



**Ministerio de Salud Pública
Instituto de Hematología e Inmunología
Ciudad de La Habana**

**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AUTOANTICUERPOS
ERITROCITARIOS EN LA ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE.**

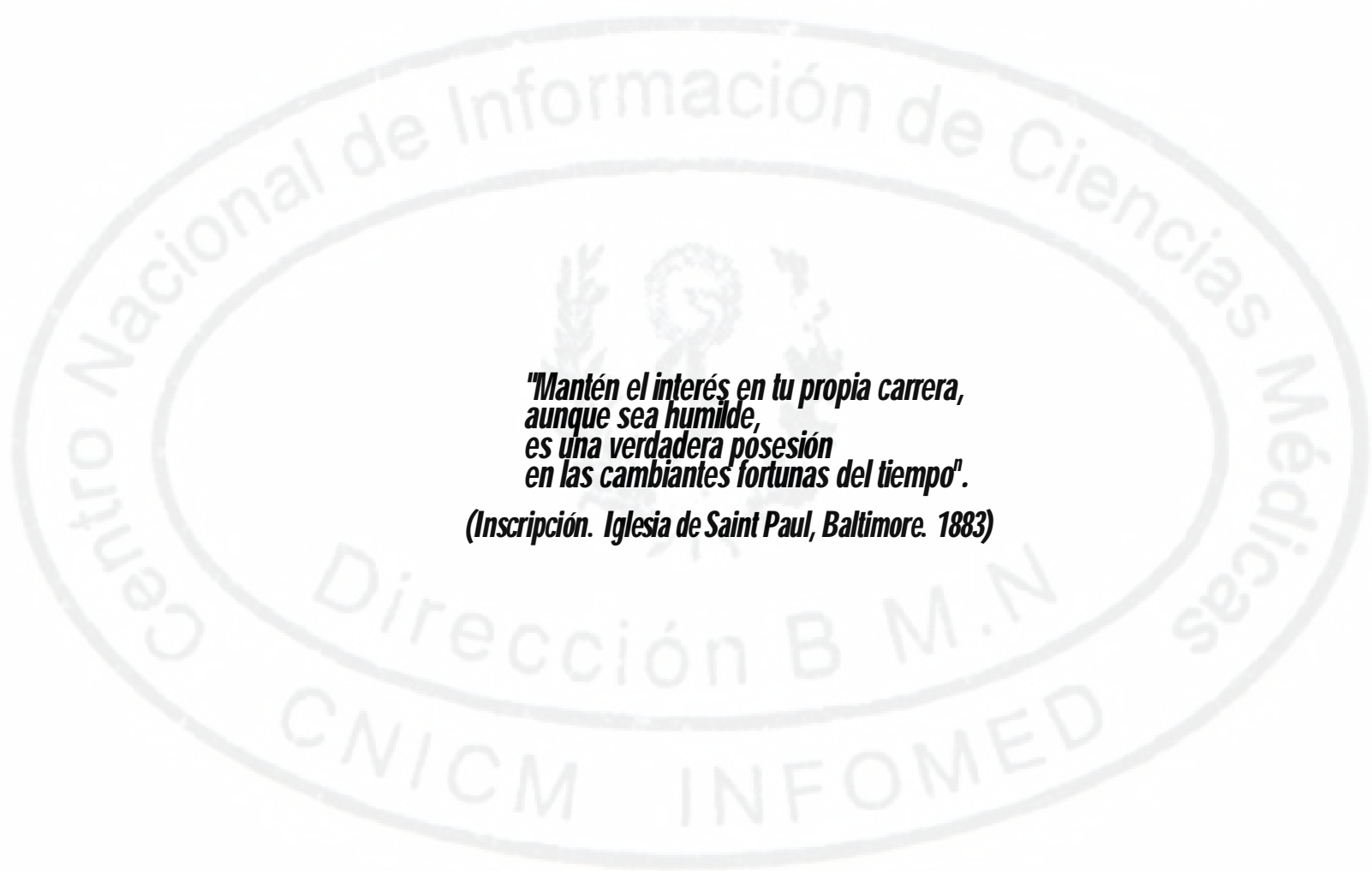
Autor: Lic. Antonio A. Bencomo Hernández

Tutor: Dr. C Médicas José Manuel Ballester Santovenia

**Trabajo para optar por el Grado Científico Doctor en
Ciencias de la Salud**

2003

**“Año de Gloriosos Aniversarios de Martí
y del Moncada”**



***"Mantén el interés en tu propia carrera,
aunque sea humilde,
es una verdadera posesión
en las cambiantes fortunas del tiempo".***

(Inscripción. Iglesia de Saint Paul, Baltimore. 1883)



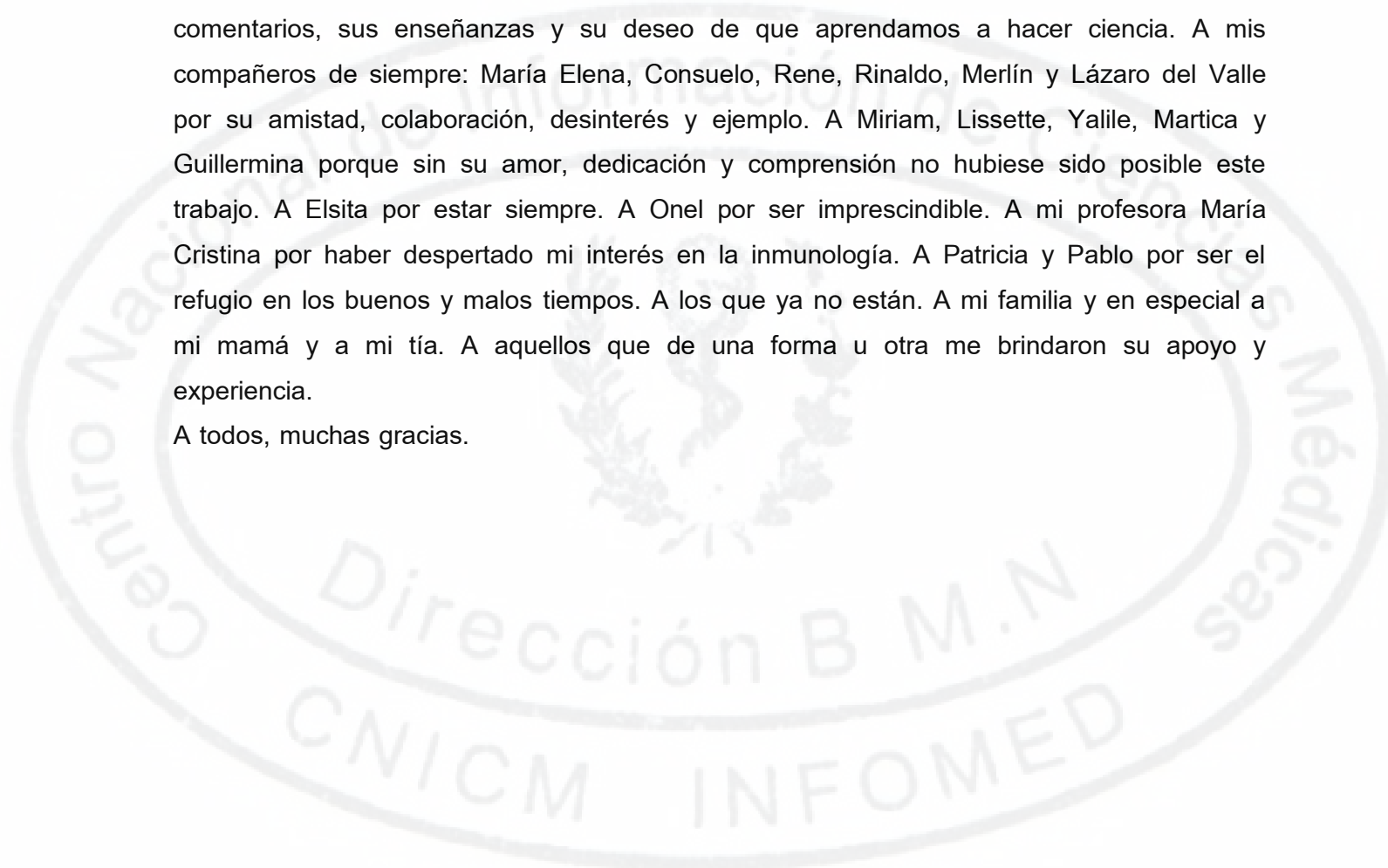
*A mi abuela,
Donde quiera que estés.*

AGRADECIMIENTOS

Esta no es la página más fácil de escribir, convergen la necesidad de ser breves con el deseo de ser justos. Confiamos que el que esté omitido, mereciendo estar presente, sabrá disculparnos y comprenderá que la gratitud se demuestra en acciones más que en estos renglones.

