



**COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA
COORDINADORA: DRA ANA CLAUDIA PERÓN**

**PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO
COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ**

**“ESTADO DEL ARTE EN LA IMPLEMENTACIÓN DE
REACTIVOS QUÍMICOS EN EL LABORATORIO DE
INMUNOHEMATOLOGÍA”**

PROFESORES INVITADOS:

Daniel Alberto Téllez Paz¹, Leidy Alejandra Toro Espinosa², Paula Andrea Gaviria García³, Ana Claudia Perón⁴

¹ Magister en Medicina Transfusional Terapia Celular y Tisular – MBA Especialidad en International Business – Líder Científico Hemociencia. Docente Universidad de Antioquia. Bogotá D.C, Colombia.

² Magister en Microbiología con énfasis en Hematología - Líder Científico Hemociencia. Asesora Científica Biocientífica Ltda. Bogotá D.C, Colombia. Docente Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Magister en ciencias biológicas – Pontificia Universidad Javeriana Bogotá D.C, Colombia. Líder Científico Hemociencia. Líder de la Unidad de Inmunohematología Avanzada y la Línea de Investigación en Medicina Transfusional en el Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud IDC BIS. Docente universitario en instituciones nacionales e internacionales - Colombia.

⁴ Bióloga - Universidad Mogi das Cruzes – São Paulo - Brasil - Líder Científico Hemociencia. Directora de la empresa ACPeron entrenamientos y consultoría. Directora del proyecto QualityBlood para control de calidad en Bancos de Sangre - Brasil

www.hemociencia.com hemociencia@gmail.com

Los aloanticuerpos antieritrocitarios (AE), dirigidos contra grupos sanguíneos diferentes al ABO, se denominan inesperados o irregulares. Dependiendo de la población de estudio que puede involucrar pacientes de diversas patologías, donantes de sangre o población general, así como de la sensibilidad de los métodos empleados, estos anticuerpos pueden encontrarse en el 0,3 % a 38 % de la población. (1) Se estima que la prevalencia de aloinmunización se presenta entre el 0,5 % y el 1,5 % de la población general; en contraste estudios de aloinmunización en pacientes con anemia de células falciformes reportan prevalencias de hasta del 70% (2)

Los AE pueden ser el resultado de embarazos, transfusiones, trasplantes, o la administración parenteral o intramuscular de material inmunogénico. En algunos casos, no se puede identificar la causa o evento inmunizante, por lo cual se plantea que este tipo de anticuerpos pueden ser producto de exposiciones ambientales, incluyendo bacterias o virus con moléculas similares a los antígenos de grupo sanguíneo u otros mecanismos de reacción cruzada. En este contexto a diferencia de los autoanticuerpos, los aloanticuerpos reaccionan únicamente con glóbulos rojos alogénicos que expresan el respectivo antígeno. (3)

Los AE se pueden detectar en cualquier prueba de laboratorio que involucren el uso de suero o plasma y células con diferentes dotaciones antigénicas, como lo son: la prueba inversa del grupo sanguíneo ABO, rastreo, detección o escrutinio de anticuerpos irregulares (donde se emplean de dos a tres reactivos de células), las pruebas cruzadas mayores o en eluidos preparados a partir de glóbulos rojos recubiertos con anticuerpos; cuando se detecta un anticuerpo se debe identificar su especificidad y determinar su significancia clínica con el fin de definir si es necesario elegir unidades antígeno negativas para el receptor y garantizar transfusiones seguras. Un anticuerpo clínicamente significativo, puede definirse como aquel que acorta la sobrevivencia de los eritrocitos transfundidos, favorece el rechazo de un tejido trasplantado o ha sido asociado con la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. Algunos anticuerpos causan la lisis de eritrocitos incompatibles en cuestión de minutos u horas, otros disminuyen la sobrevivencia con el paso de los días, algunos no causan lisis aparente y los eventos clínicos asociados pueden ser subdiagnosticados. (3) (Ver tabla 1)

Tabla 1: Significancia clínica de algunos aloanticuerpos dirigidos contra antígenos de sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios

Usualmente significante clínicamente	Algunas veces significante clínicamente	Clínicamente insignificante si no reaccionan a 37°C	Generalmente insignificante clínicamente
A y B	AnWj	A1	Chido/Rodgers
Diego	At^a	H	Cost
Duffy	Colton	Le^a	JMH

H en Oh	Cromer	Lutheran	HLA/Bg
Kell	Dombrock	M, N[†]	Knops
Kidd	Gerbich	P1	Le^b
P	Indian	Sd^a	Xg^a
PP1P^K	Jr^a		
Rh	Kx		
S, s, U	Lan		
Vel	Landsteiner- Wiener		
	Scianna		
	Yta		

†Descartar que la reactividad 37°C no se deba a la aglutinación

Fuente: Tabla tomada y traducida de *Marion E. Reid, Christine Lomas-Francis, Martin L. Olsson. The Blood Group Antigen Factsbook, 2012. (3)*

Un individuo puede producir aloanticuerpos contra diferentes especificidades, generando mezclas de anticuerpos que pueden dificultar la investigación serológica, incrementando la cantidad de pruebas necesarias para determinar la especificidad de los mismos, afectando la probabilidad de encontrar donantes de sangre compatibles. Un ejemplo común de casos complejos en inmunohematología ocurre cuando los pacientes presentan una prueba de autocontrol positiva y la prueba directa de antiglobulina (PAD) positiva, asociada generalmente a la presencia de autoanticuerpos (autos). En pacientes politransfundidos, esta situación puede enmascarar aloanticuerpos coexistentes debido a las reacciones de panaglutinación las cuales ocurren porque los autos muestran una aglutinación superior frente a eritrocitos que expresan un antígeno particular presente en los glóbulos rojos de donadores y reactivos celulares; los pacientes con enfermedades

autoinmunes o hematopatologías linfoides suelen ser los más susceptibles a las complejidades serológicas asociadas a reacciones de panaglutinación, por el desarrollo patológico de clonas linfoides autorreactivas y aceleración en la red de citoquinas, lo cual conduce a la formación de autos por mecanismos, entre otros, ambientales, genéticos y mutacionales; por lo anterior, es necesario implementar en el laboratorio de inmunohematología procedimientos para la mitigación de la interferencia por autos y de este modo, estudiar la coexistencia de aloanticuerpos potencialmente peligrosos para las transfusiones. (4)

