la muerte del receptor por producirse aglutinación, hemólisis, cristaluria y necrosis tubular aguda.

Landois (1875): Realiza experimentos de hemaglutinación in-vitro.

Landsteiner (1900): Logra el descubrimiento de los “grupos sanguíneos” (hoy A, B, O).

Von Decastello y Sturli (1902): Agregan un nuevo grupo, el AB.

Hektoen (1907): Fue el primero en proponer las pruebas de grupos sanguíneos para la selección de donantes y receptores.

Ottenberg (1908): Realizó pruebas de hemoclasificación en donantes y pacientes y pruebas de compatibilidad antes de la transfusión.

Luis Agote (1914): En Argentina, Introduce el uso del citrato de sodio 0.3% para la conservación de los glóbulos rojos in-vitro.

Landsteiner y Wiener (1940): Descubren Factor Rh y la EHRN.

Bernstein (1944): Propone teoría para explicar la transmisión genética mendeliana de los antígenos.



Diplomado en Medicina Transfusional e Inmunohematología

2

Coombs, Mourant y Race (1945): Descubren el “suero de Coombs” inyectando suero humano a conejos y obteniendo una anti- inmunoglobulina (IgG) hoy la AHG. Sigue siendo la “prueba de oro” en transfusión sanguínea. (1,2)

Definición:

La inmunohematología es la parte de la hematología que estudia los procesos inmunitarios que tienen lugar en el organismo, en relación con los elementos sanguíneos y las complicaciones inmunológicas en que se ven implicados. (3)

El principio de la inmunohematología:

Capacidad del organismo para identificar y reaccionar contra antígenos eritrocitarios o tejidos extraños, pero no contra los propios.

La inmunohematología eritrocitaria es una ciencia compleja que reúne conceptos de otras disciplinas como la Inmunología, Hematología, Genética, Bioquímica y Biología Molecular entre otras. (4)

Aplicaciones de la inmunohematología:

Estudio de los grupos sanguíneos, estudio de los antígenos presentes en: hematíes (ABO, Rh), plaquetas (APH), granulocitos (ANH), linfocitos (HLA)

Estudio de anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en las células sanguíneas de utilidad en el diagnóstico de anemias hemolíticas, (inmunes y autoinmunes), en la realización de pruebas pretransfusionales, (escrutinio e identificación de anticuerpos irregulares y pruebas cruzadas).

Utilizado también en el estudio y prevención de la enfermedad hemolítica del feto y recién nacido. En los Estudios de las trombocitopenias. En los protocolos de trasplante. Ha realizado importantes contribuciones en genética humana, antropología y en la criminalística.

Antígenos eritrocitarios:

Los antígenos eritrocitarios se caracterizan por ser inmunogénicos, lo que quiere decir capacidad de estimular la producción de anticuerpos más o menos potentes y diferentes para cada antígeno.

Grupo sanguíneo:

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



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 presenta entrecruzamiento.

Cada individuo posee un conjunto diferente de antígenos eritrocitarios, la Sociedad Internacional de la Transfusión Sanguínea (ISBT, International Society of Blood Transfusion) ahora reconoce más de 300 antígenos de grupos sanguíneos distribuidos en 35 sistemas de grupo sanguíneo genéticamente descritos (Tabla 1), más algunos antígenos diferenciados que aún no han sido atribuidos a ningún sistema específico.

Colecciones (serie 200) consisten en antígenos relacionados serológicamente, bioquímicamente, o genéticamente, que no se ajustan a los criterios exigidos por el estado del sistema.

Serie 700 contiene antígenos con una incidencia de menos del 1% y que no puede ser incluido en un sistema o colección.