Agradezco al profesor José Manuel Ballester por su guía, apoyo y el optimismo siempre presente durante todos estos años. Al profesor Porfirio Hernández por sus acertados comentarios, sus enseñanzas y su deseo de que aprendamos a hacer ciencia. A mis compañeros de siempre: María Elena, Consuelo, Rene, Rinaldo, Merlín y Lázaro del Valle por su amistad, colaboración, desinterés y ejemplo. A Miriam, Lissette, Yalile, Martica y Guillermina porque sin su amor, dedicación y comprensión no hubiese sido posible este trabajo. A Elsita por estar siempre. A Onel por ser imprescindible. A mi profesora María Cristina por haber despertado mi interés en la inmunología. A Patricia y Pablo por ser el refugio en los buenos y malos tiempos. A los que ya no están. A mi familia y en especial a mi mamá y a mi tía. A aquellos que de una forma u otra me brindaron su apoyo y experiencia.

A todos, muchas gracias.



PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

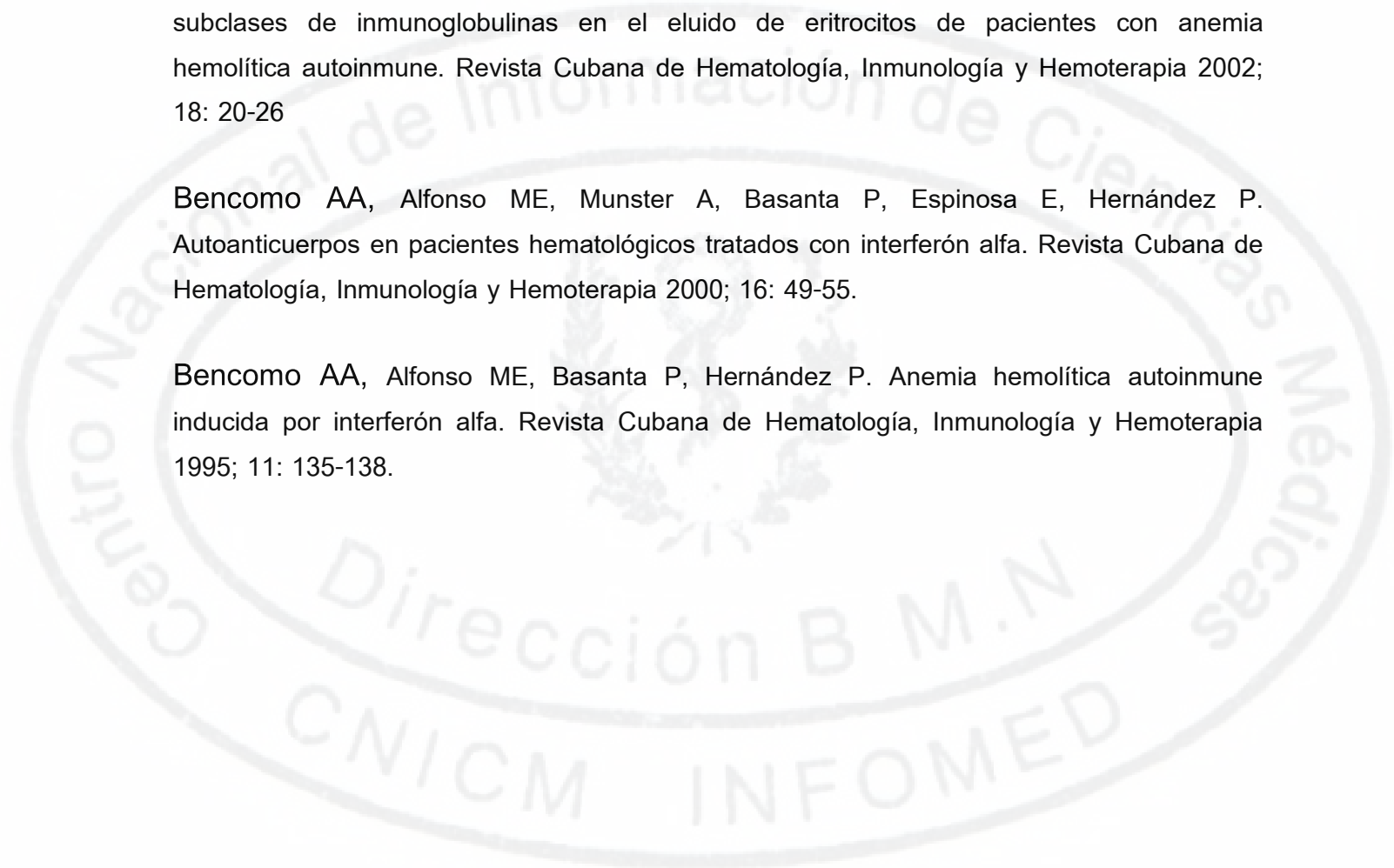
Bencomo AA, Díaz M, Alfonso Y, Valdés O, Alfonso ME. Quantitation of red cell-bound IgG, IgA, and IgM in patients with autoimmune hemolytic anemia and blood donors by enzyme-linked immunosorbent assay. *Immunoematology* 2003; 19: 47-53.

Bencomo AA, Jaime JC, Alfonso Y, Díaz M, Alfonso ME. Anemia hemolítica autoinmune. Estudio de 183 pacientes. *Revista Argentina de Transfusión* 2003; XXIX: 20-24.

Alfonso Y, Bencomo AA, Díaz M, Alfonso ME. Micrométodo para la detección de clases y subclases de inmunoglobulinas en el eluido de eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2002; 18: 20-26

Bencomo AA, Alfonso ME, Munster A, Basanta P, Espinosa E, Hernández P. Autoanticuerpos en pacientes hematológicos tratados con interferón alfa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2000; 16: 49-55.

Bencomo AA, Alfonso ME, Basanta P, Hernández P. Anemia hemolítica autoinmune inducida por interferón alfa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 1995; 11: 135-138.



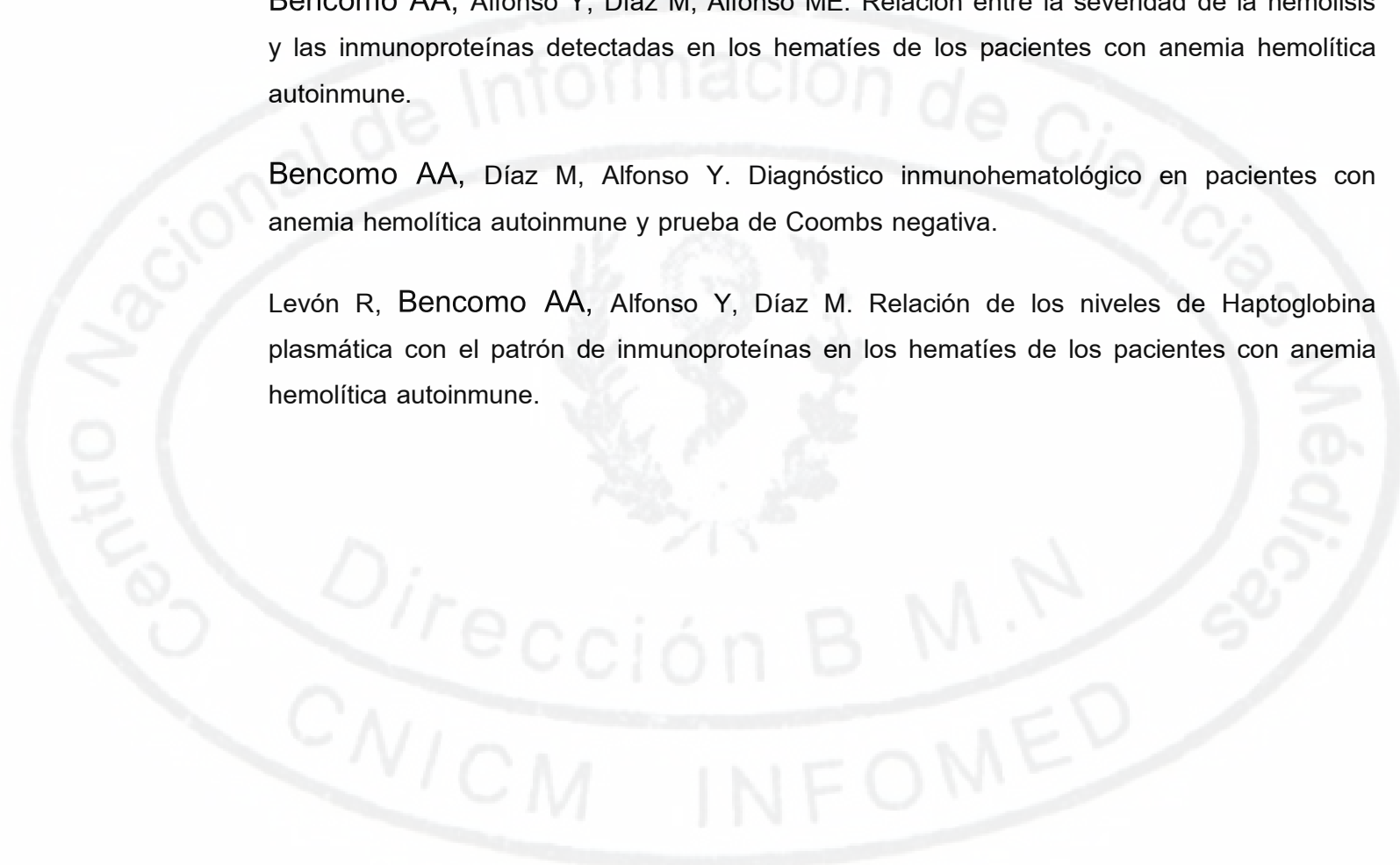
PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS

IV Congreso Nacional y VI Jomada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. VI Congreso Iberoamericano de Hematología. II Congreso de la División Interamericana de la Sociedad Internacional de Hematología, Ciudad de la Habana, Cuba 2001.

