

RECOMENDACIONES PARA LA PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DIRECTA

AUTOR

TM. Mg Cs. Andrés Aburto Almonacid.
Encargado de Inmunohematología. Sección Hematología e Inmunohematología. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.
Jefa Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Hugo Moscoso Espinoza.
Jefe Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Eduardo Retamales Castelletto.
Jefe Sección Hematología e Inmunohematología. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Diego Zapata Tapia.
Profesional de Inmunohematología. Sección Hematología e Inmunohematología. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

Comité de Expertos PEEC Inmunohematología

TM. Guillermo Herrera Calderón.

Dr. Federico Liendo Palma.

TM. Mg Cs. María Antonieta Núñez.

Dra. María Cristina Martínez Valenzuela.

TM. Ramón Schifferli Salazar.

TM. Carolina Villalobos Urbina.

RECOMENDACIONES PARA LA PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DIRECTA

RESUMEN

Este documento presenta las recomendaciones para el procedimiento de la Prueba de Antiglobulina Directa Poliespecífica y Monoespecíficas IgG y complemento C3d. Está dirigido a los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos. Su contenido ha sido consensuado con el Comité de Expertos del área de Inmunohematología del Instituto de Salud Pública de Chile y entrega directrices para la ejecución correcta de este examen con el fin de contribuir al aseguramiento de la calidad en las especialidades de Hematología y Medicina Transfusional.

ALCANCE

Estas recomendaciones aplican a los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos que realizan la prueba de antiglobulina directa poliespecífica (PAD) en primera instancia y a quienes, de acuerdo a su complejidad, realizan la determinación monoespecífica de las fracciones IgG y/o complemento C3d a donantes, pacientes y embarazadas según corresponda.

INTRODUCCIÓN

La Prueba de Antiglobulina Directa (PAD) es utilizada para detectar inmunoglobulinas IgG o fracciones del complemento C3d unidas a la membrana de los glóbulos rojos (GR). Una PAD positiva puede o no asociarse a hemólisis de tipo inmunológico. La PAD se emplea principalmente para la investigación de reacciones hemolíticas postransfusionales (RHT), enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (EH-FRN), anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI), aloinmunes y anemia hemolítica inducida por drogas.

La PAD inicialmente se debe realizar con suero antiglobulina humana (SAGH) poliespecífico capaz de detectar tanto IgG como C3d. Si la prueba poliespecífica es positiva, se debe investigar con sueros mono-específicos (anti-IgG y anti-C3d), lo que permite poner en evidencia el proceso inmunológico y colaborar en la determinación del diagnóstico del paciente.

Dependiendo de la técnica y los reactivos utilizados, la PAD puede detectar de 100 a 500 moléculas de IgG, y de 400 a 1100 moléculas de C3d por glóbulo rojo.

DEFINICIONES Y ABREVIACIONES

Prueba Antiglobulina Directa Poliespecífica: es la prueba que se ejecuta al hacer reaccionar los glóbulos rojos de una muestra de sangre total con el suero antiglobulina humano poliespecífico.

Prueba Antiglobulina Directa Monoespecífica: es la prueba que se ejecuta al hacer reaccionar los glóbulos rojos de una muestra de sangre total con sueros monoespecíficos anti-IgG y anti-C3d. Esta prueba se debe realizar siempre que la prueba poliespecífica esté positiva.

ABREVIACIONES

AABB: Asociación Americana de Bancos de Sangre.

AHAI: Anemia Hemolítica Autoinmune.

CAP: Colegio de Patólogos Americanos.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EHFRN: Enfermedad Hemolítica del Feto y del Recién Nacido.

PAD: Prueba antiglobulina directa.

PBS: Buffer fosfato salino.

SAGH: Suero Antiglobulina humana.