La adsorción *in vivo* de los autos al glóbulo rojo genera dificultades en la tipificación de los antígenos cuando requieren la prueba de antiglobulina indirecta (PAI) debido a la interacción de las inmunoglobulinas contenidas en el suero de Coombs y los complejos inmunes fijados al glóbulo rojo, generando falsos positivos y limitaciones en las investigaciones inmunohematológicas.

Como situación adjunta a la complejidad serológica causada por la presencia de aloanticuerpos y autos en los pacientes, se reconoce el uso de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de neoplasias. Dichos anticuerpos pueden ser usados para reconocer segmentos proteicos específicos sobre la superficie celular de las neoplasias; por lo tanto, ofrecen el potencial enorme de la detección precisa en lesiones recurrentes u ocultas. Los antígenos de la superficie celular pueden ser específicos del tumor o ser expresados en mayor volumen en los tumores que en las células normalmente diferenciadas. Durante décadas han existido diferentes formas de uso de los anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer. Uno de ellos, es el Anti-CD38, un anticuerpo monoclonal de clase IgG1, empleado en el tratamiento de los pacientes diagnosticados de mieloma múltiple. Aunque la célula diana es la célula tumoral del mieloma, la molécula CD38 también se expresa débilmente sobre la membrana del eritrocito, de tal manera que la presencia del anticuerpo monoclonal en el plasma del paciente genera interferencias en las pruebas que utilizan la técnica de antiglobulina indirecta. (5)

Todas estas situaciones incluyendo la identificación de anticuerpos dirigidos contra antígenos de alta incidencia, anticuerpos dirigidos contra antígenos de baja incidencia y anticuerpos dirigidos contra medicamentos evidencian la necesidad de introducir en los laboratorios de inmunohematología, reactivos químicos que permitan la realización de técnicas como la adsorción autóloga o alogénica, elución total (liberación del anticuerpo adsorbido con lisis celular) y elución parcial o disociación (liberación del anticuerpo adsorbido sin lisis celular), las cuales son técnicas útiles e indispensables en la resolución de casos complejos de inmunohematología y las correctas conclusiones inmunohematológicas.

1. Cloroquina

Los glóbulos rojos con PAD positiva por IgG, pueden tener dificultades para la fenotipificación eritrocitaria y en las pruebas de confirmación del antígeno D en donantes de sangre empleando métodos que incluyen la fase de antiglobulina indirecta, los glóbulos rojos recubiertos de IgG pueden conducir a la generación de resultados falsos positivos. Por lo anterior, la disociación con cloroquina, puede ser

una alternativa para limpiar la membrana del glóbulo rojo de las interferencias por IgG y en tal sentido lograr la caracterización antigénica deseada.

En condiciones controladas, una solución de difosfato de cloroquina disocia o “retira” la IgG de la membrana de los glóbulos rojos sin afectar su integridad; por la eficacia de este método, así como por el volumen de células que se puede trabajar, es una buena opción tratar glóbulos rojos que serán empleados en fenotipificación eritrocitaria e incluso aquellos que posteriormente serán empleados en técnicas de adsorción autóloga, para la eliminación de autos presentes en la muestra de un receptor. Es importante mencionar que los antígenos del sistema Rh, Jk(a+) y Jk(b+) pueden expresar cierto debilitamiento o desnaturalización especialmente con tratamientos que exceden dos horas de proceso con este químico, por lo tanto, es importante seguir estrictamente la técnica, no exceder el tiempo descrito, y aplicar los controles intra prueba correspondientes. Paralelamente, el pH de la solución es otra variable que en condiciones no controladas favorece la hemólisis y la destrucción de la membrana del glóbulo rojo con la pérdida de antígenos de interés. (6)

El difosfato de cloroquina actúa impidiendo la formación de inmunocomplejos e inhibiendo la reacción antígeno-anticuerpo por la reducción de cargas eléctricas; a continuación, se describe la técnica estandarizada por *Judd y colaboradores*, (6) en su trabajo científico:

- **Preparación de la solución de difosfato de cloroquina:**

Se diluye el difosfato de cloroquina en solución salina tamponada (SST, pH 7.2) hasta una concentración de 200 mg/ml. Se ajusta el pH a 5.0-5.1 usando NaOH 5N

- **Tratamiento de las células:**

Una parte de los glóbulos rojos empaquetados es tratada con cuatro partes de la solución de cloroquina. Se realiza incubación a temperatura ambiente por períodos de hasta dos horas.

En las conclusiones de esta técnica los autores explican que muchos de los trabajos realizados anteriormente no obtenían buenos resultados porque usaban una concentración más baja de cloroquina. Como resultado de este estudio se reporta que el 17 % de los PAD positivos no se pueden disociar totalmente. Los componentes del complemento (C3 o C4) no se eliminaron en la mayoría de los casos, lo que no se configura en un problema para la inmunohematología visto que se puede usar un reactivo anti-IgG.

