

“Interferencias generadas en las pruebas de compatibilidad por causas distintas a los anticuerpos antieritrocitarios”



Dr. Eduardo MUÑIZ-DIAZ
Consultor Senior
Banc de Sang i Teixits
Barcelona, España

Aglutinaciones producidas por causas ajenas a los Acs irregulares antieritrocitarios

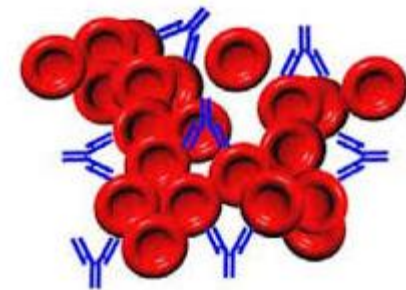
1. Anticuerpos contra sustancias químicas presentes en:

- La solución en la que están suspendidos los hematíes comerciales
- Los antisueros comerciales (tipaje ABO)
- Los potenciadores de la reacción Ag/Ac (albúmina, LISS)



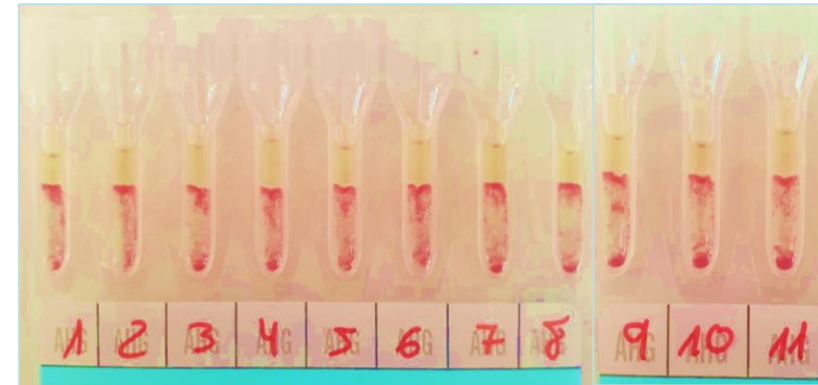
2. Anticuerpos reactivos con las muestras coaguladas (suero), pero no con el plasma

3. Anticuerpos reactivos con los hematíes senescentes



Aglutinaciones producidas por causas ajenas a los Acs antieritrocitarios

- PANAGLUTINACIÓN en el curso de una Investigación de Acs irregulares



- TIPAJE ABO ERRÓNEO (discordancia hemático-sérica): prueba hemática con un falso resultado positivo

Anti-A	Anti-B	Hematíes A ₁	Hematíes B
4+	4+	0	4+

DEMORAS EN LA TRANSFUSIÓN

Sustancias químicas contra las que van dirigidos los anticuerpos

Antibióticos

Neomicina
Cloramfenicol
Gentamicina

Bacteriostáticos Antifúngicos

Paraben
Thimerosal
Azida de sodio

Azúcares

Glucosa

Miscelánea

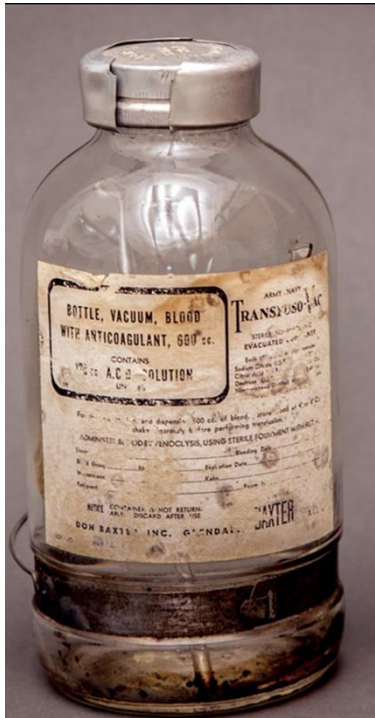
EDTA
Inosina
Citrato
Caprilato de sodio
Hidrocortisona

