

## Artículos originales

Instituto de Hematología e Inmunología

### PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ERITROCITARIOS

Lic. Yalile Alfonso Valdés y Lic. Antonio Bencomo Hernández

#### RESUMEN

En Inmunohematología se ha desarrollado una amplia gama de procedimientos de detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios *in vitro*, por lo cual se realiza una revisión de técnicas y métodos empleados con este objetivo, como son el método que utiliza eritrocitos pretratados con enzimas proteolíticas y las técnicas de Polibreno, que utiliza solución de baja fuerza iónica (LISS), la de antiglobulina indirecta, la de aglutinación en gel, la inhibición de la aglutinación, la hemólisis y la adherencia de eritrocitos en fase sólida. Se abordan los problemas que afectan a la reacción de aglutinación entre el antígeno y el anticuerpo; para una mejor comprensión la reacción de aglutinación se subdivide en su primera y segunda etapa. En la primera etapa los factores que se analizan son concentración de antígeno y anticuerpo, pH, temperatura, fuerza iónica y tiempo de incubación; en la segunda etapa la característica del anticuerpo, localización y número de sitios antigénicos, fuerzas que mantienen la distancia entre los eritrocitos, uso de la albúmina bovina, uso de enzimas, efecto de dosis y efecto de moléculas con carga positiva.

*DeCS:* REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO/inmunología; ERITROCITOS; SITIOS DE ENLACE DE ANTICUERPOS; TECNICAS INMUNOLOGICAS.

Los requerimientos transfusionales de la mayoría de los pacientes que necesitan de una transfusión sanguínea, se cumplen al administrar sangre de donantes de igual fenotipo ABO y RhD que la del paciente. Numerosos antígenos de grupos sanguíneos diferentes al A, B y RhD son ignorados en el acto transfusional, debido a que muy pocas personas poseen

anticuerpos dirigidos contra alguno de ellos.<sup>1</sup>

Del 0,5 al 1,5 % de los pacientes presentan anticuerpos resultantes de la exposición a células extrañas que ingresaron al organismo por vía transfusión o embarazo. Estos anticuerpos eritrocitarios se pueden detectar e identificar por diferentes procedimientos, sin embargo, existen

factores que afectan la reacción entre el anticuerpo y el antígeno, los factores pueden estar asociados con el antígeno, con el anticuerpo y con las condiciones de la reacción.<sup>1,2</sup>

Los factores relacionados con el antígeno incluyen el número de sitios antigénicos, las interacciones génicas, la dosis, el sitio que ocupa el antígeno sobre la superficie eritrocitaria, la edad de las células y las condiciones de almacenaje de estas. Entre los factores relacionados con el anticuerpo se encuentran la capacidad para fijar el complemento, la influencia que sobre la reacción tienen el uso de suero o plasma, el fenómeno de *rouleaux* y la contaminación bacteriana.<sup>2</sup>

Las condiciones de la reacción incluyen el pH, la relación entre la concentración de antígeno y anticuerpo, la temperatura, el tiempo de incubación, la centrifugación, la fuerza iónica y por último, el tipo de medio, es decir, si para la reacción se utiliza un medio salino, albuminoideo, enzimático o se usa el reactivo antiglobulínico.<sup>2</sup>

## **REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO EN INMUNOHEMATOLOGÍA**

La alteración antígeno-anticuerpo puede verse en diferentes contextos; uno de estos es la reacción de aglutinación de los eritrocitos, que se discutirá a continuación, pues es el fenómeno que por lo general ocurre en la mayoría de las técnicas que se realizan en Inmunohematología.

Existen 2 requisitos para que la reacción antígeno-anticuerpo se produzca: uno es la adecuada complementariedad de encaje, podrán unirse a los anticuerpos solo aquellos antígenos con determinantes antigénicos que se ajusten al sitio de

combinación del anticuerpo. El otro requisito es la complementariedad de carga, las cargas opuestas de antígenos y anticuerpos crean fuerzas de atracción, mientras que cargas iguales crean fuerzas de repulsión.<sup>3,4</sup>