- **Procedimiento resumido:**

1. Preparación del difosfato de cloroquina (20g de difosfato de cloroquina en 100ml de solución salina tamponada)

2. Preparación de la muestra: Los glóbulos rojos recubiertos con IgG se incuban con una solución de difosfato de cloroquina.
3. Incubación y lavado: Incubar la preparación a temperatura ambiente durante 30 minutos y lavar una pequeña porción de glóbulos rojos tratados con solución salina.
4. Evaluación con anti-IgG: Evaluar los glóbulos rojos con anti-IgG para determinar si la disociación ha sido exitosa. Si no se logra la disociación, continuar la incubación hasta por 2 horas repitiendo el control con anti-IgG.
5. Uso de los glóbulos rojos después del tratamiento con cloroquina: Una vez que los glóbulos rojos ya no reaccionan con anti-IgG, se pueden usar en pruebas de tipificación de fenotipos eritrocitarios o en técnicas de adsorción autóloga.

Consideraciones adicionales:

- En algunos casos, el difosfato de cloroquina puede no eliminar completamente los anticuerpos de los glóbulos rojos sensibilizados, y en muestras con una prueba inicial muy positiva, la intensidad de los resultados de la PAD puede reducirse lo cual puede ser útil cuando los glóbulos rojos vayan a ser empleados en técnicas de adsorción autóloga.
- Además de remover autos, este método también puede ser útil para tratar antígenos eritrocitarios Bg (HLA). Es fundamental incluir controles adecuados para este tipo de antígenos.
- Si se utilizan estuches comerciales, es esencial seguir estrictamente las instrucciones del fabricante para garantizar la validez de las pruebas y controles.

2. Enzimas proteolíticas

En las investigaciones de identificación de anticuerpos, los paneles de glóbulos rojos tratados con enzimas proteolíticas como papaína y ficina incrementan la reactividad de anticuerpos dirigidos contra los sistemas de grupo sanguíneo Rh, P, I, Kidd, Lewis entre otros, así mismo desnaturalizan o debilitan otros antígenos, especialmente los de los sistemas Duffy y MNS; por lo tanto, cuando se utilizan células tratadas con enzimas se espera que se pierda la reactividad de los anticuerpos dirigidos contra estos antígenos. Se debe tener en cuenta que el significado clínico de los anticuerpos que sólo reaccionan en las técnicas enzimáticas es cuestionable, muchos autores indican que estos anticuerpos podrían ser irrelevantes. (7)

Otras enzimas como la tripsina y la α -quimiotripsina pueden tener efectos diferentes sobre los antígenos de grupo sanguíneo; por ello, puede utilizarse como una estrategia para la identificación de mezclas complejas de anticuerpos o

especificidades poco comunes. Esta diferencia de reactividad de los antígenos frente a diferentes enzimas se basa en que cada enzima puede actuar sobre diferentes regiones de la proteína.

A su vez, el empleo de enzimas proteolíticas como papaína o ficina solas o en sinergia con reactivos sulfhidrilos como DTT promueve la disociación de autos de glóbulos rojos autólogos para facilitar procesos de adsorción del suero o plasma con autoanticuerpos y la identificación de aloanticuerpos circulantes. (9) (Ver imagen 1 y tabla 2)

3. Ditioneitol – 2-mercaptoetanol y bromuro de 2-aminoetilisotiouronio

En ocasiones, es necesario prevenir la aglutinación mediada por autoanticuerpos fríos de tipo IgM. La adición de compuestos sulfhidrilos como el 2-mercaptoetanol (2-ME) o el ditioneitol (DTT) puede realizarse de dos maneras:

- **Mezclando los reactivos con el suero para eliminar anticuerpos IgM y estudiar anticuerpos IgG. (10-12)**

Mecanismo de acción sobre las IgM: Estos compuestos actúan sobre los enlaces disulfuro (-S-S-), reduciéndose a grupos sulfhidrilo (-SH), lo que provoca la separación de las subunidades de IgM de la cadena "J" que las mantiene unidas, anulando su capacidad aglutinante. Al reducirse de forma pentamérica a monomérica, la molécula de IgM pierde su habilidad para aglutinar los eritrocitos.

- **Mezclando los reactivos directamente a los eritrocitos para evitar la aglutinación espontánea de células sensibilizadas por IgM o para eliminar de manera selectiva antígenos sensibles a estos reactivos químicos. (10-13)**

Mecanismo de acción sobre el glóbulo rojo: El DTT y AET alterarán la estructura terciaria de las proteínas por reducción irreversible de los puentes disulfuro a grupos sulfhidrilo libres. Sin la estructura terciaria, los antígenos proteicos no pueden fijar anticuerpos, de manera que la reactividad serológica desaparece.

Aunque el DTT es más estable frente a la oxidación, menos sensible a la luz y carece del olor desagradable del 2-ME, es menos eficiente que el 2-ME en su acción reductora. Ambos reactivos son más efectivos cuando se incuban con las muestras a 37 °C, en lugar de a temperatura ambiente (22°-24°C). Tanto el DTT como el 2-ME desnaturalizan los antígenos Jsa y Jsb, y el DTT desnaturaliza todos los antígenos de los sistemas Kell, Knops, Landsteiner Wiener, Dombrock, John Milton Hagen, entre otros, lo cual puede impactar en la detección de anticuerpos dirigidos contra estas especificidades o en la fenotipificación de estos antígenos.

Además, cuando se utilizan estos reactivos para el tratamiento de suero o plasma, es fundamental realizar un control en paralelo, mezclando partes iguales de suero y solución salina tamponada (SST), para compararlo con el suero tratado con el

agente químico y asegurarse de que la dilución del anticuerpo no se confunde con su desnaturalización o inactivación.

Procedimiento resumido para el tratamiento de glóbulos rojos

- **Principio A:** eliminar la actividad aglutinante de glóbulos sensibilizados por IgM ya que pueden ocasionar falsos positivos en las pruebas de fenotipificación y en las PAD.

