

El laboratorio de inmunohematología: de la serología a la biología molecular



Pajares-Zamudio A

Immucor Inc, Lima, Perú

Email: apajares.contractor@immucor.com

INTRODUCCIÓN

Desde principios del siglo XX hasta la actualidad hemos sido testigos de la evolución del laboratorio de inmunohematología, teniendo actualmente la posibilidad de automatizar muchos de los procesos incluyendo el uso de técnicas más avanzadas de biología molecular. Las pruebas inmunohematológicas han pasado por tres grandes momentos en la historia: el primer gran momento sería el inicio con el descubrimiento del grupo sanguíneo ABO por Karl Landsteiner mediante la tradicional prueba de aglutinación directa, el segundo gran momento se da con la aplicación del suero de antiglobulina humana para la detección de anticuerpos y antígenos en los años 40' que abrió la puerta para el descubrimiento de muchos otros grupos sanguíneos y el tercer gran momento se manifiesta con el desarrollo de las técnicas de biología molecular con sus múltiples aplicaciones en inmunohematología en los años 90' que, por la exactitud de la información que brinda, ha permitido, entre otras cosas, ampliar a 36 el número de sistemas de grupo sanguíneo y establecer más de 200 variantes del antígeno D.

Técnicas Serológicas

Todas las técnicas serológicas en inmunohematología se basan en la reacción antígeno-anticuerpo cuyas características son la especificidad, reversibilidad, rapidez, espontaneidad; esto obedece a un conjunto de interacciones entre las moléculas en las que intervienen la complementariedad de encaje, la complementariedad de carga y el establecimiento de enlaces no covalentes como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos y fuerzas de Van der Waals. Estos enlaces están regulados por factores externos como la temperatura, el pH y la fuerza iónica del medio.

Por muchos años las técnicas serológicas empleadas en los laboratorios de inmunohematología han estado basadas en la reacción de aglutinación, sin embargo, existen algunas otras técnicas como la adherencia de eritrocitos en fase sólida que ofrecen sensibilidad mejorada para la detección de pequeñas concentraciones de anticuerpo en las muestras. Así, en la actualidad están disponibles múltiples plataformas de trabajo para la investigación de anticuerpos y antígenos eritrocitarios que van desde la aglutinación en lámina, tubo, microplaca, microcolumnas y métodos de fase sólida, siendo estas tres últimas fáciles de automatizar lo cual permite su uso a gran escala y ofrece mayor trazabilidad y seguridad en los procesos.

La aplicación de las técnicas convencionales es útil para procesar la mayoría de la rutina de los laboratorios de inmunohematología, sin embargo, hay una población de pacientes en los cuales es necesario aplicar técnicas especiales que permitan la resolución de los casos más complejos.

Las técnicas de neutralización, extracción, disociación, elución y adsorción son herramientas valiosas para la resolución de casos serológicamente complejos.

Las técnicas de elución y adsorción se basan en la modificación de los factores que determinan la reacción antígeno anticuerpo y la característica de reversibilidad de la misma. Estas técnicas son de gran utilidad en la investigación de casos complejos de inmunohematología, pues juegan un rol importante para identificar anticuerpos en muestras PAD+, detectar antígenos expresados débilmente, concentrar soluciones que contienen anticuerpos, identificar anticuerpos en muestras con múltiples anticuerpos, preparar células para autoadsorción, preparar células con PAD+ para fenotipificación.

Aun cuando existen diversas herramientas serológicas que ayudan a la resolución de casos complejos, en ocasiones estas resultan insuficientes para obtener los resultados esperados que se puedan traducir en obtener la sangre más segura para los pacientes evitando la generación de reacciones transfusionales hemolíticas y enfermedad hemolítica del feto y recién nacido. Cuando serológicamente no podemos encontrar compatibilidad aplicando la prueba cruzada mayor debemos recurrir a transfundir unidades de sangre con fenotipo compatible, es decir que no contenga los antígenos de mayor importancia clínica de los cuales el paciente carece y de esta forma minimizar el riesgo de que un anticuerpo no identificado en el paciente pueda producir una

reacción transfusional y en segundo lugar prevenir la aloinmunización del paciente con otros anticuerpos. En estos casos las pruebas de biología molecular son de gran utilidad.