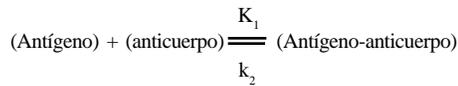
Una vez que se forma el complejo antígeno-anticuerpo, las fuerzas que lo mantienen unido no son interacciones covalentes, son interacciones interatómicas débiles que mantienen al antígeno y al anticuerpo en un contacto muy cercano, capaz de desarrollar fuerzas que estabilizan la unión del complejo como las interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas.<sup>4</sup>

Los anticuerpos aglutinan a los eritrocitos en 2 etapas: en la primera el anticuerpo se une físicamente al antígeno en los eritrocitos (sensibilización), en la segunda los eritrocitos, a los cuales los anticuerpos se unieron, aglutinan formando puentes entre ellos para crear una estructura de enrejado que constituye la aglutinación. En algunas reacciones antígeno-anticuerpo las 2 etapas ocurren casi simultáneamente, mientras que en otras sólo ocurre la primera etapa de la reacción, es decir, hay sensibilización de los eritrocitos por anticuerpos no aglutinantes.<sup>3</sup>

Para analizar la reacción de aglutinación es conveniente separarla en sus 2 etapas, ya que existen factores y variables que afectan a cada una.

### **PRIMERA ETAPA DE LA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN**

La asociación y disociación del complejo antígeno-anticuerpo se rige por la ley de acción de masas, esta es una reacción reversible:



donde antígeno-anticuerpo y antígeno-anticuerpo son las concentraciones del antígeno, anticuerpo y complejo antígeno-anticuerpo respectivamente,  $k_1$  es la constante de asociación y  $k_2$  la de disociación. De acuerdo con la ley de acción de masas:<sup>3,5</sup>

$$\frac{(\text{Antígeno-anticuerpo})}{(\text{Antígeno} + \text{anticuerpo})} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

$K$  es la constante de equilibrio o afinidad de la reacción y refleja la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo. Mientras mayor sea  $K$  la velocidad de asociación de la reacción será mayor, es decir, serán mayores las cantidades que se formarán del complejo antígeno-anticuerpo y la velocidad de disociación será más lenta.<sup>3,5</sup>

La constante de equilibrio  $K$  en la reacción de aglutinación se afecta por las concentraciones de antígeno y anticuerpo, y por condiciones físicas de las técnicas tales como pH, temperatura, fuerza iónica y tiempo de incubación. La alteración de estas últimas condiciones puede producir aumento o disminución de la sensibilidad en la aglutinación.<sup>3,5</sup>

*Concentración de antígeno y anticuerpo:* la velocidad de formación del complejo antígeno-anticuerpo varía con el número de moléculas de anticuerpo presentes en el medio y con el número de sitios antigénicos presentes en cada célula. Al aumentar la cantidad de anticuerpos en el medio puede aumentar la sensibilidad de la prueba, asimismo, al aumentar la proporción suero/eritrocitos se proveen más anticuerpos por zonas antigénicas.<sup>5-7</sup>

*PH:* el pH óptimo para los anticuerpos de la mayoría de los sistemas de grupos sanguíneos aún no ha sido determinado.

Anticuerpos como los anti-M reaccionan mejor a pH bajo, y para los anti-D se reporta el pH óptimo entre 6,5 y 7,0. En la práctica las técnicas de rutina deben trabajarse a un pH alrededor de 7,0.<sup>5</sup>

*Temperatura:* la mayoría de los anticuerpos de grupos sanguíneos reaccionan en un rango restringido de temperatura. Por ejemplo, los anti-P reaccionan ópticamente a 18 °C y los anti-Fy<sup>a</sup> a 37 °C. Los anticuerpos de la clase IgM son más reactivos a bajas temperaturas (4-27 °C), mientras que los de la clase IgG lo son a 37 °C. Por este motivo, las técnicas de detección de anticuerpos abarcan gamas de temperaturas de 22-37 °C ó 30-37 °C.<sup>7-9</sup>

Aquellos anticuerpos que reaccionan *in vitro* a temperaturas por debajo de 37 °C, no se consideran clínicamente significativos y rara vez destruyen eritrocitos transfundidos. Algunos anticuerpos de la clase IgM pueden activar el complemento a temperaturas por debajo de 30 °C, pero sólo acortan de forma mínima la supervivencia de eritrocitos incompatibles transfundidos. Los anticuerpos clínicamente significativos son aquellos que tienen actividad *in vivo* que se manifiesta *in vitro* al reaccionar a 37 °C.

