



## COMPATIBILIDAD EN FENÓMENOS HEMOLÍTICOS ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE Y ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL FETO Y RECIÉN NACIDO

### Anemias Hemolíticas Autoinmunes

En la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) la hemólisis aumentada se produce por la presencia en la superficie eritrocitaria de anticuerpos dirigidos contra constituyentes antigénicos de los hematíes. Se conoce poco sobre los mecanismos de producción de estos autoanticuerpos. Probablemente, en el organismo siempre hay clones de linfocitos B capaces de producir autoanticuerpos, pero su actividad está frenada por la acción reguladora de los linfocitos T. Cuando se pierde este mecanismo autorregulador se producen autoanticuerpos en cantidades suficientes para desencadenar la destrucción de los hematíes. Algunas enfermedades (infecciones víricas, neoplasias, enfermedades sistémicas) estimulan la producción de autoanticuerpos antieritrocitarios y originan AHAI secundarias. Si no se halla una enfermedad subyacente se denominan AHAI idiopáticas. (1)

### Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes

Se caracteriza porque los autoanticuerpos actúan a la temperatura del organismo (37 °C), son de clase IgG y la hemólisis es predominantemente extravascular. Esta es la AHAI más frecuente (48 – 70%). (2)

### Etiología

Puede ser idiopática o secundaria. La frecuencia de una y otra varía mucho según las series publicadas. Las enfermedades asociadas con mayor frecuencia son el lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunes, leucemia linfocítica crónica, linfomas y, excepcionalmente, el quiste de ovario entre otras menos comunes. Se presentan a cualquier edad (aunque son más frecuentes en los adultos) y predominan en el género femenino, sin que exista relación con el número de embarazos o de hijos.

### Hallazgos serológicos:

Signos generales de toda hemólisis. Examen morfológico de los hematíes: anisocitosis, poiquilocitosis, policromasia y esferocitosis. Haptoglobina muy disminuida o indetectable. En los hematíes del paciente se detecta una PAD positiva con suero antiglobulina humana poliespecífico. Si se emplean sueros antiglobulina humana mono-específicos, los resultados son casi siempre positivos con suero anti-IgG y, a veces, con antisuero frente a la fracción C3 del



complemento. Utilizando técnicas especiales (físicas o químicas) es posible la separación (elución) del anticuerpo de los determinantes antigénicos del hematíe.

En el suero del paciente se detecta también mediante la PAI un anticuerpo que, por regla general, reacciona con todos los hematíes del panel eritrocitario.

Es importante realizar la elución del anticuerpo y determinar su especificidad tanto en el eluido como en el suero, ya que ello permite la diferenciación entre un aloanticuerpo y un autoanticuerpo. Si la PAD y el estudio del eluido y del suero dan resultados negativos se pueden utilizar técnicas más sensibles. Es útil conocer si la Ig es de clase IgA o IgM, aun cuando estos tipos de AHAI son muy poco frecuentes. Algunos casos de AHAI se acompañan de trombocitopenia de origen inmune, lo que constituye el síndrome de Evans. (1, 2)(Ver tabla 1)

Tabla 1. Características de Anemias Hemolíticas Autoinmunes

|               | AHAI "caliente"   | Síndrome por aglutinas frías | AHAI mixta                                | Hemoglobinuria Paroxística a frigore                                   |
|---------------|---|------------------------------|---|--|
| PDATG         | IgG<br>IgG+C3<br>C3   | Sólo C3                      | IgG+C3<br>C3                              | Sólo C3  |
| Clase de Ig   | IgG   | IgM                          | IgG, IgM                                  | IgG  |
| Eluido        | Ac IgG  | No reactivo                  | Ac IgG                                    | No reactivo  |
| Suero         | Ac IgG reactivo en la PIATG en >50% de pacientes                                | Ac IgM aglutinante           | Ac IgG en la PIATG más Ac IgM aglutinante | PIATG negativa. Hemolisina bifásica en la prueba de Donath-Landsteiner |
| Especificidad | En general, reactividad con todos los hematíes. A veces especificidad relativa. | Habitualmente anti-I.        | Habitualmente poco clara                  | Anti-P   |

Tomado de: Garrett F. Bass a, Emily T. Tuscano (3)

### Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos

Los anticuerpos fríos o crioaglutininas reaccionan mejor con su Ag correspondiente a bajas temperaturas. Aunque estos anticuerpos se hallan normalmente en el suero carecen de significación clínica, pero cuando su amplitud térmica aumenta pueden causar hemólisis. Este aumento se acompaña además de un título muy elevado del anticuerpo en suero. Suelen ser de clase IgM, aunque se han descrito algunos de clase IgA y, muy rara vez, IgG. La especificidad del autoanticuerpo suele ir dirigida contra los Ags del sistema Ii.