Bencomo AA, Alfonso Y, Díaz M, Alfonso ME. Relación entre la severidad de la hemólisis y las inmunoproteínas detectadas en los hematíes de los pacientes con anemia hemolítica autoinmune.

Bencomo AA, Díaz M, Alfonso Y. Diagnóstico inmunohematológico en pacientes con anemia hemolítica autoinmune y prueba de Coombs negativa.

Levón R, Bencomo AA, Alfonso Y, Díaz M. Relación de los niveles de Haptoglobina plasmática con el patrón de inmunoproteínas en los hematíes de los pacientes con anemia hemolítica autoinmune.



PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

Alfonso Y, Bencomo AA, Díaz M, Alfonso ME. Micrométodo para la detección de clases y subclases de inmunoglobulinas en el eluido de eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune.

Díaz M, Bencomo AA, Quintero W, Alfonso Y. Cuantificación de IgA asociada a los hematíes de individuos normales y de pacientes con anemia hemolítica autoinmune.

Valdés O, Bencomo AA, Díaz M, Alfonso Y. Cuantificación de IgM asociada a los hematíes de individuos normales y de pacientes con anemia hemolítica autoinmune.



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Introducción.....	2
1.2 Hipótesis de Trabajo.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.4 Importancia científica.....	5
1.5 Importancia práctica.....	5
CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Anemias hemolíticas Autoinmunes (AHAI).....	6
2.1.1 Clasificación.....	6
2.1.2 Etiología.....	8
2.1.3 Epidemiología.....	11
2.2 Anemia hemolítica autoinmune de tipo caliente.....	11
2.2.1 Fisiopatología.....	12
2.2.2 Autoanticuerpos de la clase IgG.....	12
2.2.3 Autoanticuerpos de la clase IgA.....	14
2.2.4 Autoanticuerpos de la clase IgM.....	14
2.2.5 Papel del CD47 en la hemólisis autoinmune.....	15
2.2.6 Papel fisiológico de las inmunoglobulinas asociadas a los hematíes.....	15
2.3 Diagnóstico inmunohematológico.....	16
2.3.1 La prueba de antiglobulina (Coombs).....	16
2.3.2 Evaluación de una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva.....	17
2.3.3 Especificidad de los autoanticuerpos en la AHAI.....	18
2.3.4 AHAI con PAD negativa.....	19
2.3.5 PAD positiva en individuos normales.....	19
2.4 Detección de autoanticuerpos en la AHAI.....	20
2.4.1 Prueba de consumo de antiglobulina.....	20
2.4.2 PAD con autoanalizador.....	20
2.4.3 Radioinmunoanálisis (RIA).....	21

2.4.4 Citofluorometria de flujo	21
2.4.5 Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	21
2.5 Características generales de los ensayos Inmunoenzimáticos	22
2.5.1 Parámetros de validación de los ensayos inmunoenzimáticos	27
2.6 AHAI inducida por drogas	34
2.7 AHAI por anticuerpos fríos	35
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Diagnóstico de AHAI	37
3.2 Pruebas inmunohematológicas	37
3.3 Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de IgG, IgA e IgM asociadas a los hematíes	38
3.4 Comparación entre la PAD, la técnica de microplacas y el ELISA en la detección de autoanticuerpos en los hematíes de los pacientes con AHAI	44
3.5 Cuantificación de autoanticuerpos en los hematíes de pacientes con AHAI y prueba de Coombs negativa	46
3.6 Relación entre la hemólisis y la presencia y cuantificación de inmunoglobulinas en los hematíes de los pacientes con AHAI	47
3.7 Autoanticuerpos eritrocitarios en pacientes hematológicos tratados con interferón alfa	49
3.8 Anemia hemolítica autoinmune inducida por el interferón alfa	50
3.9 Bioética	50
CAPITULO IV. RESULTADOS	51
CAPITULO V. DISCUSIÓN.....	88
CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	108
CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXO.....	123
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	124

Resumen

Se desarrolló un ensayo inmunoenzimático (ELISA) tipo "sandwich" de doble anticuerpo para la cuantificación de IgG, IgA e IgM en el eluato de los hematíes, obtenido a partir del método del éter. El ensayo mostró un coeficiente de determinación mayor de 0.99 determinado a través de un modelo de regresión lineal en un intervalo de concentraciones de 0.0025 a 0.07 fig/ml de IgG e IgM y de 0.0025 a 0.06 ng/ml de IgA. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayos fueron inferiores al 10% y los valores de recuperación se encontraron entre el 91 y 106 %. Los estudios de paralelismo mostraron que la dilución de la muestra no afectó la determinación de la concentración de Inmunoglobulinas al hacer la corrección multiplicando por el factor de dilución. El límite de cuantificación del ensayo fue de 1 molécula de IgG e IgA y de 0.2 moléculas de IgM por hematíe. Se evaluó el método en 62 pacientes con anemia hemolítica autoinmune (AHAI) y en 200 donantes de sangre. En los donantes de sangre se encontraron valores de media y desviación estándar de 58 ± 35 moléculas de IgG, de 16 ± 11 de IgA y de 3 ± 2 de IgM por hematíe. En los pacientes con AHA I en correspondencia con los isotipos de los autoanticuerpos identificados se obtuvo una media de 3435 moléculas de IgG, de 157 de IgA y de 69 de IgM por hematíe. Se comparó la prueba de antiglobulina directa (PAD), la técnica de microplacas (Mp) y el ELISA en la detección de autoanticuerpos eritrocitarios en 117 pacientes con AHA I. El ELISA fue más sensible que la PAD para la detección de autoanticuerpos IgG y que la PAD y la Mp para la detección de autoanticuerpos IgA. Este ensayo reveló la presencia de IgA en los hematíes en el 35% de los casos en comparación con el 14% encontrado en las técnicas de aglutinación. El ELISA a su vez detectó inmunoglobulinas de dos o más isotipos en los hematíes del 40% de los pacientes mientras que la PAD y la Mp lo hicieron en el 14 y el 19%, respectivamente. Se demostró la utilidad del inmunoensayo para el diagnóstico mmunohematológico de la AHA I con prueba de Coombs negativa al detectar la presencia de los autoanticuerpos en el eluato de los hematíes de 18 pacientes con AHA I con PAD negativa. En el estudio de 135 pacientes con AHA I se encontró que los factores relacionados con una mayor severidad de la hemolisis fueron: la presencia en los hematíes de IgM coexistiendo con IgG, IgA o con ambas, la presencia de IgG e IgA y el número de moléculas de IgG por hematíe. No se observó relación entre la presencia en los eritrocitos de IgG3, IgG1 o de dos o más subclases y la hemolisis. En el estudio de pacientes con hemopatías malignas tratados con interferón alfa se detectaron autoanticuerpos eritrocitarios en el 80% de los casos a través de la PAD y con el empleo de un ELISA directo para la detección de IgG en los hematíes. Se encontró además que la AHA I inducida por este fármaco es infrecuente.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Introducción.

Las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) se caracterizan por la destrucción, mediada por autoanticuerpos, de los eritrocitos del paciente. Los autoanticuerpos causantes del proceso hemolítico se clasifican en calientes y fríos en dependencia de la temperatura óptima de su reacción "in *vitro*" (1).

La AHAI más frecuente se debe a la presencia de autoanticuerpos reactivos a 37°C, que constituye el 70% del total de casos. Debido a esto, la mayoría de los investigadores emplean el término AHAI para referirse a la ocasionada por los autoanticuerpos calientes y es la nomenclatura adoptada en este trabajo. Esta enfermedad se asocia frecuentemente a las hemopatías malignas, a otras enfermedades autoinmunes y al tratamiento con determinados fármacos (2).