*Fuerza iónica:* en una solución salina normal los iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> se agrupan alrededor de las moléculas de antígeno y anticuerpo, y neutralizan parcialmente sus cargas opuestas. Este recubrimiento dificulta la unión del anticuerpo con el antígeno y se reduce al disminuir la fuerza iónica del medio donde tiene lugar la reacción, por lo general cuando la concentración salina del medio de reacción disminuye, la velocidad de captación del anticuerpo aumenta.<sup>3,5</sup>

*Tiempo de incubación:* los anticuerpos de los diversos grupos sanguíneos tienen diferentes tiempos para alcanzar el equilibrio, en esto interviene de manera significativa la clase de inmunoglobulina

y la forma en que se une con antígeno específico.<sup>7</sup>

Estudios con eritrocitos suspendidos en suero o solución salina han demostrado que del 100 % de anticuerpos RhD que se fijan, aproximadamente el 25 % lo hace en los primeros 15 minutos y el 75 % restante lo hace durante la primera hora. La adición de varios agentes potenciadores, por ejemplo disminución de la fuerza iónica, puede aumentar la cantidad de anticuerpos fijados durante los primeros 15 minutos, y con esto disminuir el tiempo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio.<sup>5,7,10</sup>

## SEGUNDA ETAPA DE LA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN

Una vez que la reacción antígeno-anticuerpo ha ocurrido, la aglutinación puede o no producirse. Algunos factores permiten la aglutinación, otros la impiden, estos son: características del anticuerpo, localización y número de sitios antigénicos, fuerzas que mantienen la distancia entre los eritrocitos, uso de albúmina sérica bovina, uso de enzimas, efecto de dosis y efecto de moléculas con carga positiva.<sup>5,7</sup>

*Característica del anticuerpo:* 2 de las características de los anticuerpos que deben considerarse son el tamaño y el número de sitios de combinación con el antígeno, ya que entre los anticuerpos de las clases IgG e IgM existen considerables diferencias físicas.

Los anticuerpos IgM pueden establecer puentes entre los eritrocitos y aglutinarios aún suspendidos en solución salina, mientras que los anticuerpos IgG no. Esto es posible porque las moléculas de IgM son circulares y poseen 10 sitios de combinación con el antígeno, separados a una distancia de 300 Å; la distancia que separa a 2 células normales es 184 Å y estos

anticuerpos para provocar la aglutinación de las mismas pueden combinar 2 ó 3 de sus sitios con una, y el resto de los sitios con otra.<sup>1,11</sup>

Las moléculas de IgG, a diferencia de las IgM, poseen sólo 2 sitios de combinación con el antígeno y estos están separados a una distancia de 140 Å, por lo tanto, para aglutinar 2 células sólo dispone de un sitio de combinación para cada una, estos a su vez se encuentran más cercanos uno del otro que los sitios de la IgM.<sup>1,3,4,11</sup>

*Localización y número de sitios antigénicos:* los reactivos hemoclasificadores anti-A y anti-B de tipo IgG regularmente aglutinan eritrocitos de estos fenotipos suspendidos en solución salina. Una posible explicación para este fenómeno es la localización y número de los antígenos del sistema de grupos sanguíneos ABO. Existe gran cantidad de sitios antigénicos A y B en los eritrocitos, comparado con el número de sitios de otros antígenos, además los antígenos A y B están localizados en los glicolípidos y zonas sobresalientes de la superficie de la membrana. Otros antígenos como el RhD son proteínas localizadas en la propia membrana eritrocitaria.<sup>5,7,12</sup>

*Fuerzas que mantienen la distancia entre los eritrocitos:* como se analizó anteriormente, los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos de la clase IgM pueden crear la estructura de enrejado en la segunda etapa de la reacción de aglutinación, porque los anticuerpos de esta clase son capaces de cubrir la distancia que separa a los eritrocitos entre sí por la repulsión de cargas iguales.