Procedimiento resumido

- Lavar los glóbulos rojos con solución salina al menos tres veces y suspenderlos a una concentración del 50%.
- Añadir una cantidad igual de DTT 0,01 M en SST o 2-ME 0,1 M en SST a los glóbulos rojos en suspensión.
- Incubar a 37 °C durante:
 - 10 minutos para 2-ME.
 - 15 minutos para DTT.
- Lavar las células tres veces con SST y diluir la suspensión a una concentración del 2%-5%.
- Evaluar las células tratadas con albúmina al 6% mediante una prueba de centrifugación rápida para asegurarse de que no se aglutinen espontáneamente. Si no hay aglutinación, los glóbulos rojos están listos para las pruebas de tipificación.

Consideraciones importantes

- Si se observa aglutinación espontánea después del tratamiento, es indicativo de que la dispersión de los autoanticuerpos no fue completa. En tal caso, se recomienda repetir el tratamiento o ajustar las concentraciones del reactivo.

Principio B: desnaturalizar antígenos de sistema de grupo sanguíneo sensibles al tratamiento con los reactivos DTT o AET. Bajo este principio también se puede utilizar el otro reactivo sulfidrilo como el bromuro de 2-aminoetilisotiuronio (AET). (Ver tabla 2)

Procedimiento con DTT:

1. Lavar los glóbulos rojos en estudio y los glóbulos rojos control.
2. Agregar 4 volúmenes de DTT 0.2 M a los glóbulos rojos e incubar a 37 °C durante 30-45 minutos.
3. Lavar las células cuatro veces y suspenderlas al 2%-5% en SST.
4. Evaluar las células tratadas con el suero o plasma que contiene los anticuerpos en estudio.

Procedimiento con AET:

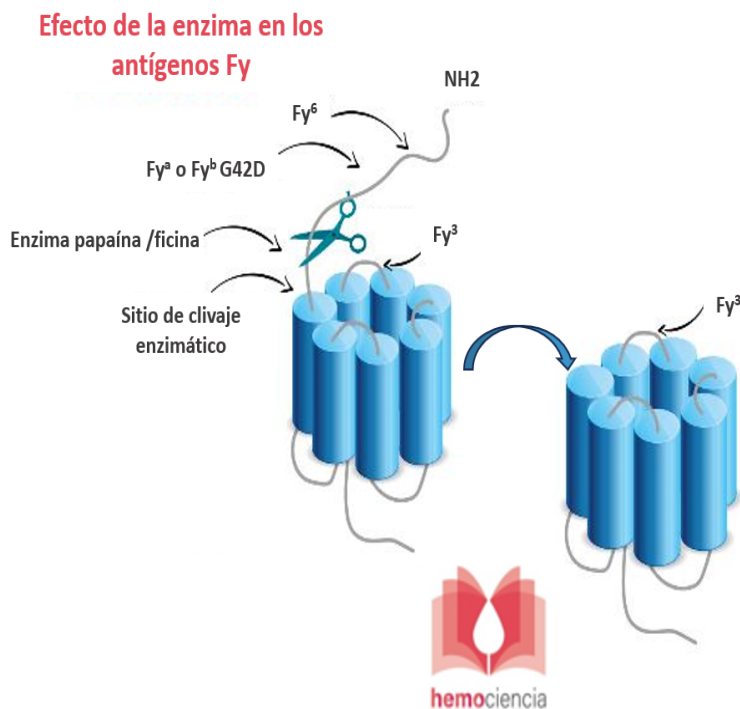
1. Mezclar 4 volúmenes de AET al 6% con 1 volumen de glóbulos rojos.
2. Incubar a 37 °C durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos.
3. Lavar las células 5-7 veces hasta que el sobrenadante esté claro y suspender al 2%-5%.
4. Evaluar las células tratadas con el suero o plasma que contiene los anticuerpos en estudio.

Interpretación de los resultados:

- Glóbulos rojos control: si los glóbulos rojos control de fenotipo K+ no reaccionan con anti-K, el tratamiento con DTT o AET fue exitoso. De lo contrario, el tratamiento fue inadecuado.
- Si la reactividad del suero desaparece tras el tratamiento, esto confirma la especificidad de los anticuerpos presentes.

Consideraciones importantes:

- La concentración de DTT puede ajustarse para afectar selectivamente ciertos antígenos. Por ejemplo, DTT 0.002 M solo afecta los antígenos Jsa y Jsb, lo que permite investigar anticuerpos específicos sin desnaturalizar otros antígenos de importancia clínica.
- El DTT es óptimo para desnaturalizar antígenos de sistemas de grupo sanguíneo como Kell, Cartwright, LW, y Dombrock.
- El AET es utilizado para la preparación artificial de células Ko o para el estudio de antígenos o anticuerpos asociados con el sistema Kell. Después de enfrentar este reactivo a los eritrocitos se recomienda usar reactivo de Coombs monoespecífico IgG, cuando se lleven a cabo pruebas de compatibilidad o identificación de anticuerpos hasta la fase de AGH para evitar reacciones falsas positivas.
- EL AET desnaturaliza los antígenos del sistema Kell (excepto Kx), Yta, Hy, Kna, Lub y Yka, pero potencia la reacción del anti Gerbich (reacciona fuertemente este anticuerpo con las células tratadas con el 2-AET). 10



Efecto de las enzimas y los reactivos DTT y AET en los antígenos FY				
Antígeno	Ficina / Papaína	Tripsina	A-quimiotripsina	200 mM DTT/ AET
Fy ^a Fy ^b	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Fy ³	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Imagen 1: Imagen representativa de la proteína Duffy y del efecto de las enzimas en sus antígenos

Fuente: Imagen ilustrada por el grupo Hemociencia. Adaptada a partir de: gráfica Denome Gregory A. Transfusion and Apheresis Science 44 (2011) página 58; tabla adaptada y traducida de Marion E. Reid, Christine Lomas-Francis, Martin L. Olsson. The Blood Group Antigen Factsbook, 2012.

