



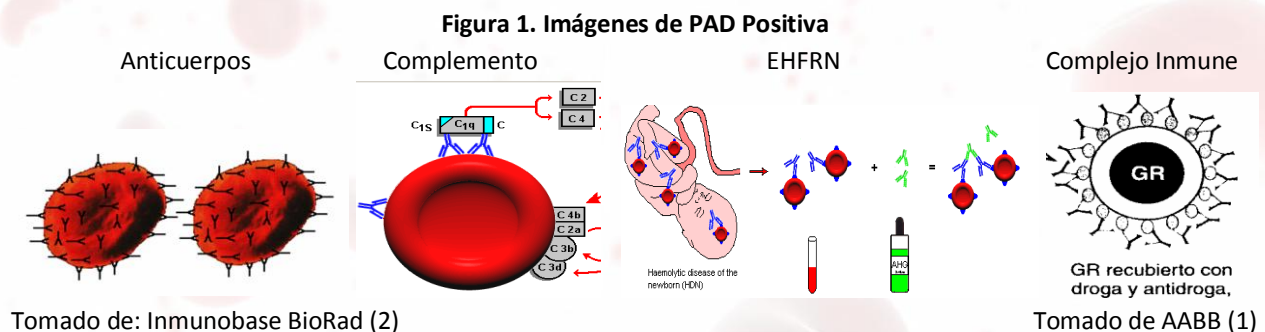
## COOMBS DIRECTO SIGNIFICADO E INTERPRETACIÓN, USO DE TÉCNICAS ESPECIALES EN INMUNOHEMATOLOGÍA.

La prueba de antiglobulina directa (PAD) o Coombs directo (CD) se emplea para determinar la existencia de glóbulos rojos recubiertos con inmunoglobulinas y/o complemento in vivo.

La PAD se utiliza principalmente para la investigación de reacciones transfusionales hemolíticas (RTH), enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (HDFN), anemia hemolítica autoinmunes (AIHA), y por la hemólisis inmune inducida por drogas.

La PAD positiva, con o sin acortamiento de la sobrevida eritrocitaria puede ser el resultado de:

1. Autoanticuerpos contra antígenos eritrocitarios intrínsecos. (Figura 1.)
2. Aloanticuerpos circulantes del receptor, que reaccionan con los antígenos eritrocitarios del donante, recientemente transfundidos.
3. Aloanticuerpos del plasma, derivados plasmáticos o sanguíneos del donante, que reaccionan con los antígenos eritrocitarios del receptor. (Figura 1.)
4. Aloanticuerpos en la circulación materna, que atraviesan la placenta y recubren los glóbulos rojos fetales. (Figura 1.)
5. Anticuerpos dirigidos contra ciertas drogas, que se fijan a la membrana eritrocitaria (por ejemplo, penicilina). (Figura 1.)
6. Proteínas adsorbidas, incluyendo inmunoglobulinas, acompañado de hipergamaglobulinemia o en receptores de altas dosis de gammaglobulina endovenosa, o la modificación de la membrana eritrocitaria por ciertas drogas, en particular del grupo de las cefalosporinas.
7. Complemento fijado a los glóbulos rojos. Esto puede ocurrir a causa de la activación del complemento por aloanticuerpos, autoanticuerpos, drogas o infección bacteriana.
8. Anticuerpos producidos por linfocitos pasajeros portados por órganos o componentes hematopoyéticos trasplantados. (1)





La PAD Positiva no siempre implica acortamiento de la supervivencia de los glóbulos rojos. Todos los eritrocitos parecen poseer pequeñas cantidades de IgG y complemento en personas sanas:

- IgG/glóbulo rojo: 5 – 90 moléculas.
- C3d/glóbulo rojo: 5-40 moléculas.

PAD positiva en donantes: 1/1000 a 1/14.000.

PAD positiva en pacientes hospitalizados: de 1% al 15%

Sin manifestaciones clínicas de destrucción inmunológica. (1, 3)

#### **Prueba de Antiglobulina Directa:**

En general, la PAD se realiza con antiglobulina humana poliespecífica (AHG), reactivo capaz de detectar IgG y C3d, si es positiva podría repetirse con reactivos anti-IgG y anti complemento específicos. Cuando se estudian muestras de sangres del cordón, solo se usa AHG anti-IgG por que la enfermedad hemolítica del feto y recién nacido resulta de la sensibilización de los glóbulos rojos fetales con anticuerpos IgG maternos y la activación del complemento casi nunca ocurre. (4)

#### **Evaluación de la PAD positiva.**

El grado de investigación de la PAD positiva depende de la clínica. La interpretación del significado de los hallazgos serológicos obliga a conocer el diagnóstico, los antecedentes terapéuticos, gestacionales y transfusionales recientes y la información referente a la presencia de anemia hemolítica adquirida o inexplicable. Los resultados de las pruebas serológicas no son diagnósticas; su relevancia debe examinarse junto con los datos clínicos y de laboratorio como el hematocrito, la bilirrubina, la haptoglobina y el recuento de reticulocitos.

