



IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES Y DISCREPANCIAS SEROLÓGICAS

Los aloanticuerpos antieritrocitarios, diferentes de los anticuerpos regulares (anteriormente llamados naturales) anti-A o anti-B se denominan inesperados o irregulares.

Aloanticuerpos: Anticuerpos dirigidos contra antígenos que el individuo no tiene mediante un proceso de inmunización.

La inmunización puede resultar de:

- Embarazos.
- Transfusiones.
- Trasplantes o administración de material inmunogénico.
- Anticuerpos adquiridos de forma pasiva: plasma de donantes, inmunoglobulinas inyectadas, linfocitos pasajeros provenientes de órganos o células progenitoras hematopoyéticas trasplantadas.
- De origen desconocido: en algunos casos ningún evento inmunizante específico es identificado, pueden ser anticuerpos naturales como resultado de la exposición a antígenos del medio ambiente, de origen bacteriano o viral, similares a los antígenos de grupo sanguíneo. (1)

Significado de los Aloanticuerpos

Los aloanticuerpos contra antígenos eritrocitarios podrían detectarse en cualquier estudio que utilice suero o plasma, la misma muestra que se utiliza para hemoclasificación y escrutinio de anticuerpos. En general, cuando se encuentran anticuerpos, es preciso determinar su especificidad y evaluar su significado clínico.

El significado clínico de los anticuerpos antieritrocitarios se caracteriza por que reducen la supervivencia de los glóbulos rojos transfundidos reacción adversa a la transfusión (RAT), o se asocian a enfermedad hemolítica del feto y recién nacido (EHFRN) (1)

¿Cuándo hay que Identificar los Anticuerpos?

- Cuando los estudios de detección de anticuerpos están positivos según los estándares (MNT) se hace necesario realizar Identificación de Anticuerpos Irregulares y con mayor razón si se trata de un paciente que va a recibir transfusiones, ya que se debe garantizar que el antígeno para el cual el receptor tiene el anticuerpo esté negativo en las unidades a transfundir.(2)



- Cuando tenemos un aprueba cruzada incompatible con escrutinio (EAI) negativo, descartando incompatibilidad ABO y/o C. Directo positivo en donante, lo más probable es que estemos frente a un anticuerpo contra un antígeno de baja incidencia. O anticuerpo con fenómeno de “efecto dosis” en el EAI.
- Cuando tenemos una prueba cruzada compatible y escrutinio de anticuerpos positivo, de todas maneras hay que identificar el anticuerpo presente, porque podemos estar frente a un fenómeno de “efecto dosis” en la prueba cruzada y generar una RAT tardía.
- Cuando tenemos una prueba cruzada incompatible y escrutinio de anticuerpos positivo, hay que identificar y realizar autocontrol para establecer anticuerpo contra antígeno de alta frecuencia o autoanticuerpos. (3)

¿Para qué sirve identificar anticuerpos?

- Para asignar significado clínico: (ver tabla 1) donde es importante recalcar los anticuerpos (Lewis, MNS, P, Lutheran y A1) que son de importancia clínica cuando se detectan a 37°C. en la tabla 2. Se observa además del comportamiento serológicos de los principales anticuerpos esta su capacidad para producir hemolisis en feto o recién nacido (HDFN) y/o reacción transfusional hemolítica (HTR).
- Para identificar anticuerpos adicionales ante nuevas sensibilizaciones en el receptor. Un 50% de personas sensibilizadas pueden hacer otro anticuerpo con nuevas transfusiones.
- Para estudios de Hemovigilancia.