Tabla 2: Utilidad del efecto de enzimas y DTT sobre antígenos en la identificación de anticuerpos

Ficina/ Papaina	Tripsina	α -Quimio- trypsina	200 mM DTT/AET	Posible Especificidad
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Bp ^a ; Ch/Rg; XG

Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	IN; JMH
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	M, N, En ^a TS; Ge2; Ge4
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	'N'; Fy ^a , Fy ^b
Variable	Positivo	Negativo	Positivo	S, s
Variable	Positivo	Negativo	Débil o Negativo	YT
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	En ^a FS
Positivo	Negativo	Negativo	Débil o Negativo	LU, MER2
Positivo – Papaina Débil o negativo _ Ficina	Negativo	Negativo	Negativo	KN
Positivo	Negativo	Débil	Negativo	DO
Positivo	Positivo	Negativo	Débil	CROM
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Algunos DI (3er Loop)
Positivo	Positivo	Positivo/Débil	Negativo	LW
Positivo	Positivo/Débil	Positivo/Débil	Positivo	SC
Positivo	Positivo ^	Positivo ^	Negativo	KEL ^ (excepto KALT, que es sensible a Trypsina)
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	ABO; En ^a FR, U; P1PK; RH; LE; Fy3; JK; mas DI; CO; H; Ge3; OK; I/i; P; FORS; JR; LAN; Cs ^a ; ER; LKE; PX2; Vel; ABTI; At ^a ; Emm; AnWj; Sd ^a , PEL; MAM
Positivo	Positivo	Positivo	Incrementado	Kx
<p>^ Antígenos del Sistema de Grupo Sanguíneo Kell son sensibles al tratamiento con la mezcla de trypsin y α-quimiotrypsina.</p> <p>† DTT puede ser variable</p>				

Fuente: Tabla tomada y traducida de *Marion E. Reid, Christine Lomas-Francis, Martin L. Olsson. The Blood Group Antigen Factsbook, 2012.*

Procedimiento resumido para el tratamiento de plasma o suero

Principio: Anular la actividad aglutinante y fijadora de complemento de los anticuerpos IgM, permitiendo la detección de anticuerpos IgG coexistentes.

Procedimiento resumido

1. Dispensar 1 mL de suero en dos tubos de ensayo:
 - Tubo de control: agregar 1 mL de SST.
 - Tubo de prueba: agregar 1 mL de DTT 0,01 M.
2. Mezclar bien e incubar ambos tubos a 37 °C durante 30-60 minutos.
3. Usar las muestras tratadas con DTT y las de control para procedimientos serológicos de evaluación de anticuerpos.

Interpretación de la prueba

- Reactividad en el suero control, pero no en el tratado con DTT: Indica la presencia de un anticuerpo IgM.
- Reactividad en ambos tubos (control y tratado con DTT): Sugiere la presencia de un anticuerpo IgG o una mezcla de IgG e IgM.
- Falta de reactividad en el suero control: Indica una posible dilución excesiva o que la reactividad del anticuerpo ha sido atenuada, lo que invalida la prueba.
- Control de calidad
- Realizar el tratamiento en paralelo con una muestra de suero o plasma que contenga anticuerpos IgM conocidos para validar la prueba.
- Verificar que las muestras de control y prueba no presenten errores de preparación o incubación prolongada.

Consideraciones importantes

- Durante el tratamiento con DTT puede ocurrir gelificación de la muestra, lo que se debe a una concentración mayor a la estandarizada de DTT (>0,01 M) o a una incubación excesiva. Las muestras gelificadas no pueden analizarse, ya que la desnaturalización de las proteínas séricas imposibilita su estudio.
- Es importante preparar y utilizar correctamente los reactivos sulfhidrilos para evitar la inactivación de los anticuerpos por razones no relacionadas con su estructura natural.

4. ZZAP

Uno de los reactivos más útiles en la disociación de complejos inmunes es ZZAP (una mezcla de ditioneitol (DTT) y una enzima proteolítica como la papaína activada con L-cisteína). El ZZAP se emplea para remover anticuerpos IgG de células sensibilizadas sin afectar la membrana eritrocitaria por lo cual es útil para tratar los glóbulos rojos previo a los procesos de adsorción autóloga. El ZZAP actúa reduciendo los puentes disulfuro en las moléculas, incrementa la susceptibilidad de las moléculas de IgG a la acción de la enzima proteolítica, por lo tanto, la molécula de IgG pierde su integridad y es removida de la superficie de los eritrocitos. Este reactivo es particularmente valioso en casos de anemia hemolítica autoinmune mediada por anticuerpos calientes, aunque no es útil en los casos mediados por anticuerpos fríos. No obstante, las células tratadas con ZZAP no deben usarse para fenotipificación, ya que al ser una mezcla de DTT y enzimas proteolíticas desnaturaliza antígenos de sistemas de grupo sanguíneo como Kell (excepto Kx), M, N, S, Fya, Fyb, Fy6, Yta, Ch, Rg, Pr y Xga, entre otros. (14)

Procedimiento resumido:

- Lavar los glóbulos rojos y mezclarlos con ZZAP.
- Incubar a 37 °C durante 30-45 minutos.
- Lavar las células y suspenderlas en una SST.
- Las células tratadas pueden usarse en adsorciones, pero no deben emplearse para la determinación de fenotipo eritrocitario.

