

Detección de anticuerpos IgA e IgM en la prueba de antiglobulina (Coombs)

Detection of IgA and IgM antibodies in antiglobulin test (Coombs)

DrC. Antonio A. Bencomo-Hernández; Dra. María E. Alfonso-Valdés

Instituto de Hematología e Inmunología. Ciudad de La Habana, Cuba.

INTRODUCCIÓN

La prueba de antiglobulina o prueba de Coombs con el empleo del suero antiglobulina humana poliespecífico, es la técnica más utilizada en inmunohematología. Los componentes principales del reactivo antiglobulina son los anticuerpos anti-IgG y anti-C3 (C3d/C3dg); la actividad anti-IgA y anti-IgM no es imprescindible pero deseable.¹ La presencia de estos anticuerpos permite la detección de autoanticuerpos IgM (no aglutinantes) e IgA en la prueba de antiglobulina directa (PAD) para el diagnóstico de la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) que, en ocasiones, por las dificultades en su detección, están involucrados en la etiología de la AHAI "Coombs negativa".²

La prueba de Coombs detecta, como mínimo, entre 200 y 500 moléculas de IgG por hematíe.³ El límite de detección para los anticuerpos de los isotipos IgA e IgM no ha sido determinado, probablemente porque no existe consenso para la estandarización de los reactivos antiglobulínicos con estas especificidades, por su baja frecuencia, o porque para revelar la presencia de estas inmunoglobulinas en los hematíes se prefiere el empleo de métodos más sensibles.^{1,4,5}

En nuestro laboratorio utilizamos como sueros de Coombs mono-específicos anti-IgA y anti-IgM los reactivos de estas especificidades para uso en inmunología, después de estandarizados de acuerdo con las recomendaciones de *Petz y Garratty*.¹ La cuantificación de moléculas de inmunoglobulinas por hematíe se realiza mediante un ELISA para, entre otras aplicaciones, apoyar el diagnóstico inmunohematológico de las AHAI. A partir de las investigaciones realizadas en pacientes con AHAI, determinamos el límite de detección de la PAD para los anticuerpos IgA e IgM y comparamos los resultados obtenidos en el ELISA con lo comunicado previamente para los anticuerpos de la clase IgG.

MÉTODOS

Se seleccionaron 60 pacientes con AHAI caracterizados en la PAD⁶ con los sueros mono-específicos anti-IgG (Dako), anti-IgA y anti-IgM (Behring), estandarizados en nuestro laboratorio; de ellos, 42 con presencia de IgG, 11 de IgA y 7 con autoanticuerpos IgM. Los

pacientes con presencia de IgA e IgM fueron seleccionados de una muestra de 200 enfermos con AHAI estudiados en un intervalo de 10 años. En cada caso se registraron los patrones de aglutinación (4+,3+,2+,1+) de acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Americana de Bancos de Sangre.⁶ A todos los pacientes se les realizó la cuantificación de IgG, IgA e IgM en los hematíes mediante un ELISA cuantitativo descrito previamente⁷ y se estratificaron los valores de la aglutinación con el número de moléculas de cada inmunoglobulina por hematíe.

RESULTADOS

La estratificación de los resultados según el patrón de aglutinación obtenido en la PAD evidenció que el número de moléculas de inmunoglobulinas por hematíe fue mayor a medida que aumentaba la fortaleza de la aglutinación (tabla). Los valores superiores de cuantificación de inmunoglobulinas se correspondieron con una aglutinación de 4+. En las publicaciones previas se señala que la mayor intensidad de la aglutinación en la prueba de Coombs se alcanza con valores entre 1 000 y 2 000 moléculas de IgG por hematíe;⁸ y el límite de detección entre 200 y 500 moléculas de IgG,³ lo que es similar a lo encontrado en este estudio. La muestra de casos analizada con presencia de IgA e IgM fue escasa debido a que la detección de estas inmunoglobulinas en la PAD es poco frecuente.⁹

Tabla. Relación entre el número de moléculas de IgG, IgA e IgM por hematíe con los patrones de aglutinación obtenidos en la prueba de antiglobulina directa

Anticuerpos	Patrones de aglutinación	Número de casos	Moléculas de Igs/ hematíe	
			Media	Intervalo
IgG	4+	9	7 550	2 115-9 000
	3+	14	1041	450-1 479
	2+	14	734	404-1 137
	1+	5	206	200-225
IgA	4+	2	796	741-851
	3+	3	200	184-341
	2+	2	165	134-197
	1+	4	120	90-130
	3+	2	106	103-109
	2+	3	69	58-84

Igs: inmunoglobulinas.