Colorantes

Acriflavina
Amarillo 5 tartrazina

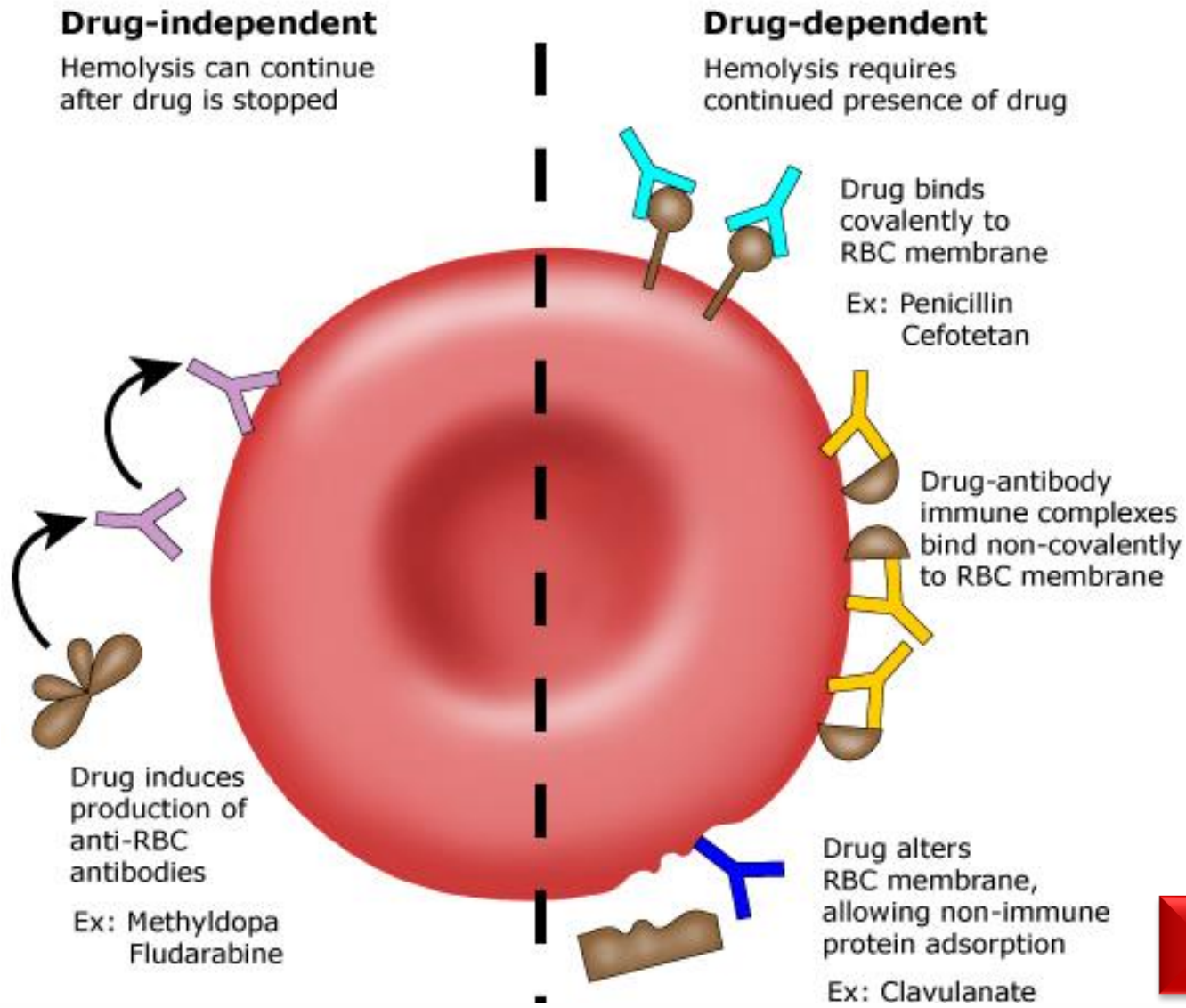
Anticuerpos dirigidos contra los antibióticos presentes en el medio de suspensión de los hematíes comerciales

- Ley AB et al. Circulating antibody directed against penicillin. *Science* 1958;127:1118.



- Se añade penicilina al tubo para evitar la contaminación bacteriana
- Algunos pacientes presentan un anticuerpo que reacciona con todos los hematíes: ¿Ac contra un antígeno de alta frecuencia?
- Observan que la reactividad desaparece al emplear hematíes de la botella
 - La penicilina establece una unión covalente con los hematíes del tubo piloto (mecanismo de adsorción)
 - Los Acs anti-penicilina del paciente provocan la aglutinación

¡El lavado repetido de los hematíes del tubo piloto no es suficiente para eliminar la penicilina porque está unida covalentemente a los hematíes!



Mecanismo de adsorción empleado por la **Penicilina**



¡El lavado de los hematíes comerciales puede ser insuficiente para eliminar el fármaco y negativizar la reacción!

Habitualmente, el mecanismo empleado por otros antibióticos (**Neomicina, Cloramfenicol, Gentamicina**) es el de Inmunocomplejos



¡El lavado de los hematíes comerciales suele ser suficiente para eliminar el fármaco y negativizar la reacción!

Si el lavado intenso no es suficiente, debemos sustituir los hematíes comerciales por otros sin el fármaco

Anticuerpos contra la hidrocortisona del medio de suspensión de los hematíes comerciales

- En 1973 se describen 25 ejemplos de Acs IgM contra la hidrocortisona (Mann JM. *Transfusion* 1973;13:346).