DESARROLLO

Metodología para la Prueba Antiglobulina Directa Poliespecífica:

a) Muestra

La muestra adecuada para realizar la PAD poliespecífica es sangre completa con anticoagulante EDTA, aunque también se pueden utilizar muestras de sangre venosa tomadas con citrato, heparina o a partir de bolsas de sangre con soluciones anticoagulantes-conservadoras o sangre de cordón. También es posible utilizar muestras de sangre recogidas en tubos sin anticoagulante. Las muestras para estudio deben ser procesadas inmediatamente o ser almacenadas a 4°C y las pruebas deben ser realizadas en el menor tiempo posible, no excediendo las 72 horas desde su obtención.

b) Reactivos

1- Suero antiglobulina humana poliespecífico: la presentación a emplear depende de la metodología:

Técnica en tubo o microplaca:

Suero poliespecífico que posee anticuerpos contra IgG humana y el componente C3d del complemento humano, también puede reaccionar con las moléculas de IgA e IgM. Seguir cuidadosamente las instrucciones de uso del fabricante.

Microcolumnas en tarjetas:

El suero reactivo presente en la microcolumna debe cumplir las mismas características mencionadas para la técnica en tubo o microplaca.

Independiente de la técnica utilizada, cada laboratorio debe elaborar procedimientos documentados para la verificación de los reactivos cuando se comienzan a utilizar y realizar el control de calidad de cada nuevo lote.

2- Reactivo control: PBS, solución salina o albúmina 6% que den reacciones negativas para validar la corrida analítica.

3- Suero fisiológico, PBS o diluyente recomendado por el fabricante para la técnica utilizada.

4- Células control Coombs: glóbulos rojos sensibilizados con moléculas IgG para validar los resultados negativos obtenidos con la metodología en tubo.

Los Anexos 1 y 2 detallan los reactivos recomendados y aprobados por la FDA útiles para la PAD poliespecífica y monoespecífica.

c) Técnicas

Pueden ser utilizadas técnicas manuales, semiautomatizadas y automatizadas; ya sea en tubo, microcolumna o microplaca.

d) Procedimientos

I PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DIRECTA POLIESPECÍFICA

Para lograr resultados confiables, seguros y de la calidad esperada, la técnica a emplear debe ser verificada en el laboratorio antes de su uso en rutina, se debe revisar el inserto del reactivo o técnica, lo cual debe incluir: fabricante, número de lote, fecha de producción y caducidad, fundamento de la técnica, origen del reactivo (humano, monoclonal, recombinante, u otro), condiciones de conservación y estabilidad, procedimiento para su uso, limitaciones, precauciones, valores de referencia.

Se deben seguir rigurosamente las indicaciones establecidas en el inserto y revisar nuevamente cada vez que se cambia un lote reactivo o procedimiento. Con los datos obtenidos con el presente documento de recomendaciones y/u otra referencia nacional o internacional, el laboratorio puede definir el Procedimiento Operativo Estándar de la técnica, describiendo al menos: el sistema de identificación de muestras, los protocolos de ejecución de técnicas, la verificación del método, el control de calidad interno, externo y el informe de resultados.

La recomendación para la técnica a utilizar es la siguiente:

1. Identificar la muestra con un código o número único.
2. Preparar en un tubo una suspensión de los glóbulos rojos a analizar utilizando suero fisiológico, PBS o diluyente recomendado por el fabricante. Esta suspensión debe ser preparada de acuerdo al inserto de la técnica a utilizar: Ej: Tubo: 2-5%, Gel: 1%, Microplaca: 1-3%. De acuerdo a la metodología a utilizar y a las especificaciones del fabricante se debe proceder al tratamiento de las muestras. En la metodología en

tubo, se debe lavar una gota de glóbulos rojos tomados de una suspensión (2-5%), mientras que en la metodología de aglutinación en columna no es necesario lavarlas, se deben centrifugar para concentrar los glóbulos rojos y preparar la suspensión recomendada por el fabricante para la técnica.