Dada la importancia de las inmunoglobulinas (Igs) en la hemólisis inmune, su detección es un proceder muy empleado en inmunohematología. La prueba de antiglobulina directa (PAD) o prueba de Coombs ha sido usada comúnmente para la detección de los autoanticuerpos eritrocitarios. Sin embargo, la PAD tiene limitaciones, ya que la interpretación de los resultados depende de la experiencia y la pericia del individuo que la realiza. Estas particularidades impiden apreciar diferencias cuantitativas en la intensidad de la aglutinación que pudieran tener una repercusión en el pronóstico y evolución del proceso hemolítico (3). Además, existe una cantidad límite de anticuerpos en los hematíes por debajo de la cual la prueba resulta negativa, aunque a estas bajas concentraciones los anticuerpos son capaces de producir hemólisis (4). Una PAD negativa, por lo tanto, no descarta la presencia de autoanticuerpos (3).

Existen otros ensayos de mayor sensibilidad que las técnicas de aglutinación que se han aplicado para la detección de los autoanticuerpos eritrocitarios. Dentro de ellos se incluyen el empleo de antiglobulina marcada con radioisótopo y la citometría de flujo. Estos métodos requieren de un equipamiento costoso y en algunos casos de la utilización de compuestos radioactivos de manipulación riesgosa (4,5).

Los ensayos inmunoenzimáticos son sensibles y rápidos que pueden aplicarse en la investigación de las inmunoproteínas asociadas a los eritrocitos y en la detección de anticuerpos no revelados por las técnicas convencionales. Además de las ventajas ya expuestas, su bajo costo, la no utilización de material radioactivo y la posibilidad de cuantificar autoanticuerpos unidos a estas células, lo señalan como un método a elegir para estos

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

estudios(6).

Tradicionalmente, las investigaciones en la AHAI profundizan en el significado clínico de los autoanticuerpos de la clase IgG y sus subclases y soslayan el papel de los isotipos IgA e IgM. Esto se debe fundamentalmente a que con los métodos tradicionales de investigación, la presencia de IgA e IgM en los eritrocitos se demuestra solamente en un reducido número de casos (7). Por otra parte, los autoanticuerpos de la clase IgA no han sido estudiados con profundidad debido a que el receptor para el fragmento Fc (RFccx) de esta inmunoglobulina (Ig) en los macrófagos fue identificado recientemente (8).

El valor de la cuantificación de autoanticuerpos en relación con el grado de hemólisis es un aspecto controvertido. No obstante, se reconoce que la destrucción inmune es proporcional a la concentración de inmunoglobulinas en los hematíes (9,10, 11). Sin embargo, la mayoría de las evidencias se han obtenido en el estudio de la hemólisis inducida por autoanticuerpos estimulados por la transfusión y los embarazos donde la especificidad de estos anticuerpos es un factor fundamental (10). Los resultados de estas investigaciones no son extrapolables ya que los autoanticuerpos generalmente no reconocen a un antígeno de un grupo sanguíneo en particular (12, 13).

La presencia de autoanticuerpos eritrocitarios asociados al tratamiento con fármacos está reconocida desde la descripción de la hemólisis inmune en pacientes tratados con alfa metildopa. Las características serológicas de la AHAI inducida por drogas no difieren de la AHAI común y se advierte por el antecedente de la administración del medicamento y por la remisión del proceso hemolítico después de discontinuado el tratamiento (2).

En la actualidad, se han acumulado evidencias sobre la autoinmunidad ocasionada por el tratamiento con interferón alfa (IFN α), pero son escasos los estudios sobre la frecuencia de los autoanticuerpos eritrocitarios que induce, y en su investigación no se han aplicado ensayos más sensibles que la prueba de antiglobulina (14).

Teniendo en cuenta que la caracterización de los autoanticuerpos eritrocitarios es fundamental para el estudio de la AHAI y que los métodos tradicionales de diagnóstico inmunohematológico no permiten la identificación ni la cuantificación de todos los isotipos de las Igs involucradas en la hemólisis inmune se plantea la siguiente hipótesis.

1.2 Hipótesis de Trabajo

"La detección y cuantificación de autoanticuerpos eritrocitarios a través de un ensayo inmunoenzimático pueden aplicarse al diagnóstico inmunohematológico y en la predicción de la severidad de la hemólisis en los pacientes con AHAI"

1.3 Objetivos

General

Determinar el valor de la detección y la cuantificación de autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgA e IgM en el eluato de los eritrocitos a través de un ensayo inmunoenzimático tipo “sandwich” de doble anticuerpo para el diagnóstico y pronóstico de la severidad de la hemólisis en los pacientes con AHAI.

Específicos

1. Desarrollar y validar un ensayo inmunoenzimático tipo “sandwich” de doble anticuerpo (ELISA) para la cuantificación de IgG, IgA e IgM asociadas a los hematíes de pacientes con AHAI y de donantes de sangre.
2. Estimar las diferencias del ELISA con la prueba de antiglobulina directa (Coombs) y la técnica de microplacas, para la detección de autoanticuerpos en los hematíes.
3. Evaluar la utilidad de la determinación de la concentración de los autoanticuerpos asociados a los hematíes para el diagnóstico inmunohematológico de la AHAI con prueba de Coombs negativa.
4. Identificar si existe asociación entre la intensidad de la hemólisis con la presencia y concentración de autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgM e IgA así como con la presencia de autoanticuerpos de las diferentes subclases de IgG en los hematíes de los pacientes con AHAI.
5. Determinar la frecuencia de autoanticuerpos eritrocitarios inducidos por el tratamiento con interferón alfa.

1.4 Importancia científica

Un aspecto novedoso de este trabajo es que constituye la primera comunicación en la literatura de la cuantificación. en una única muestra, de todos los isotipos de los anticuerpos involucrados en la hemolisis autoinmune y de las Igs asociadas a los hematíes de individuos sanos y su aplicación en el estudio de la AHAI a través de:

- La detección y cuantificación de autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgA e IgM en los hematíes.
- El diagnóstico inmunohematológico de la AHAI con prueba de Coombs negativa.
- La relación entre la presencia y concentración de los autoanticuerpos con la severidad de la hemolisis autoinmune.

Por otra parte este trabajo permitió identificar por primera vez el límite de detección de los autoanticuerpos IgA e IgM en la prueba de antiglobulina (Coombs)

1.5 Importancia práctica

Los resultados de esta investigación permitieron confirmar el diagnóstico de AHAI en los casos con resultados dudosos y negativos en las pruebas tradicionales de diagnóstico inmunohematológico y establecer un seguimiento adecuado de los pacientes con AHAI.

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anemias hemolíticas autoinmunes

Las AHAI se originan por la producción de anticuerpos contra los antígenos eritrocitarios del propio individuo que provocan una disminución de la supervivencia de los eritrocitos a través de su destrucción mediada por los autoanticuerpos. La AHAI fue la primera enfermedad autoinmune donde se demostró el papel de los autoanticuerpos como causantes de la hemólisis (15).

La incapacidad para detectar un factor sérico que explicara la hemólisis llevó a la introducción del término anemia hemolítica adquirida para diferenciarla de la anemia hemolítica hereditaria. Dacie y Mollison, en 1943 (16), demostraron que los eritrocitos transfundidos a pacientes con anemia hemolítica hereditaria tenían una supervivencia normal en contraste con la disminución drástica de la vida media que se originaba cuando se transfundían a pacientes con anemia hemolítica adquirida. Estas observaciones indicaron que estos pacientes poseían un factor extrínseco, presumiblemente anticuerpos, responsables de la destrucción de los hematíes transfundidos. Posteriormente, se introdujo el término autoinmune para clasificar a aquellos pacientes con anemia hemolítica adquirida en los que se demuestra la presencia de anticuerpos contra sus propios hematíes (17).

La prueba de antiglobulina desarrollada por Coombs et al, en 1945 (18), para la detección de anticuerpos anti-Rh fue el procedimiento que demostró los autoanticuerpos en la superficie de los eritrocitos de los pacientes con anemia hemolítica adquirida. A partir de este descubrimiento se estableció su papel en la fisiopatología de la enfermedad (10). Posteriormente se observó que los hematíes de estos pacientes estaban sensibilizados con gammaglobulinas, componentes del complemento o con ambas inmunoproteínas (19-20).

En la actualidad, el suero antiglobulina humana o suero de Coombs posee anticuerpos fundamentalmente contra la inmunoglobulina G y el fragmento C3d del complemento (21).