### **Etiología**

No se conoce bien el origen de los autoanticuerpos fríos. Su aumento en título y en amplitud térmica puede estar relacionado con una respuesta inmunológica policlonal a algunos virus. Su actividad depende de su capacidad para fijar la fracción C3 del complemento sobre la superficie eritrocitaria, lo que originará una hemólisis intravascular. La acción de un inactivador del C3 limita la hemólisis intravascular, pero los hematíes que llevan en su membrana fragmentos del complemento son eliminados de la circulación, principalmente por los macrófagos del hígado. La AHAI por anticuerpos fríos se asocia a menudo a infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*, mononucleosis infecciosa y otras infecciones víricas. Algunas veces se asocia a leucemia linfocítica crónica u otras neoplasias linfoproliferativas. Las formas idiopáticas son más frecuentes en personas de edad avanzada sin que exista predominio de sexo. (1)

### **Hallazgos serológicos:**

Son los propios de toda anemia hemolítica (reticulocitosis, hiperbilirrubinemia, entre otros). En sangre periférica suelen observarse esferocitos. La PAD puede ser positiva con suero antiglobulina poliespecífico, negativa con suero antiglobulina mono-específico anti-IgG y positiva con suero mono-específico anti-C3-C4. La característica de este tipo de anemia hemolítica es el aumento en suero del título de los anticuerpos que actúan a bajas temperaturas y tienen capacidad aglutinante a temperaturas superiores a 30 °C. La mayoría de los autoanticuerpos tienen una especificidad anti-Ii. La especificidad anti-I ocurre en casos secundarios a una neumonía por *Mycoplasma* y los anti-i son posteriores a la mononucleosis infecciosa. Con menor frecuencia, los anticuerpos fríos tienen otras características, como sucede con los anti-Pr, que aglutinan in vitro tanto a los hematíes I como a los i, pero pierden su actividad al ser tratados con enzimas proteolíticas. (2, 4)

### **Hemoglobinuria paroxística a frigore**

Es la más infrecuente de las AHAI. Se asocia a la sífilis terciaria y a algunas infecciones víricas, como mononucleosis infecciosa, parotiditis, infección por citomegalovirus y sarampión.

### **Hallazgos serológicos:**

En el suero de los pacientes se detecta la hemolisina bifásica o de Donath Landsteiner. Este autoanticuerpo se fija a los hematíes cuando se incuban con el suero a 4 °C y los hemoliza a 37 °C. El suero ha de ser fresco o aportar complemento a la reacción. El autoanticuerpo tiene especificidad de grupo sanguíneo anti-P y clase IgG. La PAD puede ser débilmente positiva con sueros poliespecíficos y mono-específicos anti-IgG y anti-C3-C4.



**Transfusión en pacientes con autoanticuerpos calientes:**

Cuando el suero contiene autoanticuerpos, podría ser difícil descartar la presencia de aloanticuerpos, de manera que el riesgo de reacciones se incrementa.

**Manejo de los autoanticuerpos:**

Uno de los métodos más usados para eliminar autoanticuerpos es la **autoadsorción o adsorción autóloga,**

**Adsorción autóloga:**

- Finalidad: eliminar el Autoanticuerpo y luego detectar aloanticuerpos.
- Válido: si no fue TF recientemente (3 meses)
- Preparar previamente los GR (elución) Calor: 45-50°C por 10 a 15 min.

**Adsorción Autóloga Polietilenglicol (PEG)**

El Polietilenglicol (PEG) aumenta la adsorción de Acs. Por G. Rojos no tratados.

- Este método puede utilizarse para la adsorción autóloga y alogénica (ABO compatible de fenotipo conocido).
- Está indicado como un aditivo para mejorar la sensibilidad en la detección de anticuerpos. Crea un entorno de prueba de baja fuerza iónica, que aumenta la tasa de absorción de anticuerpos durante la incubación.
- Reactividad del suero RAI(1+): 1 adsorción
- Reactividad del RAI (2+y3+): 2 a 3 adsorciones
- Para evaluar el suero absorbido utilizar el doble de muestra, para ajustar la dilución del suero con PEG.
- Se debe evaluar el suero absorbido el mismo día.

**Técnica:**

- Tomar de 2 a 3 paquetes de Glóbulos rojos previamente lavados 3V. con SS entre 0.5 a 1cm por paquete.
- Rotular los tubos (1, 2, o 3) al tubo 1 se le agrega la misma cantidad de PEG del paquete globular y la misma cantidad de suero o plasma.
- Incubar por 15 minutos a 37°C. centrifugar y pasar el sobrenadante al tubo 2 (sin agregar nada)
- Incubar por 15 minutos a 37°C. centrifugar y pasar el sobrenadante al tubo3.
- Centrifugar y separar el sobrenadante.