DISCUSIÓN

De acuerdo con este estudio, los reactivos monoespecíficos anti-IgA y anti-IgM son capaces de provocar una aglutinación visible cuando existen aproximadamente 120 moléculas de IgA y 30 moléculas de IgM por hematíe. La máxima intensidad de aglutinación se alcanza cuando recubren a los hematíes más de 700 moléculas de IgA o más de 100 moléculas de IgM. Hasta donde conocemos, no se han realizado investigaciones que relacionen la concentración de anticuerpos IgA e IgM en los hematíes con la aglutinación en la prueba de Coombs que nos permitan comparar estos resultados. Como señalamos anteriormente, la detección de anticuerpos IgA e IgM en los hematíes presentan dificultades adicionales. Dentro de ellos, la separación de los anticuerpos IgM en los lavados de los eritrocitos previos a la realización de la prueba, así como, en algunos casos, la incapacidad de los reactivos para revelar la presencia de estas inmunoglobulinas.^{2,10} El ELISA fue capaz de discernir el número de moléculas de IgM por hematíe entre los diferentes patrones de aglutinación. Sin embargo, se observó un solapamiento entre los intervalos de número de moléculas de IgG e IgA por hematíe en las intensidades de 3+ y 2+. Estos resultados se

deben a que el patrón de aglutinación depende de la apreciación del observador que no permite determinar las diferencias en las concentraciones de anticuerpos. Hallazgos similares también pueden observarse al relacionar la intensidad de la fluorescencia obtenida por citometría de flujo con la positividad de la PAD.¹¹ No obstante, todavía en la actualidad se utiliza el patrón de aglutinación como indicativo de la concentración de anticuerpos para estudiar su relación con la hemólisis.¹²

Los resultados de este trabajo permitieron profundizar en el diagnóstico inmunohematológico de las anemias hemolíticas inmunes mediada por anticuerpos de los isotipos IgA e IgM, así como ofrecer una referencia para optimizar la estandarización de los reactivos monoespecíficos utilizados para la caracterización de anticuerpos en la prueba de Coombs.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Petz LD, Garratty G. The serologic investigation of autoimmune hemolytic anemia. En: Petz LD, Garratty G, ed. Immune hemolytic anemias. 2 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004. pp. 201-30.
2. Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Semin Hematol* 2005;42:156-64.
3. _____. Immune hemolytic anemia: A primer. *Semin Hematol* 2005;42:119-21.
4. Das SS, Nityanand S, Chaudhary R. Clinical and serological characterization of autoimmune hemolytic anemia in a tertiary care hospital in North India. *Ann Hematol* 2009;88:727-32.
5. Bartolmäs T, Salama A. A dual antiglobulin test for the detection of weak or non-agglutinating immunoglobulin M warm autoantibodies. *Transfusion* doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02533.x.
6. Brecher ME, ed. AABB Technical manual. 14 ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2002.
7. Bencomo AA, Díaz M, Alfonso Y, Valdés O, Alfonso ME. Quantitation of red cell-bound IgG, IgA, and IgM in patients with autoimmune hemolytic anemia and blood donors by enzyme-linked immunosorbent assay. *Immunohematology* 2003;19:47-53.
8. Gilliland BC. Blood cells: Autoimmune hemolytic anemia. En: Rose NR, Mackay IR, ed. The autoimmune diseases. London: Academic Press; 1998. pp. 245-68.
9. Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev* 2008;22:17-31.
10. Petz LD. Diagnostic complexities in autoimmune hemolytic anemias. *Transfusion* 2009;49:202-3.
11. Lin JS, Hao TC, Lyou JY, Chen YJ, Liu HM, Tzeng CH, et al. Clinical application of a flow cytometric direct antiglobulin test. *Transfusion* 2009;49:1335-46.
12. Reardon JE, Marques MB. Laboratory evaluation and transfusion support of patients with autoimmune hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 2006;125:S71-S77.

Recibido: 3 de junio del 2010.

Aprobado: 20 de junio del 2010.

DrC. *Antonio A. Bencomo-Hernández*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800. Ciudad de La Habana, Cuba. Tel (537) 643 8695, 643 8268. Fax (537) 644 2334. E-mail: ihidir@hemato.sld.cu