Serie 901 contiene antígenos con una incidencia mayor del 90% y que no puede ser incluido en un sistema o colección (6)

Tabla 1. Sistemas de Grupos Sanguíneos (ISBT)

No.	System name	System symbol	Gene name(s)*	Chromosomal location	CD numbers	No.	System name	System symbol	Gene name(s)*	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	ABO	9q34.2		018	H	H	FUT1	19q13.33	CD173
002	MNS	MNS	GYP A, GYP B, (GYPE)	4q31.21	CD235a CD235b	019	Kx	XX	XX	Xp21.1	
003	P1PK	P1PK	A4GALT	22q13.2	CD77	020	Gerbich	GE	GYPE	2q14.3	CD236
004	Rh	RH	RHD, RHCE	1p36.11	CD240	021	Cromer	CROM	CD55	1q32.2	CD55
005	Lutheran	LU	LU	19q13.32	CD239	022	Knops	KN	CR1	1q32.2	CD35
006	Kell	KEL	KEL	7q34	CD238	023	Indian	IN	CD44	11p13	CD44
007	Lewis	LE	FUT3	19p13.3		024	Ok	OK	BSG	19p13.3	CD147
008	Duffy	FY	DARC	1q23.2	CD234	025	Raph	RAPH	CD151	11p15.5	CD151
009	Kidd	JK	SLC14A1	18q12.3		026	John Milton Hagen	JMH	SEMA7A	15q24.1	CD108
010	Diego	DI	SLC4A1	17q21.31	CD233	027	I	I	GCV72	6p24.2	
011	Yt	YT	ACHE	7q22.1		028	Globoside	GLOB	B3GALT3	3q26.1	
012	Xg	XG	XG, MIC2	Xp22.33	CD99†	029	Gill	GIL	AQP3	9p13.3	
013	Scianna	SC	ERMAP	1p34.2		030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	RHAG	6p21-qter	CD241
014	Dombrock	DO	ART4	12p12.3	CD297	031	FORS	FORS	GBG71	9q34.13	
015	Colton	CO	AQP1	7p14.3		032	JR	JR	ABCG2	4q22	CD338
016	Landsteiner-Wiener	LW	ICAM4	19p13.2	CD242	033	LAN	LAN	ABC86	2q36	
017	Chido/Rodgers	CH/RG	C4A, C4B	6p21.3		034	VEL	VEL	SMM1	1p36.32	
						035	CD59	CD59	CD59	11p13	CD59

Tomado de: Table of blood group systems v4.0 141125 Vox Sanguinis (2014) 107, 90–96



Los antígenos los podemos clasificar atendiendo a diversos parámetros, desde el punto de vista clínico es importante conocer los siguientes conceptos:

Aloantígeno: antígeno de la misma especie, pero de individuos de distinto genotipo, por lo que es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria. (Ej: RhD negativos fácilmente se sensibilizan con RhD Positivos)

Antígeno parcial: algunos antígenos están constituidos por un mosaico de estructuras reactivas donde a cada una de ellas le corresponde un anticuerpo específico. Cada una de dichas estructura se corresponde a un antígeno parcial. (Ej: DVI)

Antígeno compuesto: es el caso que se presenta cuando dos determinantes antigénicos vecinos, pueden asociarse y provocar una nueva estructura antigénica, reconocida por un "tercer" anticuerpo. (Ej: Antígeno "f" características de "c" y "e")

Criptoantígeno: aquel antígeno que se localiza en la parte interna de una membrana celular y no puede ser accedido directamente por el anticuerpo. (Ej: T, Th)

Antígeno soluble: puede ser secretado (controlado genéticamente) a plasma u otro tipo de secreciones. (Ej: ABO)

Antígeno público: es un antígeno presente en la mayoría de los sujetos de una misma especie. (Ej: k, Kpb, Jsb, Lub, I, e) difícil compatibilizar un paciente con ausencia de estos antígenos.

Antígeno privado: es un antígeno que rara vez está presente en los sujetos de una misma especie. (Ej: Cw, Kpa, Jsa, Lua, i).

Composición de los antígenos eritrocitarios: pueden estar formados por un solo tipo de moléculas: proteínas (Rh), glúcidos (ABO), lípidos. Ó por moléculas compuestas: glucolípidos (P1), glicoproteínas (K), lipoproteínas y otros.

Importancia biológica de los antígenos de grupos sanguíneos: está relacionada principalmente con su estructura y la funcionalidad de los grupos sanguíneos: (7)

Transportadores de moléculas biológicamente importantes a través de la membrana de eritrocito (Kidd, Colton, Diego).