- Realizar un EAI o RAI con células I y II o I, II, y III. Y observar:
  - EAI negativo post absorción: presencia de autoanticuerpos, compatibilizar.
  - EAI Positivo con patrón definido uno positivo y otro negativo: probable mezcla de autos y aloanticuerpos, compatibilizar
  - EAI Positivo con el mismo patrón del EAI inicial (3+ a 4+) buscar otro método de adsorción probables autoanticuerpos con alta reactividad. (2)

### Adsorción Autóloga ZZAP

es una solución de sulfidril/enzima diseñada para la disociación de IgG de los glóbulos rojos para el procedimiento de autoadsorción en caliente.

- El reactivo se base en el reactivo ZZAP descrito por Branch y Petz (6)
- Reduce las uniones disulfuro (-S-S-) mediante un H+ (-SH, HS-)
- Subunidades IgM se separan de la cadena "J" y pierden su actividad.
- DTT y 2-ME inactiva los antígenos Jsay Jsb
- DTT inactiva todos antígenos del sistema Kell(excepto Kx), Kna, Yta, JMH
- La técnica está descrita en el Manual técnico AABB ed. 15. (2) O se obtiene comercialmente con el nombre de WARM.

### Adsorción Homologa:

Cuando no se conoce el fenotipo Rh del paciente y existe una transfusión reciente que no permite determinarlo de una manera objetiva, la selección de los hematíes para las adsorciones conlleva mayor complejidad. En esta situación se debe investigar escrupulosamente la posibilidad de que algún anticuerpo de especificidad Rh pueda quedar oculto por el autoanticuerpo y, por ello, se requieren 3 tipos de células de fenotipo diferente: (ver tabla 2)

Si se utilizan hematíes tratados con enzimas podemos ignorar el sistema Duffy, o de lo contrario una célula deberá ser Fya(-) y otra, como mínimo S(-).

Tabla 2.

| Fenotipo de los hematíes                                      | Permanecen en el suero                        |
|---|---|
| R1R1 <u>kk</u> <u>ss</u> <u>Jk(a+b-)</u> <u>Fy(a+b-)</u>      | c, E, K, S, Jk <sup>b</sup> , Fy <sup>b</sup> |
| R2R2 <u>kk</u> <u>SS</u> <u>Jk(a+b-)</u> <u>Fy(a+b-)</u>      | C, e, K, s, Jk <sup>b</sup> , Fy <sup>b</sup> |
| <u>rr</u> <u>kk</u> <u>ss</u> <u>Jk(a-b+)</u> <u>Fy(a-b+)</u> | C, D, E, S, Jk <sup>a</sup> , Fy <sup>a</sup> |

Tomado de: E. Muñiz (5)



### **Diagnóstico y Prevención de la Enfermedad Hemolítica del Feto y del Recién Nacido.**

El papel del laboratorio de Inmunohematología en la Enfermedad Hemolítica del Feto y del Recién Nacido (EHFRN) es múltiple y muy amplio, pues abarca todos los aspectos relacionados con el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de esta complicación inmunológica de la gestación. Ente sus competencias se incluyen la realización de las pruebas analíticas que nos permiten establecer el diagnóstico, orientar el pronóstico y decidir las medidas preventivas más adecuadas.

#### **La Aloinmunización materna**

El control inmunohematológico de las gestantes es obligatorio, y tiene como objetivos: detectar precozmente la presencia de aloinmunización, identificar a las mujeres con riesgo de inducir una EHRN, y seleccionar adecuadamente a las mujeres Rh(D) negativo no sensibilizadas que pueden y deben beneficiarse de la administración profiláctica de Gammaglobulina anti-D (IgG anti-D).