De forma contraria, los anticuerpos de la clase IgG son generalmente sensibilizantes, pero no aglutinantes. El ser moléculas de pequeño tamaño y con 2 sitios de combinación con el antígeno, les imposibilita vencer la distancia que existe

entre los eritrocitos y aglutinarlos. Los eritrocitos tienen una carga neta negativa en su superficie, su interacción con los iones del medio en que están suspendidos altera esa carga y producen una carga neta denominada potencial zeta, de ahí que la distancia que separa a los eritrocitos es proporcional al potencial zeta y la disminución de esta hace que los eritrocitos se aproximen y puedan ser aglutinados por anticuerpos de esta clase.<sup>5,7,13</sup>

*Uso de albúmina sérica bovina:* los anticuerpos que no aglutinan eritrocitos suspendidos en solución salina, en ocasiones, los aglutinan cuando están suspendidos en albúmina bovina, esto es posible porque la albúmina provoca un incremento en la constante dieléctrica del medio en el que están suspendidos los eritrocitos y una disminución del potencial zeta. La constante dieléctrica de un medio es una medida de su habilidad para disipar cargas.<sup>1,5,14,15</sup>

No todos los anticuerpos de los grupos sanguíneos aumentan su actividad en las pruebas de albúmina. Los anti-A, anti-B y anti-Lewis muestran reducción de su actividad en presencia de albúmina; este influye en el grado de hidratación de la membrana, lo cual puede alterar la orientación estérica del determinante antigénico o puede disminuir la entropía disponible para dirigir la reacción.<sup>1</sup>

*Uso de enzimas:* enzimas proteasas como la bromelina, tripsina, papaína y ficina se utilizan en las pruebas serológicas porque reducen la carga de la superficie de los eritrocitos al hidrolizar las sialoglicoproteínas de la superficie celular. La neuraminidasa también reduce la carga de la superficie celular porque escinde moléculas de ácido siálico N-acetilneuramínico (NeuNAc) de las cadenas de polisacáridos.<sup>14,16,17</sup>

Como se discutió anteriormente, cualquier mecanismo que elimine las cargas negativas de los eritrocitos reducirá la

distancia que los separa al disminuir el potencial zeta y así facilitar su aglutinación por parte de anticuerpos de la clase IgG. Se conoce que este proceder puede disminuir la distancia entre células de 184 Å a 113 Å en eritrocitos tratados con papaína, y a 111 Å cuando son tratados con neuraminidasa.<sup>1</sup> El tratamiento enzimático de eritrocitos también incrementa la accesibilidad de algunos antígenos cuando las glicoproteínas son eliminadas.

Los eritrocitos pretratados con neuraminidasa aumentan su aglutinación por efecto de moléculas de IgG, pero este aumento no es comparable al producido por otras enzimas.<sup>14,17</sup>

Además de estas acciones, las enzimas proteolíticas eliminan zonas antigénicas de otros anticuerpos como anti-M, -N, -S<sup>17</sup>, -Fy<sup>a</sup> y -Fy<sup>b</sup>.<sup>1,5</sup> Esta propiedad de las enzimas proteolíticas son de gran utilidad en la identificación de anticuerpos eritrocitarios.

*Efecto de dosis:* el efecto de dosis es una vía por la que algunos antígenos pueden afectar la fuerza de la reacción antígeno-anticuerpo. Algunos anticuerpos muestran diferencias en la fuerza de sus reacciones, en dependencia de la cantidad de antígeno presente en las células. A veces estas cantidades son proporcionales al genotipo del individuo, por ejemplo, los eritrocitos M+ de un individuo de genotipo MM contienen más antígeno M que los eritrocitos M+ de un individuo de genotipo MN.<sup>1,5</sup>

*Efecto de moléculas con carga positiva:* el Polibreno® es un polímero de carga positiva, provoca agregación espontánea de eritrocitos normales al neutralizar su carga superficial negativa producida por el ácido siálico. Las células carentes de NeuNAc, por ejemplo, las células poliaglutinables T o Tn y las tratadas con proteasa, no se agregan en presencia de Polibreno®, lo cual ofrece información

adicional sobre las características físicas de la reacción de aglutinación.<sup>1,5,14</sup>

## **DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ERITROCITARIOS**

El pesquiasaje de anticuerpos eritrocitarios tiene como objetivo detectar y luego identificar anticuerpos clínicamente significativos, que puedan causar reacción transfusional y acortamiento de la sobrevivencia normal de los eritrocitos, de modo que deben emplearse métodos *in vitro* apropiados.