Tabla 1. Significado Clínico de los Aloanticuerpos Comunes

ANTICUERPOS CLINICAMENTE IMPORTANTES	ANTICUERPOS BENIGNOS	ANTICUERPOS POSIBLEMENTE IMPORTANTES (REACTIVOS A 37 °C)	ANTICUERPOS RARAMENTE IMPORTANTES
ABO	Chido / Rodgers	Lewis	Yt (Yt ^a)
Rh	Xg (Xg ^a)	MNS (M, N)	Vel
Kell	Bg	P (P ₁)	Ge
Duffy	Knops	Lutheran	Do (Gy ^a , Hy)
Kidd	Cs ^a	A ₁	Sd ^a
Diego	JMH		
MNS (S, s)			

Tomado de: Dr. José Allison do Santos. (4)

Tabla 2. Serología de los principales anticuerpos.

Antibody	In-Vitro Hemolysis	Saline		Albumin		Papain/Ficin		Associated with	
		4 C	22 C	37 C	AHG	37 C	AHG	HDFN	HTR
Anti-M	0	Most	Some	Few	Few	0	0	Few	Few
Anti-N	0	Most	Few	Occ.	Occ.	0	0	Rare	No
Anti-S	0	Few	Some	Some	Most	See text		Yes	Yes
Anti-s	0	No	Few	Few	Most	See text		Yes	Yes
Anti-U	0	No	Occ.	Some	Most	Most	Most	Yes	Yes
Anti-Lu ^a	0	Some	Most	Few	Few	Few	Few	No	No
Anti-Lu ^b	0	Few	Few	Few	Most	Few	Few	Mild	Yes
Anti-K	0		Few	Some	Most	Some	Most	Yes	Yes
Anti-k	0		Few	Few	Most	Some	Most	Yes	Yes
Anti-Kp ^a	0		Some	Some	Most	Some	Most	Yes	Yes
Anti-Kp ^b	0		Few	Few	Most	Some	Most	Yes	Yes
Anti-Js ^a	0		Few	Few	Most	Few	Most	Yes	Yes
Anti-Js ^b	0		0	0	Most	Few	Most	Yes	Yes
Anti-Le ^a	Some	Most	Most	Some	Some	Some	Most	No	Rare
Anti-Le ^b	Some	Most	Most	Some	Some	Some	Most	No	No
Anti-Fy ^a	0		Rare	Rare	Most	0	0	Yes	Yes
Anti-Fy ^b	0		Rare	Rare	Most	0	0	Mild	Yes
Anti-Jk ^a	Some		Few	Few	Most	Some	Most	Mild	Yes
Anti-Jk ^b	Some		Few	Few	Most	Some	Most	Mild	Yes
Anti-Xg ^a	0		Few	Few	Most	0	0	No report	
Anti-Di ^a	0		Some	Some	Most	Some	Some	Yes	Yes
Anti-Di ^b	0			Most	Some	Some	Some	Yes	Yes

Tomado de: Manual Técnico AABB. (1)



¿Cómo identificar los anticuerpos?

Las técnicas de detección e identificación de anticuerpos son similares. Las de identificación pueden ser más focalizadas y en general se basan en los patrones de reactividad encontrados en las pruebas para detección.

Cada centro de transfusión debe establecer los métodos de detección e identificación de anticuerpos que emplearan de rutina. A veces es conveniente la confección de diagramas de flujo (Figura1) para guiar a los técnicos durante la selección de estudios adicionales para definir especificidades. (1)

La identificación de anticuerpos como cualquier proceso se puede dividir para su estudio por fases:

Fase Pre-analítica, Fase analítica y Fase Post-analítica. (3)

Fase Pre-analítica:

- Diagnóstico del paciente algunos ejemplos a tener en cuenta:
 - Enfermedades autoinmunes: el CD y EAI generalmente están positivos acompañados de fenómenos hemolíticos por autoanticuerpos y complemento.
 - Enfermedades hemato-oncológicas: necesitan de transfusiones periódicas y corren el riesgo de sensibilización.
 - Drepanocitosis y Talasemias: presentan alta frecuencia de aloanticuerpos.
 - Hipergamaglobulinemia o hipogamaglobulinemia: presentan altas o bajas concentraciones de anticuerpos y generan discrepancias.
 - Estados infecciosos o sépticos: cursan con CD positivos y hemólisis.
- Antecedentes transfusionales o gestacionales. En los casos donde se transfundió <de 3 meses con glóbulos rojos, es posible encontrar campo mixto en la hemoclasificación, en el caso de las multíparas es posible la alosensibilización.
- Los medicamentos, algunos pueden generar CD positivo y hemólisis en dosis altas o frecuentes
- Los registros previos, ayudan a conocer discrepancias o alosensibilizaciones anteriores.
- Etnia: en ciertos grupos étnicos están relacionados con antígenos negativos por ejemplo: Afroamericana (U- negativo, Js(b-), Fya-b-) mayor presencia de otros de importancia clínica. (3)