2.1.1 Clasificación

Las anemias hemolíticas autoinmunes se clasifican en calientes y frías de acuerdo con la temperatura óptima de reacción de los autoanticuerpos. Las producidas por autoanticuerpos fríos se dividen a su vez en: síndrome de aglutininas frías (SAF) y hemoglobinuria paroxística a frigore (HPF). Un reducido número de casos se clasifica como AHAI mixta debido a la coexistencia de ambos autoanticuerpos. La identificación de cada una de ellas se basa en el

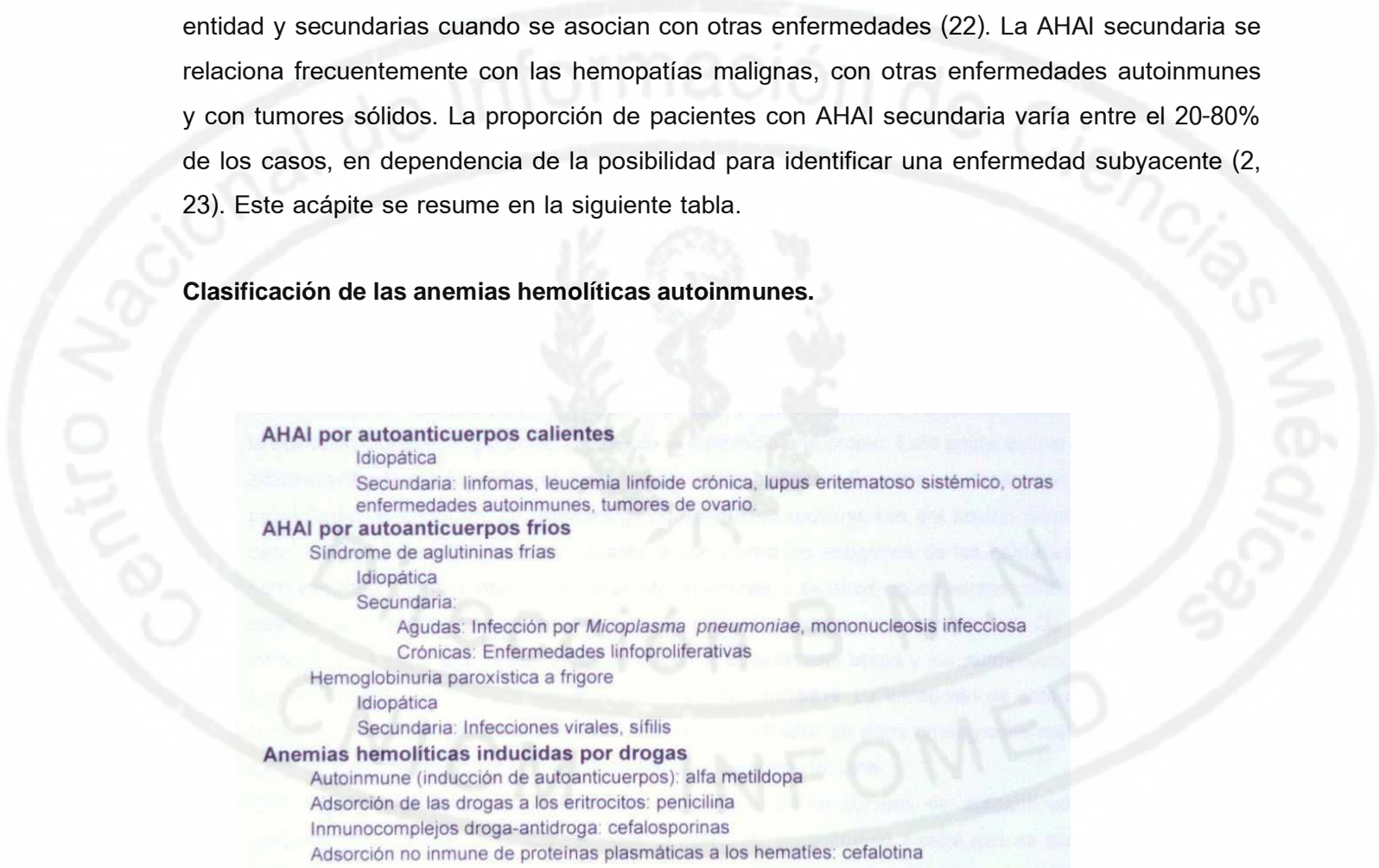
Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

isotipo de los autoanticuerpos involucrados, su especificidad para los antígenos de los grupos sanguíneos y el procedimiento técnico que fue capaz de identificarlos.

El tercer grupo lo constituyen las anemias hemolíticas inducidas por drogas que comprenden diferentes mecanismos de acción de los fármacos. Dentro de este grupo se reconoce como autoinmune aquella en la que se demuestra autoanticuerpos eritrocitarios en el curso del tratamiento con el medicamento

También pueden clasificarse en idiopáticas o primarias cuando aparecen sin relación con otra entidad y secundarias cuando se asocian con otras enfermedades (22). La AHAI secundaria se relaciona frecuentemente con las hemopatías malignas, con otras enfermedades autoinmunes y con tumores sólidos. La proporción de pacientes con AHAI secundaria varía entre el 20-80% de los casos, en dependencia de la posibilidad para identificar una enfermedad subyacente (2, 23). Este acápite se resume en la siguiente tabla.

Clasificación de las anemias hemolíticas autoinmunes.



AHAI por autoanticuerpos calientes
Idiopática
Secundaria: linfomas, leucemia linfocítica crónica, lupus eritematoso sistémico, otras enfermedades autoinmunes, tumores de ovario.
AHAI por autoanticuerpos fríos
Síndrome de aglutininas frías
Idiopática
Secundaria:
Agudas: Infección por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , mononucleosis infecciosa
Crónicas: Enfermedades linfoproliferativas
Hemoglobinuria paroxística a frigore
Idiopática
Secundaria: Infecciones virales, sífilis
Anemias hemolíticas inducidas por drogas
Autoinmune (inducción de autoanticuerpos): alfa metildopa
Adsorción de las drogas a los eritrocitos: penicilina
Inmunocomplejos droga-antidroga: cefalosporinas
Adsorción no inmune de proteínas plasmáticas a los hematíes: cefalotina

2.1.2 Etiología

La etiología de esta enfermedad es desconocida. Muchos casos de AHAI idiopática aparecen espontáneamente sin relación con un haplotipo HLA específico o con otros factores genéticos (22). Sin embargo, existen evidencias que sugieren la pérdida de la autotolerancia a los antígenos de grupos sanguíneos y que se resumen a continuación. Ehrlich y Morgenroth en 1900 (24) introdujeron el concepto **"horror autotoxicus"** para calificar el mecanismo que previene los efectos adversos de la inmunización contra los propios eritrocitos a través de la producción de una autotóxina. Al mismo tiempo, Landsteiner (25) con el descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO, estableció las reglas sobre la compatibilidad de los mismos. Estas se basan en que los individuos no producen anticuerpos contra sus propios antígenos ABO y presentan anticuerpos naturales contra los antígenos que no poseen. Donath y Landsteiner posteriormente describieron, por primera vez, la presencia de un autoanticuerpo relacionado con una enfermedad autoinmune: la hemolisina bifásica responsable de la HPF (15).

A partir de la hipótesis de la selección natural se derivó la teoría de la selección clonal de la formación de anticuerpos (26). El concepto de selección clonal incorporado dentro de la teoría de la selección clonal emergió como la base de la tolerancia a lo propio. Esta teoría estuvo muy influenciada por experimentos en bovinos gemelos bicigóticos. En ellos se observaron dos poblaciones de eritrocitos de diferente grupo sanguíneo provenientes del bovino gemelo y cada uno fue incapaz de producir autoanticuerpos contra los antígenos de los hematíes del hermano (26). La interpretación de estas observaciones y de otros experimentos conllevó a plantear que durante la vida fetal el sistema inmune adquiere la autotolerancia. De esta forma, los linfocitos autorreactivos son eliminados durante esta etapa y los autoanticuerpos son producidos por la expresión de clones mutantes olvidados. La excepción de esta regla serían los linfocitos que reconocen a antígenos secuestrados en sitios privilegiados como el esperma y el cerebro, que no tienen contacto con el sistema inmune.

Este dogma fue retado cuando se logró la producción en conejos de autoanticuerpos mediante la inmunización con tiroglobulina autóloga. El experimento mostró que es posible producir autoanticuerpos contra antígenos no secuestrados y que la autoinmunización puede conducir a una enfermedad. A partir de este estudio se ha logrado inducir en animales la producción de autoanticuerpos contra extractos de diferentes tejidos, que resultan en una gran variedad de enfermedades autoinmunes (27).

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Posteriormente, se reconoció la existencia de autoanticuerpos naturales, los linfocitos B autorreactivos y que los autoanticuerpos pueden inducirse por estimulación de las células B (28).