5. EDTA-glicina ácida

La efectividad de la EDTA-glicina ácida (EDTA-GA) se describió por primera vez por Louie, Jian y Zaroulis en 1986, (15) cuando 50 muestras que fueron tratadas *in vitro* después de haber sido sensibilizadas con aloanticuerpos, evidenciaron efectividad del 85% empleando EDTA-GA. Ensayos posteriores permitieron concluir que EDTA-GA es altamente efectiva para el tratamiento de muestras PAD positivo de 1 a 4+, por moléculas de IgG. En un tiempo máximo de cinco minutos, los eritrocitos que inicialmente tenían PAD positiva pueden usarse para realizar adsorción y/o tipificación sanguínea.

Procedimiento resumido

- Lavar los glóbulos rojos seis veces con SST.
- Preparar el reactivo glicina ácida/EDTA mezclando 20 volúmenes de glicina ácida-HCl 0.1 M (pH 1.5) con 5 volúmenes de EDTA al 10%.
- Colocar 10 volúmenes de glóbulos rojos concentrados en un tubo limpio.
- Agregar 20 volúmenes de la solución de glicina ácida/EDTA.
- Mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante no más de 2-3 minutos.
- Agregar 1 volumen de TRIS-CINa 1.0 M para neutralizar la acidez y mezclar.
- Centrifugar durante 1-2 minutos. Aspirar y descartar el sobrenadante.

- Lavar los glóbulos rojos cuatro veces con solución salina.
- Evaluar las células lavadas con anti-IgG. Si no reaccionan, las células pueden emplearse para tipificación o adsorción. Si la PAD sigue siendo positiva, repetir el tratamiento.

Consideraciones importantes:

- Los antígenos del sistema Kell, Bg, y Er pueden ser desnaturalizados o debilitados por el tratamiento, lo que impide su tipificación en glóbulos rojos tratados. (16)
- Es fundamental controlar estrictamente los tiempos de incubación para evitar daño a los glóbulos rojos, ya que un tiempo excesivo con glicina ácida/EDTA daña irreversiblemente las membranas celulares.

6. Polietilenglicol

El Polietilenglicol (PEG) es un polímero lineal hidrosoluble que se usa como aditivo para incrementar la captación de anticuerpos; su acción principal es eliminar el agua intercelular favoreciendo el acercamiento de los glóbulos rojos. El PEG es un reactivo utilizado en la adsorción autóloga o alogénica de anticuerpos calientes. El reactivo de antiglobulina humana de elección en las pruebas con PEG suele ser el anti-IgG (monoespecífico), debido a que evita las reacciones falsas positivas con algunos agentes poliespecíficos. Cuando se realizan procedimientos de adsorción alogénica con PEG empleando glóbulos rojos pretratados con enzimas proteolíticas es posible reducir hasta en un 69% los tiempos operativos e incrementar las tasas de éxito en las investigaciones de anticuerpos. (17,18)

Cabe recordar que la adsorción es el proceso mediante el cual se retira del suero el anticuerpo circulante al combinarlo con eritrocitos seleccionados en condiciones óptimas de reacción. La mezcla de suero y eritrocitos se incuba, permitiendo que los anticuerpos se adsorban en los antígenos presentes en la membrana de los eritrocitos; posteriormente, la mezcla se centrifuga y el suero adsorbido se separa de los eritrocitos.

El método de adsorción se utiliza comúnmente para eliminar autos presentes en el suero. En el caso de la adsorción autóloga, que emplea los eritrocitos del paciente, se logra remover los autos sin afectar a los posibles aloanticuerpos presentes en el suero. La temperatura a la que se realiza la adsorción autóloga depende de la reactividad óptima del autoanticuerpo. Las adsorciones autólogas calientes, realizadas a 37°C, se utilizan para remover autos de tipo IgG, mientras que las adsorciones autólogas frías, llevadas a cabo a 4°C, eliminan autoanticuerpos de tipo IgM. Una vez que los autos han sido adsorbidos, el suero del paciente puede utilizarse para identificar aloanticuerpos y para realizar pruebas de compatibilidad. Debido a que los glóbulos rojos del paciente pueden ser PAD positiva, el tratamiento previo de los glóbulos con cloroquina, DTT, AET, 2-ME o EDTA-GA puede ser efectivo para liberar sitios antigénicos e incrementar la capacidad de adsorción de anticuerpos libres. La elección del reactivo químico para el tratamiento

previo de los eritrocitos estará relacionada con las moléculas asociadas a la PAD positiva y el tipo de anticuerpo involucrado. (12)

Asimismo, el PEG puede utilizarse en adsorciones alogénicas, donde se emplean glóbulos rojos de donantes de sangre u otras fuentes de eritrocitos concentrados con fenotipos conocidos para los sistemas de grupo sanguíneo de mayor importancia clínica (RH, FY, JK, KELL, MNS, en particular los antígenos S y s). Esta técnica es útil para detectar aloanticuerpos ocultos en presencia de autos si el paciente ha sido transfundido con glóbulos rojos en los últimos tres meses o si los glóbulos rojos autólogos son insuficientes. También es valiosa en la investigación de mezclas de aloanticuerpos y anticuerpos dirigidos contra antígenos de alta incidencia.