El manual técnico de la AABB ed. 15 trae unos interrogantes que junto con las respuestas se puede ubicar con mayor facilidad el origen de una PAD positiva:

#### **1. ¿Existen signos de destrucción eritrocitaria “in vivo”?**

La presencia de reticulocitosis en el FSP, hemoglobinemia, hemoglobinuria, disminución de la haptoglobina sérica y elevación de la bilirrubina no conjugada o de la enzima (LDH) podrían indicar el incremento de la destrucción de glóbulos rojos. Si el paciente anémico con PAD positiva muestra signos de hemólisis corresponde investigar la posible etiología inmunológica.



**2. ¿El paciente fue transfundido en fecha reciente?**

Cuando el paciente recibió transfusiones en los tres meses previos, muchos profesionales intentan determinar la causa de la PAD positiva, porque la fijación de anticuerpos a los glóbulos rojos transfundidos en fecha reciente podría ser el primer indicador de una respuesta inmunológica en desarrollo.

La inmunización primaria los anticuerpos podrían aparecer de 7 a 10 días de la transfusión, en general entre 2 semanas y varios meses, y en la secundaria, a los 2 a 7 días en general dentro de 20 días; estos anticuerpos podrían acortar la vida media de los glóbulos rojos transfundidos.

Estudios mostraron que la PAD positiva y los eluados reactivos pueden persistir durante más de 300 días después de la reacción transfusional. (1, 5).

**3. ¿El paciente recibe drogas como las cefalosporinas, procainamida, penicilina endovenosa o  $\alpha$ -metildopa?**

Las cefalosporinas se pueden asociar con PAD positiva y las de 2da y 3ra generación con destrucción eritrocitaria inmunológica.

En un estudio pacientes que recibían procainamida (21%) desarrolló una PAD positiva (3 presentaron signos de anemia hemolítica).

Pacientes que recibieron Unasyn (39%) presentaron PAD positiva.

Pacientes medicados con  $\alpha$ -metildopa exhiben PAD positiva (15% -20%). El 1% produce anemia hemolítica. (1, 6)

**4. ¿El paciente recibió un trasplante medular, de células madre de sangre periférica o de órganos sólidos?**

Los linfocitos pasajeros del donante producen anticuerpos contra los antígenos ABO u otros antígenos que posee el receptor y determinan una PAD positiva. (1, 4)

**5. ¿El paciente recibe IG o IGRh endovenosa?**

La inmunoglobulina endovenosa (IGIV) puede contener anticuerpos anti-ABO, anti-D y a veces otros anticuerpos. La inmunoglobulina Rh (IGRh) puede determinar una PAD positiva en pacientes Rh positivo. (1, 7)



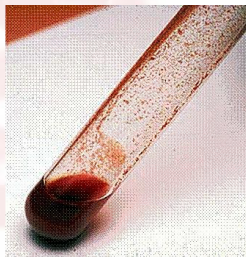
## 6. ¿El paciente tiene sepsis?

La activación del complemento puede ocurrir en pacientes con sepsis y conducir a hemólisis intravascular. Esto se observa en casos de Poliaglutinación inducida por organismos que producen neuraminidasas.

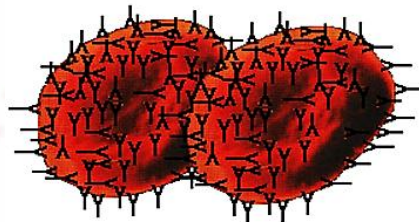
### Tratamiento de Glóbulos Rojos con PAD Positiva

Cuando la PAD positiva es altamente reactiva, crea inconvenientes en la hemoclasificación ABO y Rh (y generalmente da todo positivo (Figura 2.) y se corre el riesgo de reportar grupos sanguíneos equivocados cuando no se usa control celular.