Dos hipótesis se han formulado para explicar la producción de autoanticuerpos en las enfermedades autoinmunes. La primera de ellas plantea que los autoanticuerpos son el resultado de una estimulación policlonal incontrolada de las células B autorreactivas que provoca un aumento en la concentración de los autoanticuerpos naturales. La segunda expresa que en determinadas condiciones los autoantígenos provocan una mutación somática de las células B que inducen la producción de autoanticuerpos patológicos (29). Las evidencias acumuladas apoyan esta última y sugieren que los autoanticuerpos patológicos son el resultado de un proceso selectivo inducido por el antígeno sobre una población de células B distintas a las que originan los autoanticuerpos naturales(29).

Dighiero y Rose. (30) plantearon que la reactividad de los autoanticuerpos naturales no está restringida a los autoantígenos sino que reaccionan también contra antígenos de otras especies, especialmente contra aquellos que se han conservado durante la evolución. En contraste, no se demuestran autoanticuerpos contra autoantígenos que consideran "críticos como los de los grupos sanguíneos A y B. Esto explicaría el hecho de que los autoanticuerpos eritrocitarios en la AHAI están dirigidos contra antígenos públicos de los grupos sanguíneos, como son algunos determinantes no polimórficos del sistema Rh, y no contra los antígenos de los grupos A y B. A partir de estas observaciones concluyeron que los linfocitos B que reconocen a determinantes polimórficos "críticos" (Ej.: A y B) son eliminados a través de un proceso de selección negativa muy estricta, mientras que los que reconocen a los determinantes públicos probablemente no sean eliminados.

Sin embargo, Spalter et al, (31) demostraron la presencia de auto anti-A y auto anti-B de los isotipos IgM e IgG en las fracciones IgG e IgM del suero humano, independientemente del grupo sanguíneo ABO del individuo. La reacción de los autoanticuerpos IgG naturales con los antígenos A y B es inhibida por un factor presente en el suero humano, presumiblemente la IgM autóloga. Estos resultados sugieren que la tolerancia para los antígenos ABO depende de un control periférico más que de una eliminación o anergia a nivel de las células B y T.

Relacionado con los hallazgos anteriores se demostró que la capacidad de los autoanticuerpos IgG para producir la aglutinación de los eritrocitos está regulada por la IgM del suero. De esta forma, alteraciones en las interacciones idiotípicas entre la IgM autóloga y los autoanticuerpos IgG podrían desencadenar la hemólisis autoinmune y la AHAI (32). Estos

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

resultados se apoyan en una comunicación previa en la que se informó que en los eritrocitos de individuos normales con prueba de antiglobulina directa positiva sin manifestaciones clínicas de anemia se identifican dos tipos de anticuerpos: uno de ellos son los autoanticuerpos eritrocitarios y los otros son anticuerpos IgG anti-idiotipos y probablemente también de la clase IgM dirigidos contra los primeros (33). A partir de estas observaciones se ha recomendado como una probable terapéutica en la AHAI la administración de gammaglobulina IgM purificada a partir de mezclas de plasmas de individuos normales (34). Otros autores aportan evidencias a favor del desbalance de citocinas como un factor que contribuye a la patogénesis de la hemólisis autoinmune (35-36). Las citocinas regulan el crecimiento, diferenciación y las funciones de los linfocitos T y B y pueden agruparse de acuerdo al subtipo de células T CD4+ que las produce. Las dos poblaciones de células T CD4+ más claramente diferenciables se denominan Th1 y Th2 *(del inglés T helper)*. Las células Th1 secretan interleucina 2 (IL-2), IFN γ y factor de necrosis tumoral beta, que favorecen la inmunidad mediada por células, la activación de los macrófagos y la producción de anticuerpos opsonizantes y fijadores del complemento. Las células Th2 sintetizan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que activan la respuesta humoral a través de la producción de anticuerpos y favorecen la diferenciación de los mastocitos y eosinófilos. Las IL-4, IL-6 e IL-10 promueven la producción de anticuerpos por las células B, por lo que se ha sugerido que las células Th2 podrían estar involucradas en la producción de autoanticuerpos en la AHAI (35). Por otra parte, se ha demostrado que la IL-12, una potente citocina proinflamatoria secretada por los fagocitos y las células presentadoras de antígenos, aumenta la producción de IFN γ y estimula la inmunidad celular pero suprime la respuesta humoral. En los pacientes con AHAI se ha observado un incremento de IL-4 e IL-10 y una disminución de los niveles de IFN γ y de IL-12, lo que muestra una disminución de las citocinas dependientes de Th1 y una estimulación de las Th2. Una terapia recomendada sería la neutralización de la IL-10 para evitar la activación de la vía Th2 y el tratamiento con IL-12 para bloquear la activación de las células B (37). Otros estudios contradicen estos hallazgos basándose en que las citocinas Th1 induce la producción de anticuerpos opsonizantes que median la hemólisis inmune de los hematíes y la activación de células B autorreactivas productoras de autoanticuerpos eritrocitarios (38, 39)

Un factor genético podría estar involucrado en la susceptibilidad de los pacientes para producir autoanticuerpos eritrocitarios inducidos por el tratamiento con alfa metildopa. Aproximadamente en el 30% de los pacientes caucásicos que reciben tratamiento con este fármaco se identifican autoanticuerpos contra sus hematíes de especificidad similar a los

encontrados en la AIHA idiopática. Sin embargo, la frecuencia entre los africanos, hindúes y chinos es sólo de un 4% (40).

El mimetismo molecular y la activación policlonal de las células B son otros mecanismos que se han invocado para explicar la aparición del síndrome de aglutininas frías después de la infección por *Mycoplasma pneumoniae* o con virus de Epstein-Barr (40). Aproximadamente en el 45% de los pacientes con infección por *Mycoplasma pneumoniae* se identifican crioaglutininas de especificidad anti-I. Esta relación fue dilucidada al comprobarse que los anti-I se producen en respuesta a antígenos del microorganismo y que muestran reacción cruzada con el antígeno I de los hematíes humanos (22).

A pesar de los avances logrados en la comprensión de los factores que favorecen la inducción de autoinmunidad, se necesita continuar las investigaciones con vistas a dilucidar completamente los mecanismos que provocan la disregulación inmune en la AHAI (29).

2.1.3 Epidemiología

La AHAI es relativamente poco frecuente. La incidencia oscila entre 1 por 80 000 y 2.6 por 100 000 habitantes (41-43). La asociada a anticuerpos calientes comprende el 70.3% de los casos, el SAF se informa en el 15.6%, la HPF en el 1.7% y las inducidas por drogas en el 12.4% del total de pacientes (2). Otros estudios encuentran que el tipo caliente se identifica solo en el 41%, mientras que el SAF se observa en el 32%, la HPF en el 2% y las inducidas por drogas en el 18% de los casos (43). Se detecta además en el 6 al 8% de los pacientes una combinación de autoanticuerpos calientes y fríos que se ha clasificado como AHAI mixta (44). La AHAI se ha encontrado en todos los grupos raciales y afecta a todas las edades y como en otras enfermedades autoinmunes es más frecuente en el sexo femenino que en el masculino (2).

2.2 AHAI de tipo caliente

Por ser esta AHAI el objeto de estudio de este trabajo se abordará con mayor profundidad. Los aspectos más importantes de la AHAI ocasionada por autoanticuerpos fríos se resumen al final de este capítulo.

La AHAI de tipo caliente es la más frecuente y aparece generalmente después de los 40 años. La incidencia aumenta con la edad debido a su relación con las enfermedades linfoproliferativas (40).

Está bien documentada la asociación entre AHAI y la leucemia linfocítica crónica de tipo B (LLC-B) (45). En el 4 al 7% de estos pacientes se detectan autoanticuerpos eritrocitarios (44-

45). Sin embargo, después de la estimulación "*in vitro*" de los linfocitos con mitógenos se demuestra en el 29% de los pacientes (46). Otras enfermedades que con mayor frecuencia se asocian con AHAI son: el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la colitis ulcerativa (41). La AHAI ocasionalmente puede concomitar con la presencia de autoanticuerpos anti-plaquetarios lo cual es conocido como síndrome de Evans-Fisher.

2.2.1 Fisiopatología

La unión de los autoanticuerpos a los hematíes provoca la destrucción de los mismos por un mecanismo intravascular o extravascular.

La hemólisis intravascular dependiente de la activación del complemento por la vía clásica es infrecuente. Los hematíes son relativamente resistentes a la lisis por complemento debido a que presentan en su membrana proteínas reguladoras que bloquean la activación de este sistema (47-49). La hemólisis intravascular se desencadena cuando hay presencia de hemolisinas que generalmente provocan una anemia severa y gran mortalidad si no es suprimido el proceso hemolítico (50). La destrucción de eritrocitos en la AHAI es predominantemente extravascular. Los eritrocitos recubiertos con Igs o con el fragmento C3b del complemento son secuestrados por los macrófagos del bazo y del hígado a través de los receptores presentes en los fagocitos para el fragmento Fc de las Igs y para el C3b (12). La interacción entre los eritrocitos y los macrófagos provoca la fagocitosis parcial o total de estos o su destrucción por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *del inglés antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (23).