En las adsorciones alogénicas, es posible tratar previamente los glóbulos rojos utilizados para la adsorción con enzimas o ZZAP, lo que mejora la eficiencia del proceso. Sin embargo, los glóbulos rojos tratados perderán los antígenos desnaturalizados por el DTT y las enzimas, lo cual debe tenerse en cuenta al analizar los resultados de identificación de anticuerpos. (12,18)

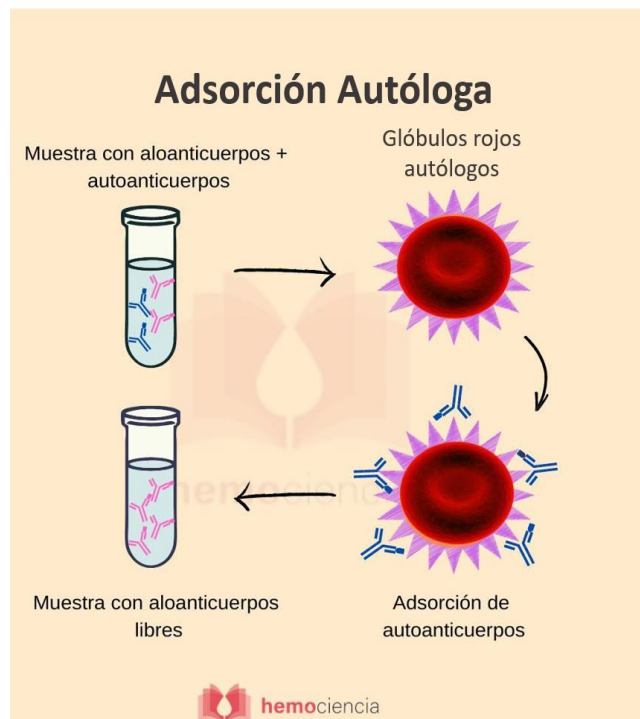
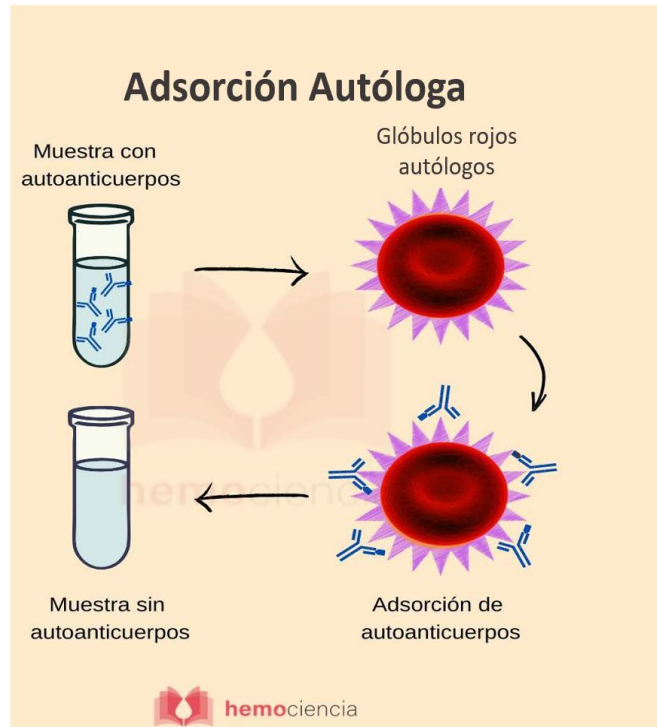
Procedimiento resumido:

Este método puede aplicarse tanto en adsorciones autólogas como alogénicas.

- Lavar las alícuotas de glóbulos rojos con SST al menos tres veces y centrifugar durante 5-10 minutos a 3500 RPM. Eliminar completamente la solución salina residual.
- Añadir a 1 volumen de glóbulos rojos, 1 volumen de suero y 1 volumen de PEG. Mezclar bien e incubar durante 15 minutos a 37°C.
- Centrifugar la mezcla de suero/PEG/glóbulos rojos durante 5 minutos y recoger la mezcla adsorbida de suero/PEG.
- Para evaluar el suero adsorbido: Agregar el doble de volumen de la mezcla de suero/PEG a los glóbulos rojos utilizados para el estudio (células de rastreo o de identificación de anticuerpos irregulares).
- Incubar durante 15 minutos a 37°C y realizar una prueba de antiglobulina utilizando anti-IgG (se requiere el incremento del volumen de suero/PEG debido a la dilución del suero por el PEG).

Consideraciones importantes:

- Los glóbulos rojos utilizados para la adsorción pueden ser previamente modificados químicamente, por ejemplo, con enzimas o ZZAP, si se desea desnaturalizar ciertos antígenos o con el fin de incrementar la efectividad de la adsorción.
- Algunos reportes científicos han informado el debilitamiento o pérdida de la reactividad de ciertos anticuerpos cuando se compara con otras técnicas.
- El suero adsorbido debe evaluarse el mismo día en que se realizó la adsorción, ya que la reactividad del anticuerpo puede disminuir durante el almacenamiento, posiblemente debido a la precipitación de proteínas en almacenamiento a 4°C.



Imágenes 2 y 3: Imágenes representativas del fundamento de la adsorción autóloga. En la primera imagen se presenta una muestra con autoanticuerpos (Y) que son enfrentados con los glóbulos rojos que contienen antígenos (A) en su membrana correspondientes y en el proceso de adsorción autóloga se unen dejando la muestra de plasma o suero libre de autoanticuerpos.

En la segunda imagen se presenta una muestra con auto y aloanticuerpos. En el proceso de adsorción autóloga solo se adsorben los autoanticuerpos y se obtiene una muestra con el aloanticuerpo para identificar.

Fuente: Imagen original grupo Hemociencia

Conclusión

Los reactivos químicos desempeñan un papel fundamental en el laboratorio de inmunohematología, permitiendo la resolución de casos complejos que, de otro modo, comprometerían la seguridad transfusional. Su uso adecuado en técnicas como adsorciones, eluciones y la disociación de inmunoglobulinas de los glóbulos rojos, facilita la identificación precisa de aloanticuerpos y autos, aspecto esencial para garantizar la compatibilidad en las transfusiones. Reactivos como el DTT, 2-ME, cloroquina, y ZZAP, no solo mejoran la sensibilidad de las pruebas serológicas, sino que también permiten la liberación de sitios antigénicos bloqueados, optimizando la capacidad de adsorción y fenotipificación.