Técnicas de Biología Molecular

El conocimiento del genoma humano nos ha permitido descubrir los polimorfismos de los genes que dan origen a los antígenos de grupo sanguíneo. La gran mayoría de los antígenos de grupo sanguíneo dependen de mutaciones puntuales conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs, estos SNPs pueden estar presentes en la región codificadora del gen, es decir, la que se traduce directamente para dar origen a la proteína, o en la región reguladora que se encarga de su expresión. Es por ello que es importante conocer los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los antígenos en los eritrocitos. Un ejemplo de esto es el origen del fenotipo Fy(a-b-) en población africana que codifica un alelo Fy-b silente debido a la mutación de la región promotora GATA-1 que regula la expresión del antígeno Duffy en la membrana del eritrocito más no en otros tejidos, es por ello que individuos de fenotipo Fy(a-b-) que tienen la mutación en la región GATA-1 pueden recibir sangre con antígeno Fy-b sin riesgo de aloinmunización.

Existen diversas técnicas para la genotipificación eritrocitaria, todas ellas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en elaborar múltiples copias de regiones específicas de ADN y demostrar la presencia o ausencia de los alelos mediante AS PCR, PCR-SSP, PCR-RFLP, PCR Real-Time y la tecnología de microarreglos. La tecnología de microarreglos permite detectar numerosos polimorfismos en un único ensayo y debido a su configuración permite la genotipificación a gran escala.

Las técnicas de inmunohematología molecular han abierto un nuevo horizonte en el laboratorio de inmunohematología. Gracias a la aplicación de las técnicas de inmunohematología molecular, hoy podemos saber que existen más de 200 variantes del antígeno D y al reconocer esas variantes se puede identificar aquellas personas que son capaces de generar una respuesta inmune frente al antígeno D lo cual es de mucha utilidad en la toma de decisiones obstétricas para la implementación de la profilaxis con anti-D. Otra aplicación importante en obstetricia es el estudio de ADN fetal desde la circulación materna con lo que podemos deducir el fenotipo del

feto para establecer los riesgos del embarazo y aplicar los protocolos profilácticos en la gestante sin necesidad de emplear métodos invasivos para obtener información del feto.

La genotipificación cobra valor sobre todo para la toma de decisiones transfusionales en aquellos pacientes que por su condición clínica y serológica no pueden ser fenotipados con las técnicas convencionales, aquellos pacientes PAD+ y PAI+ en los que no es posible encontrar unidades serológicamente compatibles ni tampoco es posible la fenotipificación debido a la interferencia del autoanticuerpo adsorbido en el eritrocito o aquellos pacientes crónicos que reciben múltiples transfusiones como los que padecen de talasemia, anemia drepanocítica o cualquier otra condición que necesite múltiples transfusiones y que presentan reacciones de doble población en el fenotipo debido a la transfusión reciente son candidatos a la aplicación de pruebas de inmunohematología molecular.

En el campo de donantes las técnicas de inmunohematología molecular son útiles para la tipificación sanguínea de donantes a gran escala con el fin de establecer la frecuencia de antígenos en la población y poder establecer un banco de datos de donantes para cubrir las necesidades de la población de pacientes más susceptibles a inmunización. El uso de la inmunohematología molecular permite establecer el fenotipo para los antígenos en los que usualmente no hay antisueros disponibles debido a su rareza, por lo tanto, es una herramienta útil en la generación de banco de datos de donantes con fenotipo raro.

Aunque el estudio del ADN en el laboratorio de inmunohematología es una realidad en muchos centros a nivel mundial, y sus aplicaciones son diversas, se debe tener cuidado al momento de la interpretación pues para ello se requiere de experiencia en la interpretación de la técnica utilizada, evaluar los datos serológicos y la historia clínica del paciente y conocimiento de los genes que codifican a los antígenos de grupo sanguíneo y sus variantes en la población estudiada. Es por ello que las técnicas de genotipificación no deben ser usadas de manera aislada si no como un complemento a las pruebas serológicas. Las herramientas serológicas han sido y seguirán siendo durante algún tiempo la primera línea de pruebas inmunohematológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Klein H, Anstee D. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th ed. Philadelphia:Wiley; 2014
2. Daniels G. Human Blood Group. 3rd ed. 2013
3. Castilho L, Pellegrino J, Reid M. Fundamentos de Imunohematologia. Florencia: Atheneu; . 2016
4. Casas J, Friedman DF, Jackson T, Vege S, Westhoff CM, Chou ST. Changing Practice: red blood cell typing by molecular methods for patients with sickle cell disease. Transfusion 2015;55:1388-93
5. Sapatnekar S, Fuigueroa PI. How do we use molecular red blood cell antigen typing to supplement pretransfusion testing?. Transfusion 2014;54:1452-8.