Usualmente se emplean múltiples técnicas para la detección de anticuerpos eritrocitarios, una de ellas es el tratamiento enzimático de los eritrocitos con proteasas. Esta técnica es mucho más sensible que otras en las que no se utilizan eritrocitos pretratados enzimáticamente, especialmente en la detección de anticuerpos Rh y otros anticuerpos que sólo reaccionan ante eritrocitos pretratados.<sup>18</sup>

A pesar de las ventajas que brinda el uso de enzimas proteolíticas, es importante alertar en relación con su uso como rutina en la detección de anticuerpos eritrocitarios. Los eritrocitos pretratados con enzimas pueden detectar anticuerpos fríos y otros anticuerpos que no son clínicamente significativos, además existe muy poca correlación entre la presencia pretransfusional de anticuerpos detectables únicamente por métodos enzimáticos, y el desarrollo de anticuerpos demostrables por otros métodos, días o semanas después de la transfusión.<sup>1,19</sup>

Dos de las técnicas que deben emplearse como rutina en la evaluación de anticuerpos eritrocitarios son: el método del polibreno y el de LISS (del inglés *low ionic*

*strength solution*, solución de baja fuerza iónica). Estos métodos consumen menos tiempo, dinero y esfuerzo que los métodos enzimáticos.<sup>20-23</sup> Es necesario comentar que la técnica del LISS sólo debe realizarse a 37 °C, ya que a temperatura ambiente se pueden detectar anticuerpos que no tienen repercusión clínica.<sup>1</sup>

De forma contraria, el método del polibreno se realiza a temperatura ambiente y tiene como ventaja el detectar predominantemente anticuerpos que son activos a 37 °C por otros métodos. En la técnica de polibreno el tiempo de incubación debe ser el mínimo, para no detectar anticuerpos fríos sin significación clínica.<sup>20</sup>

La prueba de antiglobulina indirecta (PAI) emplea anticuerpos contra las globulinas humanas (AGH) denominado reactivo antiglobulínico poliespecífico (anti-IgG y anti-C3) y eritrocitos suspendidos en solución salina. Esta técnica se realiza en 2 pasos y es la más recomendada para la detección de anticuerpos que sensibilizan eritrocitos que portan su antígeno, pero que no producen aglutinación de las células.<sup>24</sup>

La PAI es un proceder altamente favorecido por la mayoría de los investigadores que se desempeñan en esta especialidad y no sólo es útil para detectar e identificar anticuerpos, sino que también se utiliza para tipificar la sangre y en las pruebas de compatibilidad.

Este proceder se rige por los siguientes principios: 1. Todas las moléculas de anticuerpos son globulinas; 2. Al inyectar un animal con globulinas humanas este genera anticuerpos contra la proteína extraña, luego el suero animal es adsorbido para eliminar las aglutininas indeseadas y reacciona específicamente con las globulinas humanas; 3. Los 2 sitios Fab de la molécula AGH se unen a las porciones Fc de 2 anticuerpos sensibilizantes que se encuentran en 2 células adyacentes, esta

unión forma un puente entre los eritrocitos y la aglutinación se hace visible; 4. La AGH reacciona con globulinas humanas unidas a eritrocitos o libres en el suero, estas últimas se unen preferentemente con la AGH, la neutralizan y ocasionan un resultado falsamente negativo, por ello los eritrocitos deben lavarse previamente a la adición del reactivo AGH.<sup>5</sup>

A finales de la década de los 80 se desarrolló un nuevo método para el tipaje de grupos sanguíneos y para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. La prueba de aglutinación en gel es un método de serología transfusional, donde la reacción entre anticuerpos y antígenos ocurre en el gel Sephadex contenido en los microtubos de una tarjeta plástica, la centrifugación se realiza en una centrifuga no convencional y el gel empleado puede ser neutro, contener reactivo AGH para la PAI o reactivos hemoclasificadores de grupos sanguíneos para tipificar la sangre.<sup>7,25-28</sup>