Receptores de estímulos externos y células de adhesión (Duffy, Indian /LW, Lutheran)

Reguladores del complemento (Chido, Rogers, Cromer, Knops)

Enzimas (Yt, Kell) Anclaje de la membrana del eritrocito al citoesqueleto (Gerbich)



Anticuerpos

Son proteínas plasmáticas que se han formado en el organismo como respuesta a un antígeno que no es reconocido como propio. Casi todos los anticuerpos dirigidos contra los antígenos eritrocitarios son inmunoglobulinas de clase IgG, o bien IgM, y una minoría muestran especificidad IgA. Las inmunoglobulinas de clase IgM tienen mayor capacidad para activar el complemento que las de clase IgG, ya que se requieren dos dominios Fc para activar la porción C1q de la fracción C1. Las subclases IgG1 e IgG3 activan fuertemente el Complemento, IgG2 lo hace débilmente e IgG4 no es capaz, en general, de activarlo. (8)

Importancia clínica de anticuerpos de los grupos sanguíneos:

Se mide por la capacidad del anticuerpo de generar destrucción o acortamiento de la vida de los glóbulos rojos en 2 entidades clínicas: Enfermedad Hemolítica del Feto y Recién Nacido (EHFRN) y Reacción Adversa Transfusional Hemolítica (RATH). En general los anticuerpos clínicamente importantes son IgG los cuales reaccionan a 37°C. Estudios realizados por Issit y Anstee (9) de seguimiento a pacientes transfundidos lograron establecer que entre un 1% y 2% presentaron anticuerpos clínicamente significativos. Pacientes que reciben transfusiones periódicamente como sucede en la enfermedad de células falciformes, tienen riesgo de sensibilización de un 25% al igual que personas con enfermedades autoinmunes que presentan riesgo de hasta un 35%.

Anticuerpos “Naturales” o Regulares:

Los llamados anticuerpos “naturales” son habitualmente de clase IgM, pero también pueden ser de clase IgG, y se detectan en personas que no han sido nunca transfundidas con hemáties, ni con antecedentes de gestación en el caso de las mujeres. Se supone que su aparición ha tenido lugar como respuesta a la exposición a ciertas sustancias que están presentes en el medio ambiente o en la dieta y que muestran una estructura similar al antígeno eritrocitario en cuestión, como sucede con la producción de anticuerpos del sistema ABO por similitud antigénica con bacterias entéricas.(8)

Anticuerpos adquiridos o inmunes:

Son predominantemente de clase IgG, aunque pueden contener componente IgM y/o IgA, y se producen tras la exposición a un antígeno extraño en el curso de una transfusión o del embarazo.

Reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) eritrocitarias:

En inmunohematología eritrocitaria, el fenómeno de aglutinación de los glóbulos rojos producido por la reacción entre anticuerpos y antígenos de grupos sanguíneos, constituye la base de casi todas las técnicas aplicadas en la serología de los grupos sanguíneos.

La reacción Ag-Ac sucede en dos fases: sensibilización y luego la aglutinación (ver figura 1)

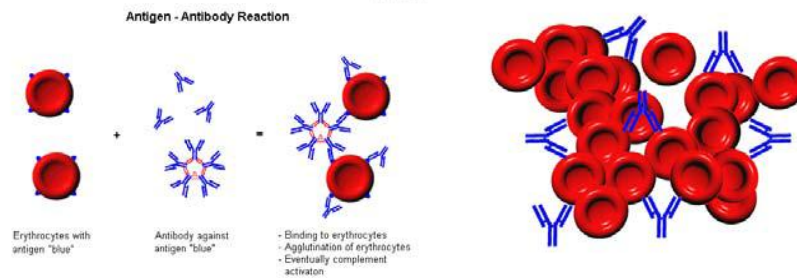


Figura 1. Reacción antígeno + anticuerpo. Tomado de: Immunobase DiaMed. (11)

Los anticuerpos que pueden causar aglutinación en medio salino son tipo IgM por su condición pentamérica y presencia de 10 sitios de unión con el antígeno por esta cualidad se le llama anticuerpos “completos” mientras que los anticuerpos IgG difícilmente producen aglutinación en medio salino, necesita de medios artificiales como la antiglobulina de Coombs para que suceda la aglutinación y por ello se les llama anticuerpos incompletos.