Hematíes suspendidos en un medio con hidrocortisona



Hematíes lavados y suspendidos en un medio sin hidrocortisona

- Un 26% de adultos sanos tienen Acs IgM contra la hidrocortisona.
- Un 80% de pacientes con Lúes, y hasta un 100% de los pacientes con Artritis reumatoide pueden tener Acs contra los esteroides.

Pinto M, Rimon A. *Vox Sang* 1970;18:155

Anticuerpos contra azúcares añadidos al medio de suspensión de los hematíes comerciales

En 1964 se observó que el suero de 3 donantes y 2 pacientes aglutinaba a los hematíes que habían estado previamente en contacto con Lactosa, la cual se unía a los hematíes como lo hace la Penicilina (adsorción)

% de portadores de Acs reactivos contra diferentes tipos de azúcares

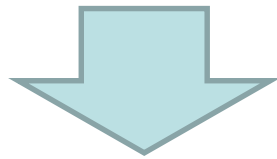
Azúcar	Bird G, Roy T (1980)	Lalezari P (1984)
D-glucosa	0,3	1,9
D-galactosa	0,5	11,8
D-Manosa	0,6	27,5
Lactosa	0,6	22,5
Dextrosa	0,8	22,0
Melibiosa	48,1	100,0
Sucrosa	NE	0

Morel PA. *Transfusion* 1981;21:652
Reid ME. *Vox Sang* 1981;41:85-90

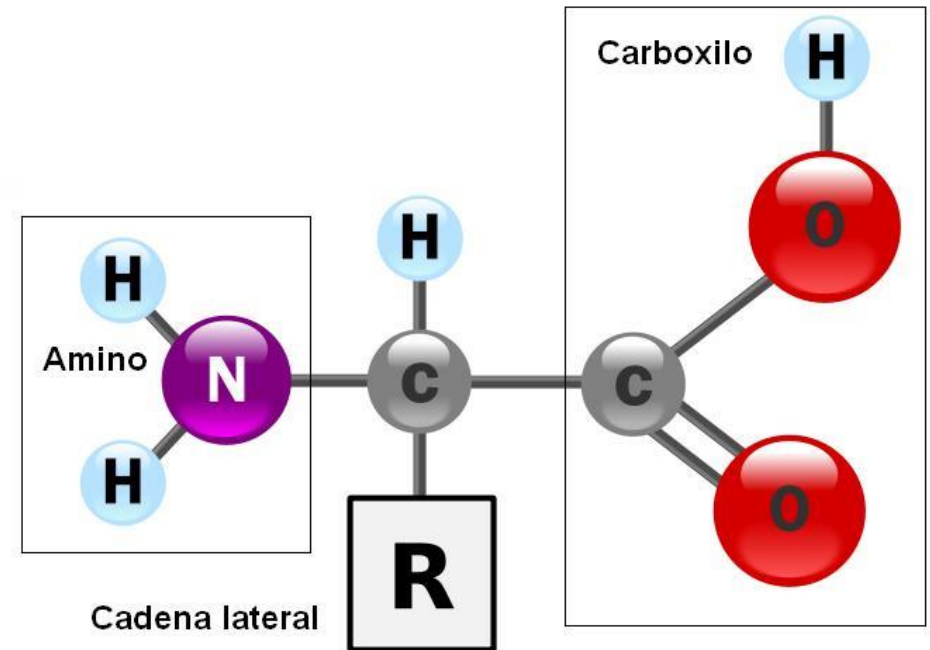
Anticuerpos contra azúcares añadidos al medio de suspensión de los hematíes comerciales

Un caso especial

Anticuerpos que muestran una especificidad M o N, cuando los hematíes han estado conservados en un medio con dextrosa



La dextrosa interacciona con el grupo amino del aminoácido N-terminal de los antígenos MN, creando una nueva estructura que induce la producción de anticuerpos: anti-M^D y anti-N^D



Morel PA. *Transfusion* 1981;21:652
Reid ME. *Vox Sang* 1981;41:85-90

Acs contra sustancias químicas presentes en los antisueros comerciales

Anticuerpos contra colorantes

- Entre 1968-1973 se describieron los casos de 3 pacientes con Acs contra la acriflavina y 1 paciente con Acs contra el amarillo 5-tartrazina (anti-B)
- La incubación de los hematíes en su propio plasma (sin lavar) producía una aglutinación al tipar con el reactivo comercial anti-B
- El problema se resolvía con el lavado de los hematíes previo al anti-B