#### **Estudio inmunohematológico de la gestante**

En el curso de la primera visita al obstetra (10-16 semanas de gestación) deben realizarse las siguientes pruebas analíticas en todas las gestantes:

- Determinación del grupo ABO y del factor Rh (D).
- Escrutinio de anticuerpos eritrocitarios irregulares (EAI), tanto en las mujeres Rh(D)-negativo como en las Rh(D)-positivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos se efectuará un seguimiento específico dependiendo del carácter positivo o negativo del grupo sanguíneo Rh (D) y de que la gestante se encuentre o no sensibilizada. (5)

#### **Pruebas y determinaciones analíticas a realizar en las gestantes sensibilizadas**

Cuando el anticuerpo se desarrolla durante el primer embarazo, raramente suele detectarse antes de las 28 semanas y, lo más habitual, es que se detecte en las últimas semanas o, incluso, después del parto. Además, la concentración de anticuerpo suele ser baja. El RN raramente muestra signos clínicos de enfermedad hemolítica y únicamente suele presentar una prueba directa de antiglobulina positiva. (5)



### Titulación y/o cuantificación del anticuerpo materno

- Continúa siendo el primer recurso técnico para el seguimiento de la aloinmunización materna.
- Permite detectar el “título crítico” a partir del cual pueden estar indicadas otras pruebas u otras exploraciones de carácter más invasivo.
- Para anti-D, por debajo del título crítico de 128 (tubo), excepcionalmente habrá afectación fetal.
- Se valora la tendencia del mismo, y un aumento súbito de 2 diluciones puede ser significativo.
- La precisión del resultado depende del grado de estandarización de la técnica.
- Anti-D debe titularse con R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>.
- El resto de anticuerpos deben titularse con hematíes heterocigotos.
- No conocemos el título crítico para otras especificidades.
- Anti-K carece de título crítico: inhibe la eritropoyesis fetal.
- Los títulos de referencia se han obtenido con la técnica en tubo.
- En tarjeta, el título suele superior en 2 diluciones. (5)
- 

### Diagnóstico postnatal de la EHRN

En los RN de madres Rh (D) negativo no aloinmunizadas es obligatorio obtener una muestra de sangre del cordón y una muestra de sangre materna. Con la primera determinaremos el grupo Rh (D) y en caso de resultar positivo administraremos la dosis de IgG anti-D preceptiva. Además, se efectuará una prueba directa de la antiglobulina que nos permitirá detectar, si resulta positiva, la presencia de un anti-D desarrollado al final del embarazo. Este análisis estará especialmente indicado siempre que se observen signos compatibles con EHRN, o si se sabe que la madre es portadora de un aloanticuerpo distinto al anti-D, capaz de producir EHRN.

El hallazgo de una prueba directa positiva puede sugerir la existencia potencial de un proceso hemolítico, sin embargo el grado de aglutinación no se correlaciona con la gravedad de la hemólisis. La cifra de hemoglobina en la muestra de cordón si se correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

Para confirmar la especificidad del anticuerpo se debe examinar el suero/plasma procedentes de la madre o de la muestra de cordón.

La elución del anticuerpo de la muestra de cordón también puede ser muy útil. Si la prueba directa de la antiglobulina es positiva y la investigación de anticuerpos irregulares en la madre



es negativa, cabe la posibilidad de que se trate de una incompatibilidad ABO o que un aloanticuerpo dirigido contra un antígeno de baja frecuencia sea el responsable. La primera posibilidad se excluirá enfrentando el eluido a hematíes A1 y B. Para confirmar la segunda posibilidad, el eluido deberá resultar positivo frente a los hematíes del padre, aunque la caracterización definitiva del anticuerpo y su especificidad probablemente exigirán diferir la muestra a un laboratorio de referencia. (5)

**Alternativas de uso en exsanguinotransfusión:**

Se ha demostrado que la causa más común de enfermedad hemolítica del recién nacido moderada o severa es el anti-D, pero no es el único, ya que cualquier antígeno de otros sistemas que produzcan inmunización y respuesta inmunológica con anticuerpos IgG pueden causar enfermedad hemolítica del recién nacido.

En el cuadro II (ver Tablas 3.) puede observarse qué antígenos están bien desarrollados al nacimiento y cuáles no están desarrollados o incluso ausentes; dependiendo de esta característica, los antígenos más desarrollados al nacimiento serán los que tendrán un curso clínico más grave.

Es fundamental encontrar sangre compatible para el recién nacido que requiere exsanguinotransfusión y hay que ser muy riguroso en la elección del concentrado eritrocitario y del plasma que se van a utilizar para este fin. En los cuadros III y IV (Tablas 3) se muestran las alternativas de uso en exsanguinotransfusión en la enfermedad hemolítica del recién nacido por sistema ABO, sistema Rh y otros sistemas. (7)

Tablas 3.