2.2.2 Autoanticuerpos de la clase IgG

Los autoanticuerpos IgG son los más frecuentes y se han demostrado hasta en el 90% de los pacientes con AHAI (2). Los hematíes recubiertos con IgG son predominantemente destruidos en el bazo. En los que se detecta además el fragmento C3b del complemento son secuestrados en el hígado y el bazo (2). Los macrófagos del hígado con receptores para el fragmento C3b no son eficientes en la destrucción de hematíes con C3b unido sin inmunoglobulinas. Estos macrófagos inmovilizan los eritrocitos a través de los receptores para C3b y posteriormente deben atrapar las células por el receptor para el fragmento Fc de la IgG (RFc_γ) (10).

Es conocido que los RFc_γ pueden ocuparse tanto por la IgG libre en el plasma como la unida a una célula. En el bazo la concentración de eritrocitos es alta y la de plasma es reducida, o sea, que existen pequeñas concentraciones de IgG libre. Por tanto, la destrucción de células

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

con IgG unida es eficiente. En contraste, el hematocrito en el hígado es menor y existen mayores concentraciones de IgG libre en plasma que pueden ocupar los RFcy. Los receptores para el C3b no son bloqueados por el C3 no activado del plasma, por lo que pueden reconocer los eritrocitos con IgG y C3b unido a través de los receptores para este último (13).

Tres RFcy se han descrito y clasificado como RFcy I, RFcy II y RFcy III (50). El RFcy I se encuentra en los fagocitos mononucleares y muestra afinidad por las subclases IgG1 e IgG3. baja afinidad por la IgG4 y no interactúa con la IgG2. EL RFcy II se demuestra en los monocitos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos B y plaquetas con afinidad para las IgG1 e IgG3 y baja afinidad para las IgG2 e IgG4. Por último, el RFcy III que reacciona únicamente con las IgG1 e IgG3, se encuentra en neutrófilos, eosinófilos y macrófagos (51).

La IgG3, debido a su gran afinidad por los RFcy, es más eficiente que la IgG1 en su interacción con los macrófagos, por lo que su presencia se ha relacionado con una hemólisis severa (52).

Otra evidencia que apoya estas observaciones es que para que ocurra la fagocitosis *"in vitro"* de los eritrocitos por los monocitos se requieren al menos 500 moléculas de IgG1 por hematíe pero únicamente 100 moléculas de IgG3 (53). Sin embargo, algunos autores han demostrado autoanticuerpos de la subclase IgG3 en pacientes sin evidencias clínicas de hemólisis (9).

La hemólisis autoinmune mediada por autoanticuerpos de la subclase IgG2 es muy poco frecuente (54). La destrucción de los hematíes por estos anticuerpos depende en parte del alelo del gen **RFcyIIa** presente en los fagocitos mononucleares del paciente. Uno de los alelos codifica para un RFcy II de gran afinidad por la IgG2 y probablemente sea capaz de provocar la destrucción de los hematíes sensibilizados (55). Otro factor que influye es la expresión en los hematíes de los antígenos que reconocen estos anticuerpos ya que la molécula de IgG2 es poco flexible y la interacción con el RFcy depende de su accesibilidad en la membrana (56). Al parecer, los anticuerpos de la subclase IgG4 no median la destrucción inmune de los hematíes (9).

El papel del complemento en la hemólisis es complejo (23). La hemólisis asociada al C3b tiene una relación cuantitativa, ya que la anemia hemolítica se manifiesta cuando existen más de 100 moléculas de C3b por eritrocito. El C3b unido a los eritrocitos es rápidamente degradado a C3b inactivado (C3bi) por la acción de los factores H e I que son inactivadores naturales del C3 presentes en el plasma. La acción posterior del factor I provoca la transformación del C3bi en C3dg, que es el fragmento que se detecta en los eritrocitos en la prueba de antiglobulina. Los eritrocitos recubiertos con C3dg tienen probablemente una

sobrevida normal, ya que no se han demostrado receptores para el mismo en los macrófagos (57).

2.2.3 Autoanticuerpos de la clase IgA

En un inicio los autoanticuerpos eritrocitarios de la clase IgA no recibieron atención, debido a que no se habían demostrado receptores en los macrófagos para esta Ig (9).

En la actualidad se han identificado los receptores para la región Fe de la IgA (RFca) sobre una variedad de tipos celulares y constituyen un eslabón crucial entre las ramas humoral y celular del sistema inmune (58). El RFca (CD89) es una glicoproteína que une la IgA1 y la IgA2 con similar afinidad. Este receptor se expresa como una proteína de 50-70 kDa en los neutrófilos y monocitos/macrófagos, o como una glicoproteína de 70 a 100 kDa en los eosinófilos. El RFca participa en diversos procesos que incluyen fagocitosis, generación de superóxido, ADCC y liberación de mediadores inflamatorios (59).

EL mecanismo de destrucción de los eritrocitos por esta Ig es similar al de la IgG, lo que explica las similitudes clínicas entre las AHAI mediadas por estos autoanticuerpos (60). Los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos IgA son destruidos por las células del sistema mononuclear fagocítico. La hemólisis se produce tanto por eritrofagocitosis como por ADCC (61). Estas funciones de los monocitos y macrófagos son mediadas por el RFca presente en estas células (62).

La capacidad de los anticuerpos eritrocitarios IgA de activar complemento es un tema polémico. Un estudio demostró que no fueron capaces de producir la lisis de los hematíes al añadirles suero fresco como fuente de complemento. En estas células, tampoco se detectaron cantidades subclínicas de C3 (63). Sin embargo, existen otros estudios que sugieren que los autoanticuerpos IgA puede mediar activación de complemento con la aparición de una hemólisis intravascular severa (64). Esta activación del complemento se puede producir por la formación de agregados (65) o por alteraciones en la integridad estructural del anticuerpo provocada por enzimas bacterianas (66).

2.2.4 Autoanticuerpos de la clase IgM

Los autoanticuerpos eritrocitarios de la clase IgM pueden clasificarse serológicamente en hemolisinas y aglutininas que median la hemólisis o la aglutinación directa de los eritrocitos resuspendidos en solución salina (12). En la mayoría de los casos se comportan como anticuerpos incompletos ya que no provocan la aglutinación directa de los eritrocitos y se detectan solamente en la técnica de antiglobulina o con métodos de mayor sensibilidad (11).

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La destrucción de los eritrocitos en estos casos es fundamentalmente extravascular a través de la deposición del C3b en los eritrocitos mediada por la IgM y la interacción del C3b y el C3bi con los receptores presentes para estos fragmentos del complemento en los macrófagos (67). No obstante, se han descrito casos de AHAI por autoanticuerpos IgM en los que no se ha detectado la participación del complemento en la hemólisis (68-69). El mecanismo de destrucción en estos casos es desconocido ya que no se han demostrado receptores para esta Ig en los macrófagos (23).

Las hemolisinas IgM provocan la lisis *"in vitro"* de los hematíes del paciente. Se manifiesta *'in vivo'* como una hemólisis intravascular grave como resultado de una activación de la vía clásica del complemento que puede causar la muerte del paciente (54,70). Afortunadamente las hemolisinas son muy infrecuentes (12).

Los autoanticuerpos IgM se encuentran generalmente asociados a otros isotipos de Igs, fundamentalmente, a la IgG (3).

2.2.5 Papel del CD47 en la hemólisis autoinmune

Se ha demostrado recientemente que la fagocitosis de los hematíes opsonizados es inhibida por la interacción entre el CD47 de los hematíes con el receptor de la proteína alfa reguladora de señal (SIRPa, *del inglés signal regulatory protein alpha*) presente en los macrófagos (71). Esta interacción es un mecanismo de reconocimiento de lo propio a través de la presencia o ausencia de CD47 en los eritrocitos (72). Se especula que podrían aplicarse nuevas terapias a partir de este descubrimiento.

2.2.6 Papel fisiológico de las Inmunoglobulinas asociadas a los hematíes

La mayoría de los individuos sanos presentan Inmunoglobulinas asociadas a la membrana de los hematíes en cantidades insuficientes para que provoquen un resultado positivo en las pruebas convencionales de detección de anticuerpos eritrocitarios. Sin embargo, pueden detectarse pequeñas concentraciones de éstas en los hematíes con el empleo de técnicas de mayor sensibilidad (73). La presencia de inmunoglobulinas en los hematíes se debe a su adsorción no específica (citofílicas) o a la unión de autoanticuerpos fisiológicos responsables de la senescencia eritrocitaria. Al respecto, existen evidencias de que la concentración de Igs en los hematíes es proporcional a su concentración en el plasma lo que se ha interpretado como inmunoproteínas eritrocitofílicas, al parecer, debido a interacciones electrostáticas entre la cargas positivas de estas y la carga negativa de los hematíes (2).