Beattie KM. *Transfusion* 1968;8:254

Beattie KM. *Transfusion* 1971;11:107

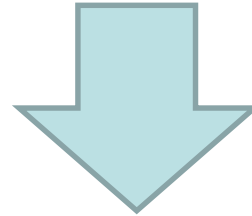
Jones TE. *Transfusion* 1973;13:150

Anticuerpos contra bacteriostáticos (Azida de Sodio)

- Reviron describe en 1984 una aglutinina fría (anti-I) potenciada en presencia de la azida de sodio incluida en los reactivos para el tipaje ABO

Reviron M. *Vox Sang* 1984;46:211

Acs contra sustancias químicas presentes en los antisueros comerciales



Discordancias hemático-séricas

Ejemplo

Prueba hemática: AB
Prueba sérica: A

Anti-A	Anti-B	Hematías A1	Hematías B
4+	4+	0	4+

Solución:

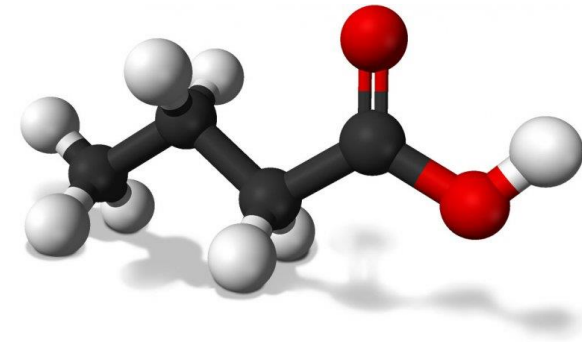
- Utilizar otro antisuero para el tipaje.
- Repetir el tipaje con un lavado intenso de los hematías

Acs contra sustancias químicas presentes en potenciadores Ag/Ac: Albúmina bovina

- En 1956 se describieron 3 pacientes portadores de autoaglutininas que sólo reaccionaban en presencia de la albúmina bovina (Weiner W. *Vox Sang* 1956;1:279)
- En 1969 se observa que los Acs van dirigidos contra el caprilato de sodio (sal del ácido caprílico) que se añade a la albúmina como estabilizador (Golde DW. *J Clin Pathol* 1971;55:33:1)
- En 1971 se observa que la reacción se produce concretamente con los ácidos grasos de cadena corta (Spence L. *Transfusion* 1971;11:193)

Los Acs anti-Albúmina pueden detectarse en:

- 96% de gestantes
- 100% de pacientes insulino-dependientes
- 10%-31% de pacientes con enfermedades autoinmunes
- 3% de personas "sanas"



Hirayama C. *Immunological Communications* 1981;10:401
Atkinson MA. *N Engl J Med* 1993;329:1853

Acs contra sustancias químicas presentes en potenciadores Ag/Ac: LISS

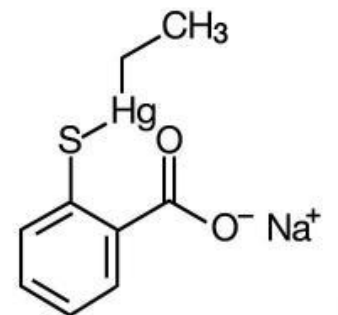
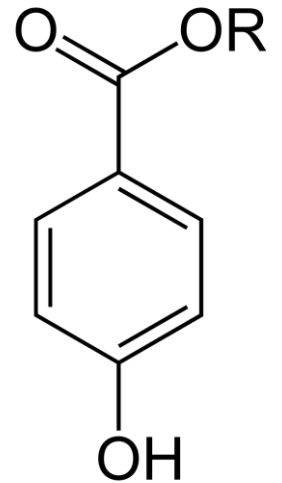
- Desde 1982 se han reportado numerosos casos de Acs reactivos con el LISS, en realidad contra dos conservantes/antifúngicos/bacteriostáticos: Parabeno y Timerosal
- Los **Acs anti-Parabeno** mostraban especificidad anti-Jk^a (hematíes Jk^a positivo suspendidos en LISS) y eran complemento-dependientes (antiglobulina con C₃)
- Los Acs no eran detectables en salina, enzimas, albúmina o LISS sin Parabeno

Halima D. *Transfusion* 1982;22:521

Judd WJ. *Transfusion* 1982;22:31

- Los **Acs anti-Timerosal** no eran estrictamente Timerosal-dependientes, pero se potenciaban en su presencia
- Algunos Acs mostraban especificidad e/Cc, I, pdl

Arndt P. *Transfusion* 1997;37 (Suppl):S134



Aglutinaciones producidas por causas ajenas a los Acs irregulares antieritrocitarios

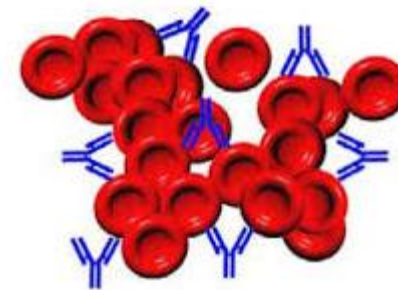
1. Anticuerpos contra sustancias químicas presentes en:

- La solución en la que están suspendidos los hematíes comerciales
- Los antisueros comerciales (tipaje ABO)
- Los potenciadores de la reacción Ag/Ac (albúmina, LISS)



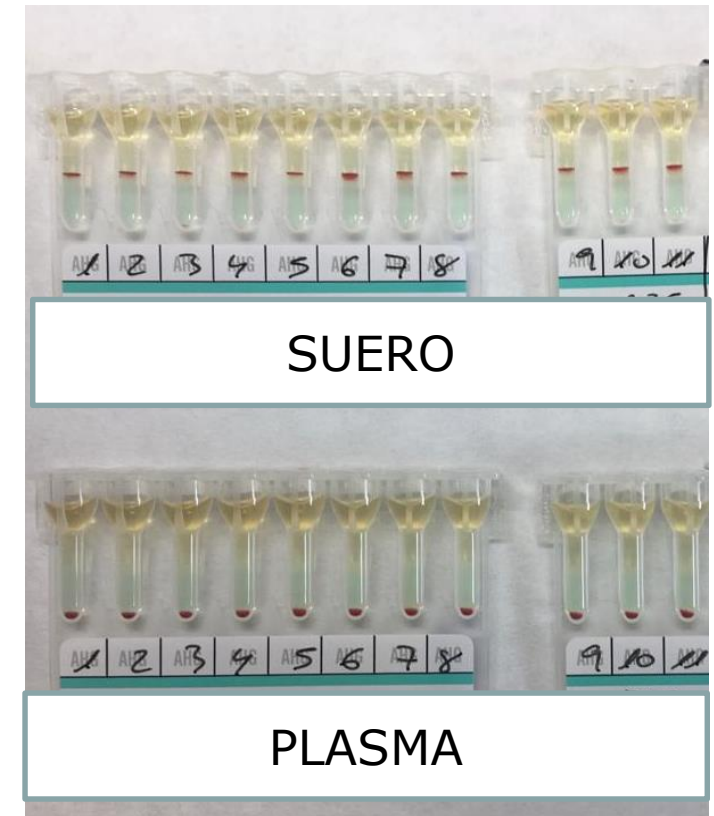
2. Anticuerpos reactivos con las muestras coaguladas (suero), pero no con el plasma

3. Anticuerpos reactivos con los hematíes senescentes



Acs reactivos con muestras coaguladas (suero), pero no con las muestras de plasma

- En 1980 se reporta un anticuerpo reactivo cuando se emplea suero, pero no plasma
- La muestra de plasma se hace progresivamente positiva a medida que se ésta se coagula
- La muestra coagulada *in vitro* con trombina también deviene positiva
- Se postula la idea de que son Acs IgG contra factores de la coagulación activados y/o serín proteasas
- La reacción daría lugar a Inmunocomplejos que se fijaría secundariamente a los hematíes
- En ocasiones muestran especificidad: anti-Sc1, anti-Kp^b, anti-c



Aglutinaciones producidas por causas ajenas a los Acs irregulares antieritrocitarios

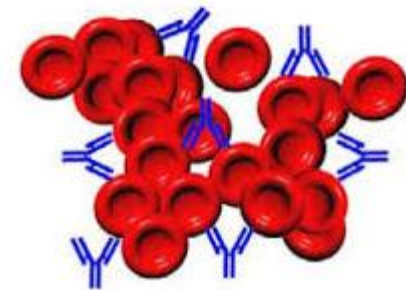
1. Anticuerpos contra sustancias químicas presentes en:

- La solución en la que están suspendidos los hematíes comerciales
- Los antisueros comerciales (tipaje ABO)
- Los potenciadores de la reacción Ag/Ac (albúmina, LISS)