- Por cada muestra, se deben efectuar las siguientes determinaciones:

| Tubo | Suero o Plasma | Glóbulos Rojos | Objetivo |
|-----------|----------------|--|--|
| PAD | SAGH | Muestra en concentración adecuada. | Determinación de IgG o Complemento unidos a la membrana de GR. |
| Control + | SAGH | Glóbulos rojos sensibilizados con IgG o complemento. | Detectar falsos negativos. |
| Control - | SAGH | Glóbulos rojos no sensibilizados. | Detectar falsos positivos. |

Los controles positivos y negativos deben ejecutarse en cada corrida analítica.

- Mezclar y centrifugar de acuerdo al tiempo y velocidad establecidos por el fabricante de la centrífuga inmunohematológica para la visualización de la aglutinación.
- Observar en busca de aglutinación y hemólisis, de acuerdo a la técnica de lectura automatizada o manual que recomiende el fabricante. En caso de no existir, usar aquella técnica que permita una mayor sensibilidad del método.
- Registrar los resultados obtenidos de acuerdo a la siguiente tabla de intensidad de reacción:

| Intensidad de Reacción | Score o puntaje | Aglutinación Tubo/Microplaca | Aglutinación Gel |
|------------------------|-----------------|--|---|
| 4+ | 12 | Botón único. Fondo claro. Sin células libres. | Banda homogénea de aglutinados en la parte superior de la columna. |
| 3+ | 10 | Varios aglutinados de gran tamaño. Fondo claro. Sin células libres. | Banda superior de aglutinado y desplazamiento en la parte superior de la columna. |
| 2+ | 8 | Muchos aglutinados de mediano tamaño. Fondo claro. Sin células libres. | Aglutinados pequeños en la columna y a lo largo de la columna. |
| 1+ | 5 | Numerosos aglutinados pequeños. Fondo turbio por GR libres. | Algunos aglutinados pequeños en la columna. |
| +/- | 2 | Apenas la aglutinación es visible. Fondo turbio por GR libres. | Escasos aglutinados de pequeño tamaño en la columna. |
| 0 | 0 | Ausencia de aglutinación. | Banda de GR al fondo de la columna, resto de la columna sin aglutinados. |

Se debe respetar la relación SAGH/glóbulos rojos recomendada para cada técnica, la cual puede ser la recomendada por el proveedor o la estandarizada por el propio laboratorio. Ejemplo: Tubo (2 gotas de SAGH + 1 gota de GR), Aglutinación en columna (SAGH predispensado en tarjetas + 50 uL de GR), Microplaca (1 gota de SAGH + 1 gota de GR).

Interpretación

- Una reacción negativa indica la ausencia de anticuerpos IgG o componente de complemento C3d detectables en los glóbulos rojos.
- Una reacción positiva (+/- a 4+) indica que los glóbulos rojos de la muestra se encuentran sensibilizados con IgG, C3d, o ambos.
- Los resultados se deben validar sobre controles positivos y negativos correctos.

Informe de resultados

Si bien se utilizan diferentes términos para informar los resultados de la Prueba de Antiglobulina Directa, tales como: Test de Antiglobulina Directa (TAD), Test de Coombs Directo (TCD), la denominación recomendada es:

Prueba de Antiglobulina Directa Poliespecífica o PAD Poliespecífica

(el resultado se informa): Negativo o Positivo

II PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DIRECTA MONOESPECÍFICA

Inicialmente se debe realizar una PAD poliespecífica capaz de detectar tanto IgG como C3d. Si la prueba poliespecífica es positiva, se debe evaluar este resultado y su utilidad clínica. Se puede apoyar al clínico investigando con sueros monoespecíficos (anti-IgG y anti-C3d), lo que permite evidenciar antecedentes del proceso inmune y colaborar con el diagnóstico del paciente.