La correcta elección y manejo de estos reactivos aseguran la detección de anticuerpos clínicamente significativos, minimizando el riesgo de reacciones hemolíticas severas en pacientes. Además, su empleo es crucial en el contexto de pacientes transfundidos recientemente o aquellos con autoanticuerpos que enmascaran aloanticuerpos. En definitiva, los reactivos químicos son herramientas indispensables para mantener los estándares más altos de seguridad transfusional, contribuyendo directamente a la eficacia terapéutica y la reducción de complicaciones adversas a la transfusión.

Estos procedimientos han estado estandarizados durante décadas en manuales técnicos reconocidos, como el de la AABB, los Métodos de Judd y otros manuales de inmunohematología, que proporcionan lineamientos detallados para su implementación y ejecución en los laboratorios. Gracias a estos recursos, los laboratorios cuentan con protocolos claros para la correcta utilización de reactivos químicos, garantizando la calidad y seguridad en los estudios serológicos y transfusionales. Sin embargo, en Latinoamérica, es necesario ampliar el uso de estas herramientas esenciales para mejorar la seguridad transfusional y asegurar el acceso a procedimientos estandarizados en toda la región.

Nota de los autores: Los procedimientos resumidos se realizaron a partir de los métodos detallados en el Manual Técnico de la AABB y los Métodos de Judd. Para su implementación y ejecución en el laboratorio se deben consultar los procedimientos descritos y ampliados en los estándares internacionales.

Bibliografías:

1. Pérez-Carrillo JA, Cortés-Buelvas A. Caracterización de la aloinmunización eritrocitaria en el Hospital Universitario del Valle entre 2011 y 2013. MedUNAB

- [Internet]. 4 de noviembre de 2014 [citado 24 de octubre de 2024];17(2):66-80. Disponible en: <https://revistas.unab.edu.co/index.php/medunab/article/view/2086>
2. Chou ST, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. *Br J Haematol.* 2012 Nov; 159(4):394-404. doi: 10.1111/bjh.12061. Epub 2012 Oct 4. PMID: 23034087.
 3. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. *The Blood Group Antigen FactsBook*. 3rd ed. Elsevier, 2012. 745 p. doi: 10.1016/B978-0-12-415849-8.00051-X
 4. Toro Espinosa LA, Jaramillo Arbelaez PE. Caracterización de la anemia hemolítica autoinmune y utilidad de la prueba de antiglobulina directa mono-específica en el diagnóstico. *RH [Internet]*. 2 de septiembre de 2020 [citado 25 de octubre de 2024];24(2):55-64. Disponible en: <https://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/article/view/246>
 5. Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, Chapuy B, Laubach JP, Richardson PG, Doshi P, Kaufman RM. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion.* 2015 Jun;55(6 Pt 2):1545-54. doi: 10.1111/trf.13069. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25764134.
 6. Edwards JM, Moulds JJ, Judd WJ. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes. A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. *Transfusion.* 1982 Jan-Feb;22(1):59-61. doi: 10.1046/j.1537-2995.1982.22182154219.x. PMID: 6801829.
 7. O'Connor J, See L. Identification of antibodies to red cell antigens. In: Cohn C, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, Schwartz JY (2023) *Technical manual*, 21st edn. AABB, Bethesda. Chapter 13, p 431
 8. Tsimba-Chitsva F, Bishop S, Kezeor K. Warm autoadsorption with enzyme-treated red blood cells. *Immunohematology.* 2012;28(3):88-90. PMID: 23286554.
 9. Judd WJ, Johnson ST, Storry JR. *Judd's methods in immunohematology*. 3rd ed. Bethesda (MD): AABB; 2008. Section 7. p 287
 10. Olson PR, Weiblen BJ, O'Leary JJ, Moscovitz AJ, McCullough J. A simple technique for the inactivation of IgM antibodies using dithiothreitol. *Vox Sang.* 1976;30(2):149-59. doi: 10.1111/j.1423-0410.1976.tb02806.x. PMID: 1251578.
 11. Okuno T, Kondelis N. Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. *J Clin Pathol.* 1978 Dec;31(12):1152-5. doi: 10.1136/jcp.31.12.1152. PMID: 34632; PMCID: PMC1145522.
 12. Fung, Mark K. Grossman, Brenda J. Hillyer, Christopher D. Westhoff, Connie M. . *Technical Manual*, 18th edition. <https://ebooks.aabb.org/pdfreader/technical-manual-18th-edition>. Chapter 17, p 650
 13. Freedman J, Masters CA, Newlands M, Mollison PL. Optimal conditions for the use of sulphhydryl compounds in dissociating red cell antibodies. *Vox Sang.* 1976;30(3):231-9. doi: 10.1111/j.1423-0410.1976.tb02821.x. PMID: 1251589.
 14. Branch DR, Petz LD. A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. *Am J Clin Pathol.* 1982 Aug;78(2):161-7. doi: 10.1093/ajcp/78.2.161. PMID: 6808844.
 15. Louie JE, Jiang AF, Zaroulis CG. Preparation of intact antibody-free red blood cells in autoimmune hemolytic anemia (abstract). *Transfusion* 1986;26(Suppl):S20.
 16. Kosanke J. EDTA glycine acid treatment of red blood cells. *Immunohematology.* 2012;28(3):95-6. PMID: 23286556.
 17. Etem ME, Laird-Fryer B, Holub MP, Hedl JJ, Symington DB, Figueroa D. Allogeneic adsorptions: a comparison of the traditional method with a modified PEG adsorption method. *Immunohematology.* 2010;26(3):104-8. PMID: 21214296.
 18. Issitt, P. D., & Anstee, D. J. (1998). *Applied blood group serology* (4th ed.). Montgomery Scientific Publications. p 495