2. Anticuerpos reactivos con las muestras coaguladas (suero), pero no con el plasma

3. Anticuerpos reactivos con los hematíes senescentes

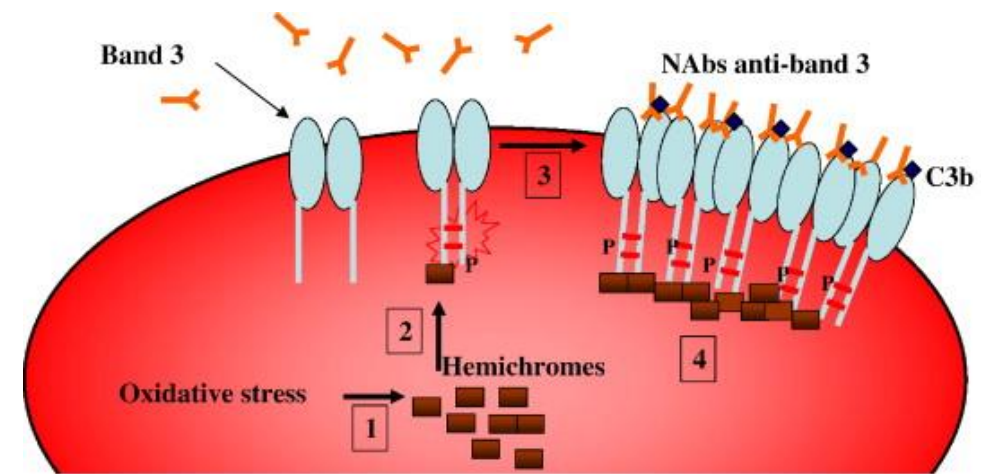


Acs reactivos con hematíes senescentes

Sólo reaccionan, o reaccionan mejor, con los hematíes senescentes o envejecidos que han estado almacenados durante un tiempo

Descritos, inicialmente, como aglutininas frías que reaccionaban dando una imagen en campo mixto

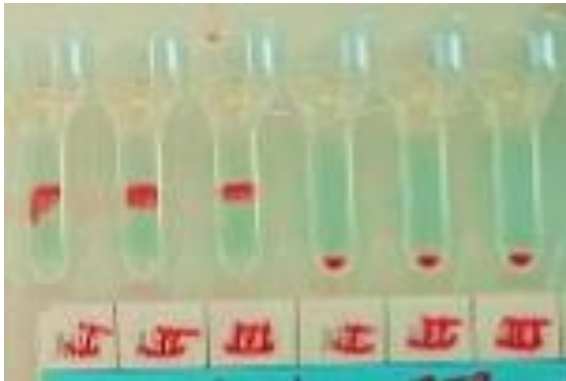
- Ahora se cree que se trata de Acs reactivos con el Ag senescente (SCA) descrito por Kay (1986), y más tarde localizado en la Banda 3 de la membrana
- Los Acs senescentes (criptoantígenos) sólo los expresan los hematíes más viejos, facilitando su eliminación a través de autoaglutininas IgG
- Los hematíes sensibilizados por las aglutininas IgG son eliminados secundariamente por los macrófagos



1. Oxidative denaturation of hemoglobin leading to hemichrome formation
2. Hemichrome binding to band 3 cytoplasmic domain cause their oxidative cross-linking through disulfide bonds and their tyr phosphorylation
3. Band 3 dissociation from cytoskeletal proteins and its clusterisation
4. Formation of large band 3/hemichromes clusters and opsonisation by NAb and C3b