Se recomienda el siguiente procedimiento a utilizar:

1. Rotular las muestras a examinar. De acuerdo a la metodología a utilizar y a las especificaciones del fabricante se debe proceder al tratamiento de las muestras. En la metodología en tubo las muestras deben lavarse, mientras que en la metodología de aglutinación en columna no es necesario lavar las muestras, las cuales se deben centrifugar para concentrar los glóbulos rojos y preparar la suspensión recomendada por el fabricante para la técnica.
2. Preparar en un tubo una suspensión de los glóbulos rojos a analizar suero fisiológico, PBS o diluyente recomendado por el fabricante. Esta suspensión se debe preparar de acuerdo al inserto de la técnica a utilizar: Ejemplo: Tubo: 2-5%, Gel: 1%, Microplaca: 1-3%.
3. Para cada muestra a analizar, se deben efectuar las siguientes reacciones:

| Tubo | Suero o Plasma | Glóbulos Rojos | Objetivo |
|-----------|----------------|--|---|
| IgG | Suero anti-IgG | Muestra en concentración adecuada. | Determinación de GR sensibilizados "in vivo" con IgG. |
| C3d | Suero anti-C3d | Muestra en concentración adecuada. | Determinación de GR sensibilizados "in vivo" con Complemento. |
| Control + | SAGH | Glóbulos rojos sensibilizados con IgG o complemento. | Detectar falsos negativos. |
| Control - | SAGH | Glóbulos rojos no sensibilizados. | Detectar falsos positivos. |

Los controles positivos y negativos deben ejecutarse en cada corrida analítica.

- Mezclar y centrifugar de acuerdo al tiempo y velocidad establecidos por el fabricante de la centrífuga inmunohematológica para la visualización de la aglutinación.
- Observar en busca de aglutinación y hemólisis, de acuerdo a la técnica de lectura automatizada o manual que recomiende el fabricante. En caso de no existir, usar aquella técnica que permita una mayor sensibilidad del método.
- Registrar los resultados obtenidos de acuerdo a la tabla de intensidad de reacción de la parte poliespecífica.

Se debe respetar la relación SAGH/glóbulos rojos recomendada para cada técnica, la cual puede ser la del proveedor o la estandarizada por el propio laboratorio. Ej. Tubo (2 gotas de suero anti-IgG o C3d + 1 gota de GR), Aglutinación en columna (Suero anti-IgG o C3d predispensado en tarjetas + 50 uL de GR), Microplaca (1 gota de Suero anti-IgG o C3d + 1 gota de GR).

Interpretación

| Anti-IgG | Anti-C3d | Controles | Informe | Observación |
|----------|----------|-----------|---------------------------------------|--|
| + | 0 | OK | PAD Monoespecífico IgG Positivo | Los glóbulos rojos se encuentran sensibilizados con IgG. |
| 0 | + | OK | PAD Monoespecífico C3d Positivo | Los glóbulos rojos se encuentran sensibilizados con C3d. |
| + | + | OK | PAD Monoespecífico IgG y C3d Positivo | Los glóbulos rojos se encuentran sensibilizados con IgG y C3d. |

Informe de resultados

La denominación recomendada para el informe de las pruebas es la siguiente:

Prueba de Antiglobulina Directa Monoespecífica IgG o PAD Monoespecífica IgG

(el resultado se informa): Negativo o Positivo

Prueba de Antiglobulina Directa Monoespecífica C3d o PAD Monoespecífica C3d

(el resultado se informa): Negativo o Positivo

Interpretación clínica y de laboratorio

Los resultados obtenidos con los reactivos monoespecíficos pueden ayudar a interpretar un cuadro clínico:

- La AHAI se clasifica de acuerdo a la amplitud térmica del anticuerpo involucrado, es decir, aquel rango de temperatura en la cual el anticuerpo causa el efecto antigénico, esta puede ser de tipo caliente, frío y mixta. En la AHAI por anticuerpos calientes presentan en la mayoría de los casos glóbulos rojos recubiertos por IgG, si bien también pueden detectarse componentes de complemento C3d en aproximadamente un 24% de estos pacientes. Con menor frecuencia (alrededor del 7%) en los glóbulos rojos únicamente se observa complemento. En la enfermedad de aglutininas frías, el

resultado más habitual es que se detecte únicamente complemento recubriendo los glóbulos rojos, pero es posible detectar simultáneamente IgM, IgA o ambas. En la AHAI de tipo mixto suelen aparecer tanto IgG como C3d.