Aglutinación específica:

Sabemos que una suspensión de glóbulos rojos en solución salina fisiológica (NaCl 0,85%) constituye un sistema estable, o sea, las células se mantienen a una cierta distancia unas de las otras. En el momento en el que un anticuerpo entra en contacto con un antígeno contra el que está dirigido, ambos se unen formando el complejo Ag-Ac, esta unión es no covalente y por tanto es reversible, pero da lugar a la denominada reacción Ag-Ac de interés relevante en inmunohematología.

Aglutinación inespecífica:

Este fenómeno, llamado “panaglutinación”, corresponde a la aglutinación de glóbulos rojos normales (no sensibilizados por anticuerpos) se produce por sustancias presentes en el medio de la suspensión, como: detergentes, sílice coloidal, iones metálicos y macromoléculas (albúmina, polibreno, ficol, dextran).

Lectinas (fito-aglutininas) (anti-A1, anti-H) son capaces de reaccionar contra receptores presentes en los glóbulos rojos humanos, produciendo un fenómeno que se acerca mucho de la aglutinación por anticuerpos. (10)

Las reacciones antígeno-anticuerpo (tanto “*in vivo*” e “*in vitro*”) están sometidas a diversas condiciones del medio en que se realizan, destacando entre ellas las siguientes:

Temperatura: existe un grado térmico óptimo para cada anticuerpo aplicable a los grupos sanguíneos. Hay anticuerpos que se fijan mejor a los hematíes a 37°C, otros a temperatura ambiente y otros a 4°C. Así, se habla de anticuerpos fríos (Ej.: I, M, N, P) y calientes (Ej.: Rh, Jk, K)



pH: normalmente la sensibilización de los hematíes necesita que el pH del medio esté entre 6.9 y 7.2, aunque hay anticuerpos que necesitan un medio ácido para actuar.

Tiempo de incubación: el estado de equilibrio sin potenciadores es de 15 a 60 minutos según el anticuerpo.

Tipo y naturaleza del anticuerpo

Si se trata de un anticuerpo aglutinante casi siempre es IgM y la aglutinación aparece en la fase salina.

Si es un anticuerpo no aglutinante necesitará sustancias que potencien la aglutinación: macromoléculas, enzimas, AGH.

Proporción entre Ag y Ac: es necesario que exista una relación entre el número de moléculas del anticuerpo y el número epítopes antigénicos de los hematíes.

Constante de afinidad del anticuerpo: a mayor afinidad del anticuerpo más rápida es la velocidad de asociación y más lenta la de disociación. (5)

Factores que afectan la fase de aglutinación

Intensidad iónica del medio (potencial Z): Los glóbulos rojos se comportan como partículas electronegativas en estudios de migración electroforética. Los grupos carboxílicos de las sialo-glucoproteínas de la membrana eritrocitaria son los mayores responsables por esta electronegatividad y esto hace que se repelan entre ellos. El potencial Z es la diferencia de potencial entre el hematíe cargado negativamente que se encuentra rodeado por una nube de proteínas del que poseen cargas (+). Es el responsable de la fuerza de repulsión de los hematíes. La distancia entre los hematíes es proporcional al potencial Z, por lo que solo hay aglutinación si los hematíes están lo suficientemente próximos entre sí. (10)

El potencial Zeta de un sistema puede ser cambiado de dos maneras:

- Por la reducción de la carga eléctrica de la membrana eritrocitaria (enzimas)
- Cambios en la composición del medio (potenciadores)

Potenciadores de la reacción Ag-Ac

Albumina

- Disminuye el potencial Z haciendo que los hematíes estén más cerca.
- Hace posible que Ac IgG sean capaces de unir hematíes adyacentes.
- Solución de baja fuerza iónica (LISS)
- Aumenta la sensibilización por disminución de la nube iónica que hay alrededor del hematíe.
- Acorta el tiempo de sensibilización porque el Ac llega más fácilmente al hematíe.