La prueba de aglutinación en gel es negativa si después de la centrifugación los eritrocitos no aglutinados van al fondo del microtubo al pasar fácilmente a través del gel; los eritrocitos aglutinados quedan atrapados en el gel y forman diferentes patrones de aglutinación. Esta técnica es fácil, sensible y reproducible; entre sus ventajas están el uso de eritrocitos no lavados para la ejecución de la prueba de antiglobulina, requiere pocas cantidades de reactivos, después que la reacción ocurre

en el gel esta puede mantenerse sin cambios hasta pasadas 24 horas y los resultados en los microtubos se pueden fotocopiar.<sup>7,25,28</sup>

Las pruebas de detección de anticuerpos tienen como objetivo evidenciar la mayor cantidad posible de anticuerpos con significación clínica, para lo cual los eritrocitos que se utilicen deben portar los antígenos, contra los cuales están dirigidos la mayoría de los anticuerpos que se encuentran comúnmente. Para investigar los sueros de los pacientes son suficientes 2 muestras testigo de eritrocitos de donantes de fenotipo seleccionado (tabla 1).

La detección *in vitro* de la reacción antígeno-anticuerpo en todas las técnicas que se han comentado hasta aquí se evidencia por aglutinación, sin embargo, existen otras formas de detectar esta reacción, por ejemplo las pruebas de inhibición de la aglutinación, en las que se detecta la presencia del antígeno o del anticuerpo cuando la aglutinación previamente observada de un elemento queda inhibida. Otros medios de detección son sencillos, como la hemólisis; otros como el radioinmunoanálisis son más peligrosos, costosos y complejos.<sup>5</sup>

La hemólisis es la ruptura de los eritrocitos con la consiguiente liberación de la hemoglobina intracelular, cuando es mediada por anticuerpos requiere el concurso del complemento y no se produce si el plasma contiene un agente quelante del calcio o magnesio. Si la hemólisis se produce, el sobrenadante se torna color rosa

TABLA 1. Fenotipos testigos para la detección de anticuerpos eritrocitarios

Muestras	Rh		Sistemas de grupos sanguíneos														*								
	D	C	C <sup>w</sup>	E	c	e	M	MN		Lutheran		P		Lewis		Kell		Duffy		Kidd					
								N	S	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	K	k		a	b	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>
1	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	
2	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+

\* Ligado al sexo.

tras la incubación de los anticuerpos con los eritrocitos, resultado que se considera positivo.<sup>3</sup> Los anticuerpos anti-Le<sup>a</sup> pueden provocar la hemólisis de eritrocitos suspendidos en solución salina.<sup>7</sup>

Otra de las técnicas utilizadas para identificar antígenos o anticuerpos es la prueba de adherencia de eritrocitos en fase sólida, que utiliza eritrocitos indicadores. En la prueba directa se recubren las paredes de una microplaca con anticuerpos y se añaden eritrocitos a los pocillos, si tienen el antígeno adecuado se adherirán a los anticuerpos en la pared del pocillo, si no hay reacción antígeno-anticuerpo sedimentan en el fondo del pocillo. En la prueba indirecta se adhieren eritrocitos a los bordes de los pocillos mediante pretratamiento con glutaraldehído, formaldehído o un anticuerpo monoclonal potente, luego se añade suero del paciente y después eritrocitos recubiertos con IgG (células indicadoras). En la reacción positiva los eritrocitos recubiertos se adhieren a las paredes del pocillo, en la negativa los eritrocitos sedimentan en el fondo de los pocillos.<sup>29,30</sup>

Cuando se detecta un anticuerpo en el suero de un individuo este debe identificarse para conocer su significado

clínico, el procedimiento emplea un panel eritrocitario de fenotipo conocido. En dependencia de si las células reaccionan o no con el suero, se podrá reconocer el antígeno contra el cual está dirigido el anticuerpo (tabla 2).

En la tabla 2 se muestra el ejemplo de un suero que reacciona en la PAI con todas las células S+ y no reacciona con la S-. En este caso el suero contiene anticuerpos anti-S y se pueden excluir otras posibilidades, por ejemplo: las células 2, 4 y 10 son D+ y reaccionan con el suero; las células 1,5,6,7 y 8 son D- y no reaccionan con el suero, pero los anticuerpos no pueden ser anti-D porque las células 3 y 9 son D+ y el suero no reacciona con ellas.