| <b>Cuadro II</b><br>Desarrollo de antígenos eritrocitarios en células de cordón |            |                      | <b>Cuadro III</b><br>Alternativas de uso en exsanguinotransfusión en la enfermedad hemolítica del recién nacido por ABO y anti-D |            |            |             | <b>Cuadro IV</b><br>Alternativas de uso en exsanguinotransfusión en enfermedad hemolítica del recién nacido por otros anticuerpos (C, E, Fya, Jka, K1) |             |            |                   |
|---|------------|----------------------|--|------------|------------|-------------|--|-------------|------------|-------------------|
| Desarrollados   | Débilmente | Muy débil o ausentes | Madre  | Hijo       | C, E       | Plasma      | Madre  | Hijo        | C, E       | Plasma            |
| Colton  | ABH        | Chido                | O negativo   | A positivo | O negativo | A positivo  | O positivo   | O positivo  | O positivo | O positivo        |
| Rh  | P          | Lewis                |  |            |            | AB positivo | O positivo   | O positivo  | O positivo | A, B, AB positivo |
| Duffy   | Lutheran   | Rodger               | O negativo   | B positivo | O negativo | B positivo  | B positivo   | B positivo  | O positivo | B positivo        |
| Kidd  | Holley     | I                    |  |            |            | AB positivo | A positivo   | A positivo  | O positivo | AB positivo       |
| Kell  |            | Sid                  | O positivo   | A positivo | O positivo | A positivo  | A positivo   | A positivo  | O positivo | A positivo        |
| Diego   |            | Vel                  |  |            |            | AB positivo | B positivo   | B positivo  | O positivo | AB positivo       |
| I   |            | Yta                  | O positivo   | B positivo | O positivo | B positivo  | AB positivo  | AB positivo |            | AB positivo       |
| MNSU  |            |                      |  |            |            | AB positivo |  |             |            |                   |

*El concentrado eritrocitario deberá ser negativo al antígeno implicado*

Tomado de: María Leonor Portillo-López (7)

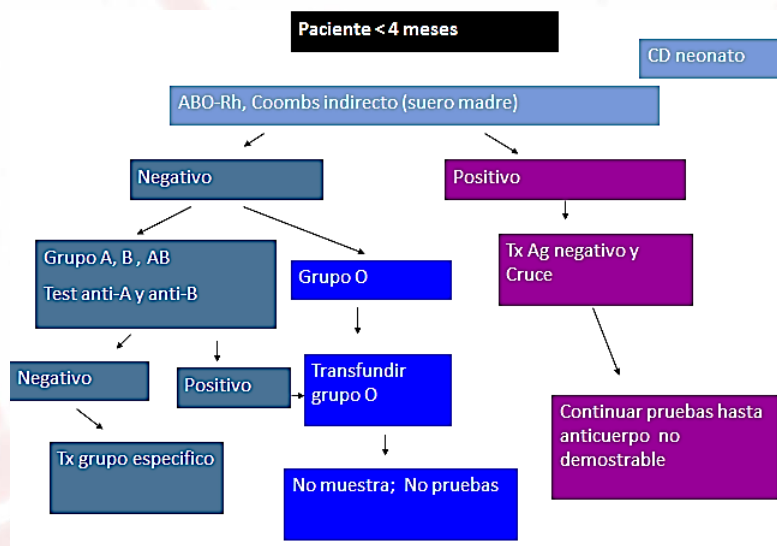


### ¿Cómo podemos reducir o evitar la EHRN?

Impidiendo la aloinmunización

- Cumpliendo estrictamente el programa profiláctico con Ig-anti-D.
- Evitando las transfusiones en mujeres en edad fértil.
- Respetando la compatibilidad c y K.
- Educación sanitaria de los profesionales implicados, de la población en general.
- Recuperando el control del programa profiláctico.
- Consenso con los obstetras.

Gráfico 1. Esquema de transfusión en menores de 4 meses:



Tomado de: Dr. Armando cortes (9)

### Referencias:

1. Dra. Carmen Martín Vega. Dr Eduardo Muñoz-Díaz. "Anemia Hemolítica autoinmune" Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona 2006.
2. Manual Técnico, "Prueba de antiglobulina directa positiva y destrucción inmunológica de los glóbulos rojos". American Association of Blood Banks. Ed 15, 2005.
3. Garrett F. Bass a, Emily T. Tuscano Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia Autoimmun Rev (2014).



4. Petz LD, Garratty G. Immune hemolytic anemias. 2nd ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone, 2004.
5. E. Muñiz-Díaz. Jefe de Inmunohematología. Diagnóstico y prevención de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. Protocolo de Consenso. Banco de Sangre y Tejidos. Barcelona (España).
6. Branch DR, Petz LD. A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. Am J Clin Pathol 1982;78:161-7.
7. María Leonor Portillo-López, María Teresa de Jesús Álvarez-Torres, Protocolos de estudio de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2005; 43 (Supl 1): 37-40
8. Dr. Armando Cortes. Transfusión en Neonatos Jefe Dpto Patología Facultad de Salud Univalle 2005.