Figura 2. Auto aglutinación PAD Positiva



Tomado de: Inmunobase BioRad (8)



Tomado de: Imágenes Baldo Castro (Casos) (9)



Métodos especiales en inmunohematología:

- Disociación/Elución (sin afectar los GR)
- Adsorción
- Auto-adsorción
- Elución (para estudio de Acs.)

Observación: las técnicas que se describen a continuación son en una forma resumida, si las quieren consultar para protocolizar están en el Manual técnico AABB (1) en la sección de métodos.

### Disociación o Elución por Calor:

- 1 volumen de GR - PAD+ lavar 3V/SS
- 1Volumen de Paquete GR. + 3 volúmenes de SS.
- Incubar a 45°C de 10 – 15 min. Agitando.
- Centrifugar y descartar sobrenadante.
- Evaluar con CD:



- CD+: repetir procedimiento (Hasta 3 veces)
- CD- : Evaluar Ags.

### **Disociación con Disphosphato de Cloroquina (DFC)**

Permite la disociación de los anticuerpos adheridos a los G. Rojos

- Es una solución iso-osmótica ( $300 \pm 20$  mOsm), a pH 7
- El complejo ag-ac es fracturado por el difosfatode cloroquina
- Mantiene intacta la membrana-Permite la determinación de:
  - Antígenos (hemoclasificación).
  - Autoadsorción.
  - No siempre disocia (puede variar en el mismo Ac)

#### **TECNICA:**

- GR lavados 3X
- Colocar 0.5 mL de GR (1 GR x 4 de DFC)
- Añadir 2 mL de DFC
- Incubar a T° ambiente Hasta 2 horas (1hora)
- Lavar 3 veces y controlar: CD

Limitaciones: No se puede dejar actuando la cloroquina más de 2 horas daña la membrana del G. Rojo y producir hemólisis, no elimina el complemento.

### **Disociación EDTA Glicina - Acida**

- La capacidad de disociar inmunoglobulina de los glóbulos rojos sin dañar la reactividad de los antígenos de superficie es de un gran valor al permitir que los glóbulos rojo se fenotipen.
- Técnica ideal para el tratamiento de G.R. revestidos de inmunoglobulina (CD+), como en la AHAI o EHRN
- El método de Ácido Glicínico EDTA es el procedimiento a elegir para la clasificación de glóbulos rojos revestidos de aloanticuerpos o autoanticuerpos IgG reactivos al calor.

#### **TECNICA:**

- GR lavados 3X y suspender 2-3ml del 3% – 5%
- Colocar 1.5 mL de la suspensión de GR. Centrifugar y descartar el sobrenadante.
- Añadir solución de EDTA+ Acido Glicínico.



- Incubar a T° ambiente hasta 2 min.
- Centrifugar y lavar 3 veces con SS.
- Realizar CD.

Comentario: Establecer grupo sanguíneo (Directa-Inversa). Trabajar únicamente el grupo por prueba directa y en placa, hay gran riesgo de transfusión incompatible. Si no se logra establecer el grupo sanguíneo y es necesario transfundir al paciente enviar G. Rojos grupo O (RhD-/+).

### Referencias:

1. Manual Técnico, “Prueba de antiglobulina directa positiva y destrucción inmunológica de los glóbulos rojos”. American Association of Blood Banks. Ed 15, 2005.
2. Immunobase .The educational and reference software programme for immunohaematology, including antibody database. DiaMed a Division of Bio-Rad. 2001
3. Garratty G. The significance of IgG on the red cell surface. Transfus Med Rev 1987; 1: 47-57.
4. Petz LD, Garratty G. Immune hemolytic anemias. 2nd ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone, 2004.
5. Heddle NM, Soutar RL, O’Hoski PL, et al. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. Br J Haematol 1995;91:1000-5.
6. Arndt PA, Garratty G. The changing spectrum of drug-induced immune hemolytic anemia. Semin Hematol 2005;42:137-44.
7. Garratty G. Problems associated with passively transfused blood group alloantibodies. Am J Clin Pathol 1998;109:769-77.
8. Immunobase .The educational and reference software programme for immunohaematology, including antibody database. DiaMed a Division of Bio-Rad. 2001
9. Baldo Castro C. Imágenes “Importancia del coombs directo” Diplomado Bco de sangre con énfasis en inmunohematología. P.U.J. 2014
10. Burin des Roziers N, Squalli S. Eliminación de anticuerpos IgG de glóbulos rojos intactos: comparación de métodos de ácido y EDTA, calor, y elución de cloroquina. Transfusion 1997; 37:497-501.