- La hemoglobinuria paroxística por frío suele mostrar inicialmente un recubrimiento de los glóbulos rojos por complemento. En caso que se laven con suero salino frío (4°C), además puede detectarse autoanticuerpo IgG.
- En la EHFRN los eritrocitos neonatales están recubiertos in vivo con anticuerpos IgG de origen materno. Por su parte, los estudios de detección e identificación de anticuerpos que se realizan en el plasma materno deben relacionarse con el hallazgo de los anticuerpos IgG adheridos a los GR del recién nacido. Se debe eluir los anticuerpos y determinar su especificidad.
- Es importante tener en cuenta que un resultado positivo de la PAD puede deberse a otros fenómenos, y que los resultados de esta prueba deben considerarse en paralelo con el cuadro clínico del paciente, sus antecedentes y otros datos de laboratorio.
- Un resultado positivo de la PAD no siempre indica una supervivencia disminuida de los glóbulos rojos, y un resultado negativo no descarta la posibilidad de un proceso hemolítico de origen inmunológico, ya que el anticuerpo causante puede tener una baja afinidad, o la inmunoglobulina unida a los eritrocitos puede estar por debajo del umbral de detección.
- Para identificar los autoanticuerpos IgG (detectados en PAD monoespecífica IgG), se debe efectuar técnicas de elución y evaluar el eluado con un panel de identificación.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se deben seguir los procedimientos de control de calidad recomendados por los fabricantes de reactivos y equipos. Cada laboratorio debe realizar control de calidad en las siguientes situaciones:

- a) Con cada serie de análisis:** los reactivos que se utilicen deben dar reacciones apropiadas e inequívocas, según la siguiente tabla:

| | Reacción Positiva | Reacción Negativa |
|------|---|--|
| SAGH | Glóbulos rojos sensibilizados con IgG y/o C3d | Glóbulos rojos no sensibilizados con IgG y/o C3d |

- b) Con cada nuevo lote de reactivos:** corresponde a la verificación para asegurar la conformidad con los criterios. Cualquier reactivo que no cumpla con las especificaciones requeridas para los test, no se debe utilizar.
- c) Con cada nueva técnica o tecnología:** además de probar los reactivos como se describen anteriormente, es conveniente realizar junto a este nuevo método, si es posible, en paralelo con el método que se estaba usando, de acuerdo al protocolo de verificación implementado en el laboratorio. Incluyendo al menos 10 muestra de glóbulos rojos PAD positivos, para evaluar reproducibilidad y concordancia de los resultados. Ese periodo de prueba también puede utilizarse como etapa de inducción y capacitación del personal que utilizará la nueva técnica o tecnología. En esta etapa es imprescindible la participación del proveedor para la entrega de información, asesoría y capacitación. Para las verificaciones se pueden utilizar protocolos descritos por la AABB, CLSI, entre otros. Esto deberá asegurar que el método es apto para su uso rutinario.

d) Inspección visual

- **Etiqueta** debe contener el nombre del producto, el número de lote (serie), la fecha de vencimiento, las condiciones de almacenamiento y el nombre del fabricante o su logo. Una vez abierto un reactivo se debe marcar la fecha de apertura e iniciales del responsable.
- **Inserto del producto** debe aportar los mismos detalles que los señalados en la etiqueta, pero informando el método recomendado para su uso, los controles de calidad a aplicar, los diluyentes recomendados que pueden ser necesarios, además de cualquier limitación o advertencias en el uso de ese reactivo. Debe incluir también detalles de la composición del reactivo, advertencias de bioseguridad y aportar detalles para su uso seguro.

Todos los reactivos no-celulares deben estar libres de precipitados, partículas o formación de gel.

e) Especificidad

Se deben obtener reacciones positivas con:

- Glóbulos rojos RhD positivos (preferiblemente R1r) sensibilizados con un anti-D débil (0,1 UI/mL o 20 nanogramos/mL).
- Glóbulos rojos recubiertos con C3d.