Kay MMB. *AABB* 1986;35-82

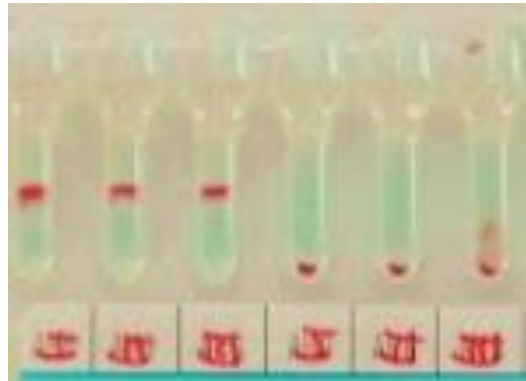
Acs reactivos con hematíes senescentes



Hematíes
Senescentes
Día +60

Hematíes
de donantes
no comerciales

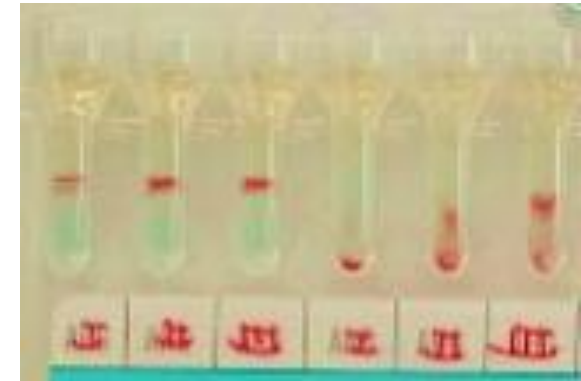
Straton F et al. *Lancet* 1960; 1: 1388



Hematíes
Senescentes
Día +60

Hematíes
comerciales
Día +10

Arndt P et al. *Transfusion* 1989 (Suppl) 29:48S

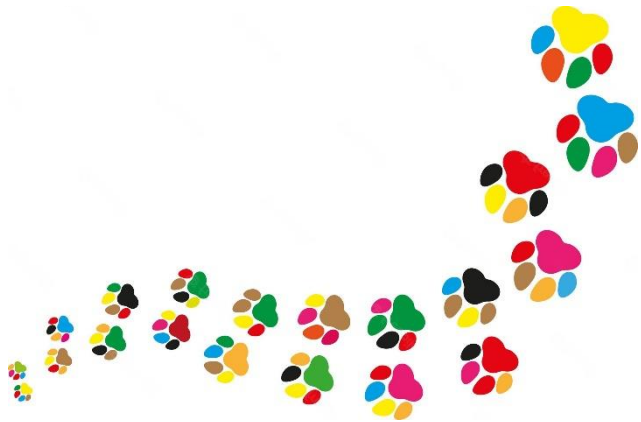


Hematíes
Senescentes
Día +60

Hematíes
comerciales
Día +25

Branch DR et al. *Blood* 1984; 63: 177

¿Cómo podemos sospechar que estamos ante una interferencia de este tipo?



¿De qué pistas disponemos para sospechar la interferencia?

Errores en la interpretación de los resultados de la investigación de anticuerpos irregulares debidos a **reacciones *in vitro*** no mediadas por anticuerpos antieritrocitarios

Laboratorio de Inmunohematología. BST. Barcelona.

- Muestras remitidas a nuestro laboratorio por panaglutinación.
- 44 muestras: 22 gestantes, 20 pacientes y 2 donantes.
- En el 59% de las **gestantes** se trataba de la **primera gestación**.
- En el 86% de los **pacientes no existían transfusiones previas**.
- 31 mujeres y 13 hombres.
- Mediana de edad 32 años (15-88).
- Diagnósticos muy diversos en los pacientes.

Errores en la interpretación de los resultados de la investigación de anticuerpos irregulares debidos a **reacciones *in vitro*** no mediadas por anticuerpos antieritrocitarios

Laboratorio de Inmunohematología. BST. Barcelona.

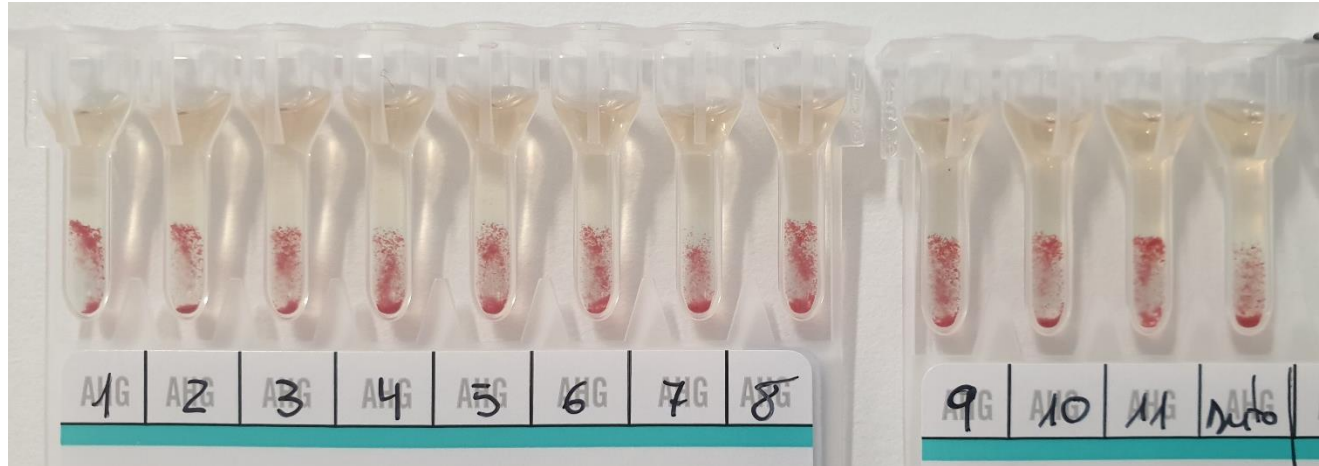
Técnicas

- Grupo ABO / Rh(D)
- EAI e IAI en fase enzimática y de antiglobulina
- Prueba directa de la antiglobulina (PDATG)
- IAI con Polietilén glicol (PEG)

La IAI se realizó con las tarjetas de 3 proveedores diferentes, y en tubo de hemólisis

Errores en la interpretación de los resultados de la investigación de anticuerpos irregulares debidos a **reacciones *in vitro*** no mediadas por anticuerpos antieritrocitarios

- En 41 (90%) de los 44 casos, la panaglutinina era reactiva en fase de ATG, y hasta en un 70% de las muestras también en fase enzimática, con autocontrol positivo y un Coombs directo negativo