Al investigar, de esta manera, se pueden excluir otros anticuerpos, es decir otras especificidades; otros no pueden ser descartados. En el ejemplo anterior el suero puede presentar anticuerpos anti-C<sup>w</sup> tanto como anti-S, porque el suero reacciona con la célula 2 y esta es S+ y C<sup>w</sup>; en este particular y en otros similares es necesario el uso de un fenotipo extra S-, C<sup>w</sup>+

Cuando el suero contiene diferentes tipos de anticuerpos se deben utilizar diferentes vías para determinar las

TABLA 2. Panel eritrocitario para la identificación de anticuerpos eritrocitarios

Muestras	Rh	MN		Lutheran				P				Lewis				Kell				Duffy		Kidd		* Resultado PAI
		M	N	S	s	U	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>		
1	CCddee	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0
2	Cc <sup>w</sup> Dee	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	2+
3	CCDee	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0
4	ccDEE	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	3+
5	ccddEE	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0
6	ccddee	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0
7	ccdde	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0
8	ccdde	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0
9	CCDEe	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0
10	CcDee	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	3+

\* Ligado al sexo.

especificidades presentes, una de ellas es valorar la fuerza de la aglutinación con cada fenotipo del panel eritrocitario, otra es el tratamiento enzimático de los eritrocitos para eliminar los sitios antigénicos de los antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, M, N y S. También se puede usar más de una técnica para identificar varias especificidades si nos basamos en el hecho de que muchos anticuerpos reaccionan por diferentes métodos.<sup>7</sup>

La identificación de anticuerpos contra antígenos de baja o alta incidencia, se rige por los mismo principios detallados anteriormente para otros anticuerpos, pero sólo se requiere el uso de fenotipos raros. Estas células, digamos exóticas, no poseen antígenos de alta incidencia, o por el contrario, portan algunos de estos antígenos raros.

En otras ocasiones los métodos de adsorción elución son útiles para la identificación de anticuerpos eritrocitarios, por ejemplo un suero que contiene anti-K

producido por un individuo de fenotipo RhD- se debe estudiar para dilucidar la presencia de anticuerpos anti-D, si la muestra de eritrocitos D+, K-es insuficiente para confirmar o excluir la presencia del anti-D, el suero se puede adsorber con células D-, K+ repetidamente, cuando se obtiene el suero libre de anti-K+ este se enfrenta a muestras D+ y D-, si el anti-D está presente el anti-K se puede separar de ese anticuerpo por elución de los eritrocitos D-, K+ adsorbidos.

En los últimos años se han producido muchos avances en la Inmunohematología, la medicina transfusional y las disciplinas relacionadas. Los procedimientos de detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios son diversos y mucho más sofisticados y complejos que como se trataron en este trabajo, no obstante, se intentó hacer una revisión de un tema amplio que va en continuo desarrollo y perfeccionamiento para aumentar la cultura inmunológica de nuestros lectores.

## SUMMARY

---

A wide range of procedures for the detection and identification of red cell antibodies *in vitro* has been developed in Immunohematology. Therefore, it is made a review of the techniques and methods used with this aim, such as the method using erythrocytes pretreated with proteolytic enzymes and the techniques of Polibreno that utilize low ionic force solution (LIFS), the indirect antiglobulin test, the gel agglutination test, the agglutination inhibition test, hemolysis and the solid phase erythrocyte adherence test. The problems affecting the agglutination reaction between the antigen and the antibody are also dealt with. The agglutination reaction is subdivided into its first and second phase for a better understanding. In the first phase, the antigen and antibody concentration, pH, temperature, ionic force and incubation time are analyzed. The characteristic of the antibody, localization and number of antigenic sites, forces maintaining the distance among the erythrocytes, use of bovine albumin, use of enzymes, dose effect and effect of molecules with positive charge are studied in the second phase.