Se deben obtener reacciones negativas con:

- Los mismos glóbulos rojos, pero no sensibilizados con anti-D ni complemento.

f) Sensibilidad (Potencia)

Obtener el mismo título o más alto, sin prozona, que el obtenido con una "solución de Potencia mínima" o un SAHG con licencia al día (FDA o CE), usando glóbulos rojos RhD Positivos recubiertos con un anti-D de 0,1 UI/mL o 20 nanogramos/mL.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos del país que realizan esta determinación deben participar en algún Programa de Evaluación Externa de la Calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Roback JD, editor. AABB Technical Manual, 17th ed., Bethesda, Maryland, 2011.
- American Association of Blood Banks. AABB Standards for Blood Bank and Transfusion Services, 25th ed., Bethesda, Maryland, 2008.
- Ministerio de Salud de Chile. Orientaciones para Centros de Sangre y Unidades de Medicina Transfusional, MINSAL, 2007.
- Cortés Buelvas A, Muñiz-Díaz E, León de González G. Inmunohematología básica y aplicada, 1° Edición. Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional, 2014.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline-Second Edition, 2008.

ANEXO 1

Reactivos aprobados por la FDA para la prueba de antiglobulina directa.

| Nombre del Reactivo SAGH | Método | Clase y clones | |
|---|--|---------------------------|------------------------------|
| | | IgG | C3d |
| Albaclone-anti-human globulin, anti-C3d | Tubo | - | 3G8 (monoclonal) |
| Alba Bioscience-anti-human globulin, anti-IgG | Tubo | Conejo (policlonal) | - |
| Alba Bioscience-anti-human globulin, anti-IgG-C3d | Tubo | Conejo (policlonal) | 3G8 (monoclonal) |
| Immucor, anti-human globulin, anti-IgG | Tubo | 16H8 (monoclonal) | - |
| Immucor, anti-human globulin, anti-C3b, C3d | Tubo | - | GAMA004 (monoclonal) |
| Biotest, anti-human globulin, anti-IgG-C3d | Tubo | Conejo (policlonal) | BRIC 8 (monoclonal) |
| Biotest, anti-human globulin, anti-IgG | Tubo | Conejo (policlonal) | |
| Diagast, anti-human globulin, anti-IgG | Tubo | 18833, 18896 (monoclonal) | - |
| Diagast, anti-human globulin, anti-C3d | Tubo | - | 12011D10 (monoclonal) |
| Diagast, anti-human globulin, anti-IgG-C3d | Tubo | 18833, 18896 (monoclonal) | 12011D10 (monoclonal) |
| BioRad, IH-Card AHG Anti-IgG,-C3d | Aglutinación en columna Sistema IH | Conejo (policlonal) | 053A-714 (monoclonal) |
| BioRad, IH-Card AHG Anti-IgG | Aglutinación en columna Sistema IH | Conejo (policlonal) | - |
| Novaclone, anti-IgG, -C3d | Tubo | 5H4, 8D2-8 (monoclonal) | 86 5A2, 139 4B4 (monoclonal) |
| Novaclone, anti-IgG | Tubo | 5H4, 8D2-8 (monoclonal) | |
| Novaclone, anti-C3d | Tubo | | 86 5A2, 139 4B4 (monoclonal) |
| Solidscreen II anti-IgG | Tango | Conejo (policlonal) | - |
| Grifols | Aglutinación en columna Sistema DG Gel | Conejo (policlonal) | - |

ANEXO 2

Reactivos aprobados por la FDA para el control de calidad de la prueba de antiglobulina directa.

| Nombre del Reactivo Control | Método | Reconocimiento por SAGH |
|--|--------|-------------------------|
| Albocyte, IgG sensitized red blood cells | Tubo | IgG |
| Biotest, Coombscell-E | Tubo | IgG |
| Immucor, Checkcell | Tubo | IgG |
| Immucor, Checkcell (weak) | Tubo | IgG |
| Immucor, Complement control cells | Tubo | C3 |