Fase Analítica:

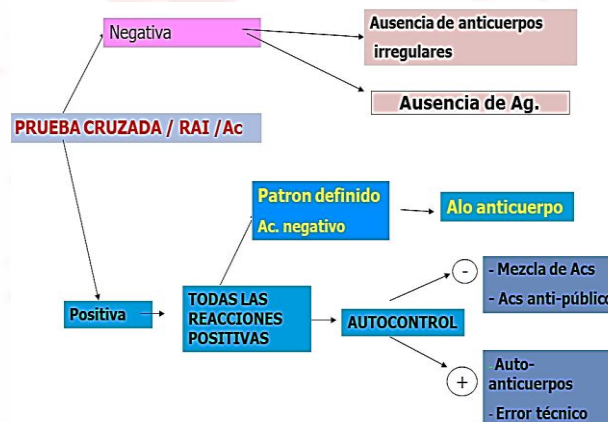
En Identificación de Anticuerpos Irregulares (IAI) la fase analítica es muy similar a la que se usan en las pruebas de detección como el EAI o RAI con células I, II o I, II y III. En IAI utilizamos paneles de glóbulos rojos previamente estudiados y estabilizados por las casas comerciales de: 11, 15 y 20 células.

Las células del panel provienen de distintos individuos. En conjunto, determinan un patrón distintivo de reacciones positivas y negativas para los diversos antígenos. (Ver Tabla 3)

Para que el panel sea funcional debe identificar con certeza los aloanticuerpos más significativos, los reactivos aprobados por la administración de alimentos y drogas (FDA) deben expresar los siguientes antígenos: D, C, E, c, e, M, N, S, s, p₁, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka y Jkb. Además es útil incluir células con doble dosis, para detectar anticuerpos que exhiben “efecto dosis” (Rh, Duffy, MNS y Kidd).

Cuando los reactivos no están en uso, deben guardarse en la nevera y no deben usarse más allá de la fecha de vencimiento. (1, 3)

Figura 1. Esquema de Identificación de Anticuerpos



Tomado de: Dr. José Allison do Santos. (4)

Control autólogo:

La AABB recomienda realizar el control autólogo o autocontrol al mismo tiempo que la IAI, colocando suspensión de células autólogas de acuerdo a la técnica empleada más suero o plasma autólogo. El suero que solo reacciona con los glóbulos rojos del panel suele contener aloanticuerpos, mientras que la reactividad con los del panel y los autólogos sugiere la presencia de autoanticuerpos o de auto y aloanticuerpos, casos que se verá en la charla sobre manejo de muestras con autoanticuerpos. (1, 5)



Técnicas básicas para Identificación de Anticuerpos

Para las investigaciones iniciales es común usar los mismos métodos y rangos de fases que en las pruebas de detección de anticuerpos (EAI) o compatibilidad, que mencionamos en el anterior resumen de pruebas pretransfusionales. Es importante recordar que no existe ningún procedimiento que detecte todos los anticuerpos en todas las muestras. Los laboratorios deben utilizar técnicas estándar para las pruebas de rutina y tener acceso a algunos enfoques alternativos.