*Subject headings:* ANTIGEN-ANTIBODY REACTIONS/immunology; ERYTHROCYTES; BINDING SITES, ANTIBODY; IMMUNOLOGIC TECHNIQUES.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Issitt PD. Applied blood group serology. 3 ed. Miami: Montgomery Scientific Publications, 1989.
2. Beattie K. Detection and identification of alloantibodies. En: Mallory D, ed. Immunohematology methods and procedures. Rockville: American National Red Cross, 1993;III-1-III-9.
3. Pico MC, Giraldivo IG, Otero A. Inmunología experimental. La Habana: Félix Varela, 1997.
4. Roitt IM. Essential immunology. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980.
5. Vengelen-Tyler V, ed. Technical manual. 12<sup>th</sup> ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1996.
6. Daniels G. Functional aspects of red cell antigens. Blood Rev 1999;13(1):14-35.
7. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. ed. Blood transfusion in clinical medicine. 10 ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1997.
8. Arndt PA, Garratty G, Marfoe RA, Zeger GD. An acute hemolytic transfusion reaction caused by an anti-P1 that reacted at 37 degrees C. Transfusion 1998;38(4):373-7.
9. Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fy(a) and the potential clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. Transfus Med 1997;7(4):301-4.
10. Leger RM, Garratty G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. Transfusion 1999;39(1):11-6.
11. Price WR, Johnson ST, Curtis BR. Immunoglobulin isotype identification in red cell antibodies using flow cytometry. Transfusion 1999;39(7):756-62.
12. Fukuda M, Fukuda MN, Hakomori ST. Developmental change and genetic defect in the carbohydrate structure of band 3 glycoprotein of human erythrocyte membrane. J Biol Chem 1979;254:3700-3.
13. Rosse WF. Clinical immunohematology: basic concepts and clinical applications. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1990:328.
14. Pollack W, Hager HJ, Reckel R. A study of the forces involved in the second stage of the hemagglutination. Transfusion 1965;5:158.
15. Van Oss CJ, Mohn JF, Cunningham RK. Influence of various physicochemical factors on hemagglutination. Vox Sang 1978;34:351.
16. Steane SM, Steane EA, Reyes VG. Limitations of digitonin-acid elution procedure [Abstract]. Transfusion 1982;22:430.
17. Eylar EN, Macloff MA, Brody OR. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. J Biol Chem 1962;237:1992.
18. Scott ML, Voak D, Downie DM. Optimum enzyme activity in blood grouping, and a new technique for antibody detection: an explanation for the poor performance on the one-stage mix technique. Med Lab Sci 1988;45:7-18.
19. Issitt PD, Combs MR, Bredehoeft SJ. Lack of clinical significance of "enzyme-only" red cell alloantibodies. Transfusion 1993;33:284-93.
20. Lalezari P, Jiang AF. The manual polybrene test: a simple and rapid procedure for detection of red cell antibodies. Transfusion 1980;20:206-11.
21. Fisher GA. Use of the manual polybrene test in the routine hospital laboratory. Transfusion 1983;23:151-4.
22. Hughes-Jones NC, Gardner B, Telford R. The effect of pH and ionic strength on the reaction between anti-D and erythrocytes. Immunology 1964;7:72.
23. Elliot M, Bossini E, Dupny ME. Effect of ionic strength on the serologic behaviour of red cell Isoantibodies. Vox Sang 1964;9:396.
24. Coombs RRA, Mourant AJ, Race RR. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Br J Exp Pathol 1945;26:255-66.
25. Hitzler W, Schömig-Breckner H, Mathias D. Gel centrifugation test - a new micro method for blood group typing and antibody screening. Arztl Lb 1989;35:89-92.
26. Phillips PK, Whitton CM, Lavon F. The use of antiglobulina "gel-test" for antibody detection. Transfus Med 1992;2:111-3.
27. Figueiredo M, Lima M, Morais S, Porto G, Justica A. The gel test: some problems and solutions. Transfus Med 1992;2:115-8.
28. Lapiere Y, Rigal D, Adam J. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990;30:109-13.
29. Shanwell A, Salander S, Bremme K, Westgren M. Clinical evaluation of a solid-phase test for red cell antibody screening of pregnant women. Transfusion 1999;39(1):26-31.
30. Plapp FV, Rache JM, Beck ML. Blood antigens and antibodies: solid phase adherence assays. Lab Med 1984;22:39-46.

Recibido: 9 de noviembre del 2000. Aprobado: 7 de diciembre del 2000.

Lic. *Yamilé Alfonso Valdés*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Telef: (537)578268. Fax: (537)338979.e-mail:ihidir@hemato.sld.cu