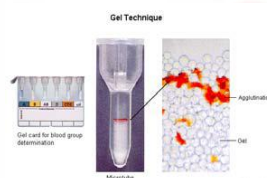
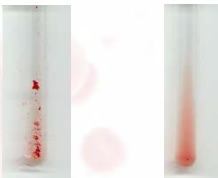


- Se puede usar como aditivo o como líquido de suspensión de los hematíes.
- Previene la aparición de HTLA (anticuerpos de alto título y baja afinidad) por el tiempo reducido de incubación.
- Evita los falsos negativos por incubación excesiva.
- Es necesario tener en cuenta que pueden presentarse falsos positivos si no se respeta la proporción Liss-suero

Enzimas

- Las enzimas más usadas en inmunohematología son: tripsina, papaina, ficina, bromelina, pronasa y neuraminidasa.
- Eliminan cargas negativas del hematíe disminuyendo el potencial Z.
- Mejoran el acceso a los lugares antigénicos.
- Algunas eliminan ciertos Ags.
- Combinadas entre sí ayudan a identificar Ac.
- Detecta anticuerpos no deseados.
- Requieren una manipulación cuidadosa.

Métodos para observar la aglutinación:



Tomado de: Immunobase-DiaMed, (11)

Imágenes Web: <http://www.docsrush.net/>

Técnicas en tubo: Es la técnica estándar. Sus principales ventajas son: se pueden añadir aditivos para potenciar la reacción: Liss, enzimas, macromoléculas, AGH. Permiten la manipulación. La hemólisis es visible.

Sus desventajas: La aglutinación es inestable. Requiere manipulación y lectura cuidadosa. Utiliza una cantidad importante de hematíes y suero.

Agglutinación en columna: compuesta por soportes que tienen unas columnas que contienen gel, microsferas entre otros. Dentro de sus ventajas está que utilizan aditivos (Liss, Edta) para aumentar la sensibilización, disminuyendo así el tiempo de incubación. La reacción es semipermanente y necesita pequeñas cantidades de reactivo.

Como desventajas están que se requiere equipamiento, son muy sensibles y pueden detectar anticuerpos que no son clínicamente significativos. (5)



Técnicas en microplacas: Se utilizan unas microplacas de plástico que contienen 96 pocillos. Permite automatización, y se usan para hacer grandes series de muestras (muestras de donantes de sangre, etc.) Para la investigación de anticuerpos irregulares se usa técnica de Microplaca en fase solida con uso de antígenos inmovilizados. Cada muestra de suero o plasma es testada por dos o tres hematíes reactivo que tienen una composición antigénica complementaria. (5)

Referencias:

1. Jorge de C. MD., Felipe L, Martin M. "Historia de la medicina Transfusional" 2010.
2. Andres Jesús Gómez. Los Grupos Sanguíneos. Disponible en: <https://andresjesusgomeztorreblanca.files.wordpress.com/2012/10/e-book-grupos.pdf>
3. Elías Aguilar, Begoña. "Fundamentos de la Transfusión Sanguínea" Administración de sangre y Hemoderivados. Compendio de medicina transfusional. Comunidad Valenciana p- 19- 2004.
4. Mollison PL, Engelfried CP, Contreras M. Blood Transfusión Clinical Medicine. 9Th ed. Blackwel Scientific, Oxford; 1993.
5. Rosa Montero, Conceptos básicos en inmunohematología; Programa de Postgrado en Medicina transfusional y Terapia tisular y celular Módulo3. Inmunohematología 2009.
6. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology. 2013 International Society of Blood Transfusion DOI: 10.1111/vox.12127 Vox Sanguinis (2014) 107, 90–96.
7. Daniels G, Bromilow I. Essential guide to Blood groupe, 1st ed. Blackwell publishing, Oxford; 2007.
8. Eduardo Muñoz-Díaz MD. Grupos sanguíneos eritrocitarios. Programa de Postgrado en Medicina transfusional y Terapia tisular y celular Módulo 3. Inmunohematología 2009.
9. Issitt PD, Anstee DJ: Applied blood group serology (4th ed). Durham (NC), Montgomery Scientific Publications, 1998.
10. Dr Alisson Dos Santos, Serología de grupos sanguíneos: gel-centrifugación y las técnicas en tubo revista Hemasferio 2008.
11. Immunobase. The educational and reference software programme for immunohaematology, including antibody database. DiaMed a Division of Bio-Rad. 2001