En ocasiones para poder determinar un anticuerpo o mezclas es necesario combinar técnicas como: IAI en Coombs y enzimática, algunos anticuerpos (por ejemplo, anti-M, N, P₁, Lea, Leb, A1) que reaccionan a temperatura ambiente son más potentes a temperaturas más bajas. Todas las pruebas deben incluir controles autólogos. (1)

Interpretación de los resultados

Los resultados de la investigación de anticuerpos se interpretan como positivos o negativos, de acuerdo con la presencia o ausencia de reactividad (graduación de la aglutinación) ver figura 2. Las reacciones se comparan con los patrones antigénicos expresados por las células del panel, para asignar la especificidad. Cuando está presente un único aloanticuerpo, se producen reacciones positivas y negativas definidas que dan un patrón antigénico neto. (1)

Tabla 3. Mapa antigénico

Panel de identificación

	Rh-hr				Kell		Duffy		Kidd		Lewis		P	M N S s				Paciente	
	D	C	E	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Test LCI	Enzima
1	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	2+	0
2	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0
3	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	2+	0
4	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	1+	0
5	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	1+	0
6	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	2+	0
7	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	2+	0
8	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0
9	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	2+	0
11	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0
autocontrol																		0	0

Tomado de: Dra. Anna Ester Condins (5)

Figura 2. Grados de aglutinación 3 Tecnologías.

Grading	Capture R	Hemagglutination	Gel / CAT
4+			
3+			
2+			
1+			
0 negative			

Tomado de: Imágenes IMMUCOR (6)



Exclusión:

En la interpretación de los resultados del panel identificador de anticuerpos es común excluir especificidades por la ausencia de reactividad con el suero analizado. Este sistema en ocasiones se denomina método por “descarte”.

Aunque el método de descarte a menudo identifica especificidades simples, debe considerarse como un paso provisional, sobre todo si se basa en la ausencia de reactividad por células heterocigotas, sería necesario utilizar paneles especiales o extendidos para determinar el anticuerpo.

Cuando existe variaciones en las especificidades, si se sospecha una mezcla de aloanticuerpos es necesario realizar paneles combinados (Coombs + Enzima), uso de paneles extendidos y técnicas de absorción selectiva y estudios de eluados.

Fase Pos-analítica

Está relacionada con los cálculos de cuantas unidades hay que cruzar en un evento transfusional de acuerdo a la incidencia del antígeno implicado (regla de 3) y la demostración del antígeno negativo tanto en las unidades a transfundir como en el fenotipo del paciente.

Discrepancias serológicas

Interpretación de los resultados de los estudios pretransfusionales, una vez realizado el escrutinio de anticuerpos irregulares y las pruebas cruzadas de compatibilidad transfusional, nos podemos encontrar ante las siguientes situaciones:

- **Escrutinio de anticuerpos negativos y prueba cruzada compatible**
 - La inmensa mayoría de las muestras estudiadas (98%) van a presentar esta situación de negatividad en el escrutinio de anticuerpos y compatibilidad con los hematíes del donante.
 - Esta situación no garantiza la ausencia de un anticuerpo indetectable por la tecnología utilizada, así como un rendimiento transfusional de los hematíes inferior al esperado.
- **Escrutinio de anticuerpos positivo y prueba cruzada incompatible**
 - Puede ser debido a la presencia de aloanticuerpos, autoanticuerpos, problemas con los reactivos, o a la formación de aglutinaciones anómalas (“rouleaux”).
 - Hay que identificar el problema antes de la emisión de la unidad para su transfusión, a menos que la necesidad de su administración sea urgente y vital.