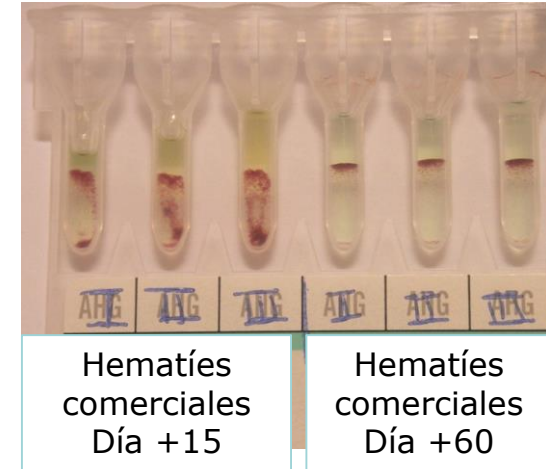


Autocontrol: Positivo
Coombs directo: Negativo

- En 28 casos la panaglutinina se detectaba en las 3 tarjetas (BioRad, Grifols, Ortho)
- En 13 casos, sólo se detectaba en un solo tipo de tarjeta

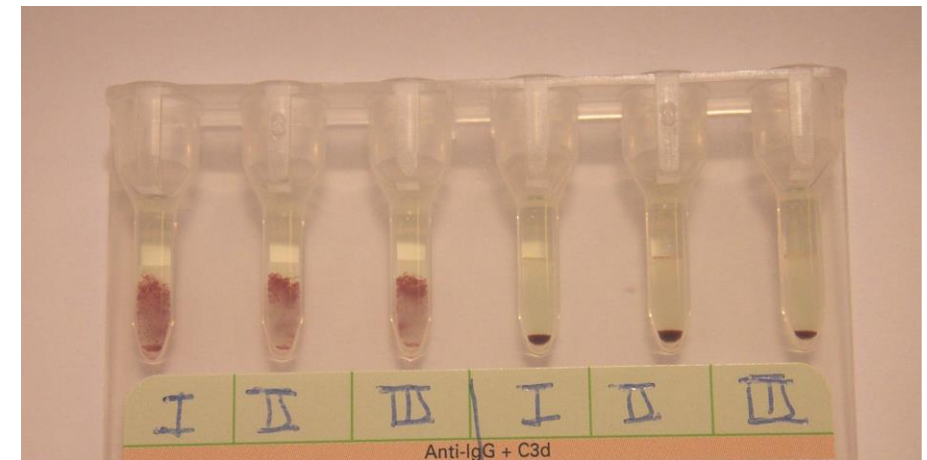
Errores en la interpretación de los resultados de la investigación de anticuerpos irregulares debidos a **reacciones *in vitro*** no mediadas por anticuerpos antieritrocitarios

- En 1 de los 41 casos, la reactividad era más intensa con hematíes senescentes.
- Al repetir el EAI en tubo de hemólisis con hematíes suspendidos en solución salina se obtuvo un resultado negativo en los 41 casos examinados.
- En 2 casos la reactividad reaparecía al añadir PEG como potenciador de la reacción Ag/Ac



Errores en la interpretación de los resultados de la investigación de anticuerpos irregulares debidos a **reacciones *in vitro*** no mediadas por anticuerpos antieritrocitarios

- En los 3 casos restantes 10%), el patrón de reacción era idéntico (panaglutinina más auto positivo más CD negativo) al emplear muestra de suero
- El resultado era totalmente negativo con muestra de plasma
- Los resultados eran los mismos, independientemente de que se empleara tarjeta o tubo de hemólisis.



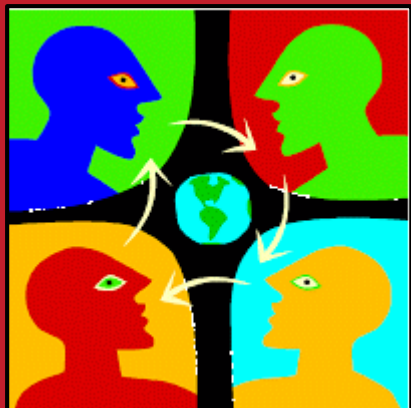
SUERO

PLASMA

Sólo se diagnostican las circunstancias que se sospechan..., y solo se sospechan las que se conocen

1. Panaglutinación + auto positivo + CD negativo: pensar en la posibilidad de Acs contra sustancias químicas preferentemente presentes en el medio de suspensión de los hematíes comerciales, en las soluciones de conservación y de lavado, y en los potenciadores.
2. ¡Importante!: A menudo se detectan en pacientes o gestantes sin antecedentes transfusionales, ni obstétricos.
3. Estos Acs carecen de importancia clínica, pero exigen un estudio cuidadoso para un correcto diagnóstico.





Moltes gràcies

¡Gracias por su atención!

Salut/

bancsang.net