- Si no existe tiempo para realizar el estudio dada la necesidad imperiosa de su administración:
- El médico responsable del Banco de Sangre debe notificar al médico responsable del paciente los riesgos potenciales de su administración.
 - Hay que valorar el riesgo de muerte del receptor debido a la transfusión de sangre incompatible con el riesgo de muerte al no recibir la transfusión.
- La prueba cruzada incompatible, se debe normalmente a la presencia de un aloanticuerpo, máxime en este caso que el escrutinio ha sido positivo:
- Hay que realizar un panel para identificar el tipo y especificidad del anticuerpo.
 - Buscar dentro de las unidades de sangre ABO y Rh compatibles aquellas que sean negativas para el antígeno contra el que va dirigido el anticuerpo encontrado.
 - Realizar una nueva prueba cruzada de compatibilidad con las unidades de sangres seleccionadas, libres del antígeno involucrado.
 - Si se detecta la existencia de anticuerpos múltiples y no se puede detectar todas las identidades de los mismos, habrá que realizar un estudio en los Centros de Referencia. (5)
- Si al realizar el estudio de anticuerpos se detecta una positividad en el autocontrol, hay que verificar la historia del transfusional del paciente:
- Si el paciente ha sido transfundido en los últimos 2-3 meses, puede existir un aloanticuerpo que este reaccionando con las células del donante transfundidas.
 - Una aglutinación mixta es frecuentemente encontrada, pero sólo las células del donante positivas para el antígeno, reaccionan con el anticuerpo.
 - Hay que realizar un procedimiento de elución para eliminar el anticuerpo fijado a las células para su identificación y especificidad.
- Anticuerpos fríos potentes pueden causar problemas en el tipaje ABO y Rh, así como en el escrutinio de anticuerpos irregulares y en las pruebas cruzadas de compatibilidad:
- La especificidad más común es un Anti-I.



- Es importante determinar si los anticuerpos fríos pueden estar enmascarando un aloanticuerpo clínicamente significativo.
 - Hay que utilizar todos los elementos (hematíes, suero, solución salina) previamente calentados.
 - Hay que realizar una autoadsorción en frío con el fin de eliminar los anticuerpos fríos. (5)
- **Escrutinio de anticuerpos negativos y prueba cruzada incompatible**
- La causa más común es que la unidad de sangre cruzada tenga una test de antiglobulina directo positivo. Siempre que el escrutinio de anticuerpos irregulares sea negativo y la unidad cruzada sea incompatible, hay que realizar un test de antiglobulina directo a la unidad de sangre.
 - Raramente las reacciones positivas en las pruebas cruzadas pueden ser debidas a anticuerpos de muy baja incidencia, presentes en los hematíes del donante pero ausentes en las células del panel de escrutinio de anticuerpos irregulares. Hay que realizar en primer lugar un test de antiglobulina directo y en el caso que sea negativo, realizar un panel más amplio para detectar el anticuerpo de baja frecuencia implicado.
 - Repetir el grupo ABO en la muestra de los hematíes de la unidad o del propio donante, por si han existido errores previos en la identificación del grupo ABO del hemocomponente.
 - Las causas más frecuentes de que nos encontremos ante un estudio de anticuerpos irregulares negativo y una prueba cruzada incompatible realizada a temperatura ambiente son:
 - Hematíes del donante ABO incompatibles (repetir el grupo ABO de los hematíes de la unidad).
 - Presencia de un Anti-A1 en el suero de pacientes A2 o A2B.
 - Presencia de aloanticuerpos reactivos a temperatura ambiente, de muy baja incidencia (realizar una identificación con paneles más amplios, con incubación a temperatura ambiente) (5)



Referencias:

1. Manual Técnico, “Detección inicial e identificación de los aloanticuerpos contra antígenos eritrocitarios”. American Association of Blood Banks. Ed 15, 2005.
2. Manual de Normas Técnicas. Res. N° 00901 de 1996 Capitulo 7 Transfusión Sanguínea 7.1.3 Pruebas de compatibilidad. MSP. 1996.
3. Dr. Carlos Alberto González. “Identificación de anticuerpos irregulares”. Curso de inmunohematología aplicada. 2011.
4. José Allison dos Santos. “Serología de Grupos sanguíneos” Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional; 2008.
5. Dra. Anna Ester Condins. Unidad didáctica 2: Pruebas pretransfusionales y administración de componentes sanguíneos Banc de Sang i Teixits. Badalona .España 2006.
6. Presentaciones de Capture. “Capture educational seminar” Immucor. 2010