Por otra parte, en el proceso de senescencia eritrocitaria se exponen neoantígenos o antígenos de senescencia eritrocitaria (ASE) para los cuáles existen autoanticuerpos que median la destrucción inmune de los hematíes envejecidos (74). El ASE se ha localizado en la banda 3 eritrocitaria y se genera a través de la desnaturalización de la hemoglobina en hemicrones y su unión posterior a la banda 3 (75). De esta forma los hematíes senescentes presentan una concentración mayor de IgG, IgA e IgM que la subpoblación de hematíes jóvenes (76).

2.3 Diagnóstico inmunohematológico

En la AHAI se observa un incremento en el número de reticulocitos, basófilos y eritrocitos policromatófilos. Ocasionalmente puede haber reticulopenia, debido a una inadecuada respuesta medular o a la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos eritrocitarios presentes en los reticulocitos. La haptoglobina plasmática puede estar ausente o disminuida y la bilirrubina no conjugada está incrementada. Otros indicadores de destrucción eritrocitaria pueden ser: la presencia de esferocitos, eritrocitos fragmentados, niveles elevados de lactato deshidrogenasa (LDH) y de hemoglobinuria. El estudio de la médula ósea muestra hiperplasia eritroide con un aumento de los depósitos de hierro determinados por la coloración del azul de prusia. El conteo de plaquetas generalmente es normal, aunque en algunos pacientes se encuentra trombocitopenia y neutropenia (10)

2.3.1 La prueba de antiglobulina (Coombs)

El diagnóstico de laboratorio se realiza fundamentalmente con la prueba de antiglobulina directa o prueba de Coombs directa. Este ensayo se realiza con suero antiglobulina humana (suero de Coombs) que se obtiene en animales inmunizados con las globulinas humanas. Este reactivo contiene anticuerpos contra IgG y el fragmento C3d del complemento humano y puede o no presentar anticuerpo anti IgM y anti IgA (suero de Coombs poliespecífico) (10). Una prueba de Coombs directa positiva significa la presencia de anticuerpos, complemento (C3) o ambos unidos a los hematíes **"in vivo"**, pero no es exclusivo de las AHAI, ya que puede también ser causado por la ocurrencia **"in vivo"** de los siguientes fenómenos (3):

- La presencia de aloanticuerpos en el receptor de sangre transfundido recientemente, que reaccionan con los antígenos eritrocitarios del donante.
- Anticuerpos presentes en los derivados plasmáticos o productos de fraccionamiento que reaccionan con los antígenos de los eritrocitos del receptor (Ej anti A, anti B, anti AB).
- Aloanticuerpos maternos que atraviesan la placenta y se unen a los hematíes fetales.

- Anticuerpos contra ciertas drogas como la penicilina, que se unen a la membrana de los eritrocitos.
- Modificaciones de las membranas eritrocitarias como resultado de la terapia con drogas del grupo de las cefalosporinas que provocan la adsorción no inmune de proteínas a los eritrocitos, que incluyen las inmunoglobulinas y el complemento.
- La presencia de inmunocomplejos droga-antidroga en respuesta a la administración de fármacos como la quinidina y fenacetina, por citar algunas; que causan la unión de componentes del complemento a los eritrocitos.
- Anticuerpos heterófilos anti-eritrocitos humanos presentes en la globulina anti-linfocítica de origen equino.
- Unión de inmunoglobulinas a los eritrocitos de los pacientes con hipergammaglobulinemias. Este fenómeno también se observa en pacientes tratados con altas dosis de gammaglobulina endovenosa.
- Anticuerpos eritrocitarios producidos por linfocitos alogénicos presentes en los órganos transplantados

2.3.2 Evaluación de una prueba de antiglobulina directa positiva

Las consideraciones clínicas son definitorias para evaluar la importancia de una PAD positiva. El diálogo con el clínico es importante antes de realizar cualquier prueba serológica. Para una correcta interpretación de la prueba se requiere del conocimiento del diagnóstico clínico del paciente, historia reciente de transfusiones o de tratamiento con drogas y en qué condiciones el paciente comenzó con el cuadro de anemia hemolítica adquirida. El resultado de las pruebas de laboratorio no es diagnóstico; su significación sólo puede tenerse en cuenta en relación con las condiciones clínicas del paciente y los demás exámenes de laboratorio, como son: hematocrito, bilirrubina, haptoglobina y conteo de reticulocitos (77).

En un paciente anémico con PAD positiva con signos y síntomas de hemólisis es apropiado determinar si la hemólisis es de tipo inmune. Posteriormente es necesario identificar el tipo de inmunoproteína unida a los hematíes para lo cual son necesarios los reactivos antiglobulínicos mono-específicos anti IgG y anti C3. Con el empleo de estos reactivos pueden obtenerse tres patrones principales de reacción: la presencia de IgG, IgG y C3 o de C3 únicamente. La IgG se observa en el 20 al 90% de los casos, la presencia de IgG y C3 en el 24 al 63% y el C3 como única inmunoproteína en el 7 al 14% de los pacientes (13)

Al obtenerse cualquiera de los patrones es necesario realizar un eluato de los hematíes del paciente para aislar los anticuerpos unidos a estas células y caracterizarlos. El eluato

obtenido debe enfrentarse a hematíes de grupo O pertenecientes a un panel de eritrocitos para la identificación de anticuerpos. El estudio debe realizarse a 37°C en la prueba de antiglobulina indirecta (PAI) o con hematíes tratados con enzimas proteolíticas que aumentan la sensibilidad de detección de los anticuerpos. Un resultado positivo demuestra la presencia de autoanticuerpos unidos a los hematíes del paciente (3).

2.3.3 Especificidad de los autoanticuerpos en la AHAI

En la gran mayoría de los casos los autoanticuerpos no muestran especificidad y reaccionan con todas las muestras de eritrocitos que conforman el panel. En un número reducido de casos los anticuerpos poseen especificidad y se confirma la naturaleza autoinmune del mismo al demostrar la presencia del antígeno específico en los eritrocitos del paciente o que estos adsorben nuevamente los anticuerpos del eluato (13).

La determinación de la especificidad de los autoanticuerpos es muy compleja (40). La clasificación más simple es la que la divide en dos tipos:

tipo I: Autoanticuerpos calientes que reaccionan únicamente con los eritrocitos senescentes o gerocitos del paciente.

tipo II: Autoanticuerpos calientes que reaccionan igualmente con los reticulocitos que con los eritrocitos senescentes.

Los autoanticuerpos de tipo I generalmente muestran especificidades para los antígenos del sistema Rh. no así los anticuerpos de tipo II, que en la mayoría de los casos no es posible determinar su especificidad.

En un reducido número de casos los autoanticuerpos muestran especificidades simples para antígenos del sistema Rh (Ej. anti-e, anti-c). En otros, las especificidades reveladas pueden ser confundidas con la presencia de aloanticuerpos y en realidad son autoanticuerpos que imitan a aloanticuerpos (78).

De otros autoanticuerpos sólo puede determinarse que son específicos para el complejo Rh al no reaccionar con eritrocitos Rh nulos o parcialmente deleccionados. La reacción de los autoanticuerpos con eritrocitos Rh nulos o parcialmente deleccionados sugiere especificidades no relacionadas con el sistema Rh (2). Dentro de las especificidades demostradas para otros sistemas de grupos sanguíneos se encuentran los siguientes antígenos: A, En^a, Ge, IT, Jk^a, K, Kp^b, Js^b, Lan, LW, N, Sc1, U, Wr^b Xg^a (13). Otros autores plantean que el reconocimiento por parte de los autoanticuerpos de algunos componentes del sistema Rh puede ser un seudofenómeno y que estos autoanticuerpos pueden no estar

dirigidos contra estos antígenos sino que la especificidad verdadera puede estar en el antígeno de senescencia eritrocitaria (75).

En la AHAI en pacientes con lupus eritematoso sistémico asociado con un síndrome anti-fosfolípido en el eluato de los hematíes se identifican anticuerpos anti-cardiolipina (79).

2.3.4 AHAI con prueba de antiglobulina directa negativa

La gran mayoría de los pacientes con AHAI presenta una PAD positiva, pero una PAD negativa no excluye la enfermedad. Una de las explicaciones de este fenómeno es que para que una PAD sea positiva se requieren de 200 a 500 moléculas de IgG por hematíe (80). En otros casos la negatividad de la PAD se debe a la presencia de autoanticuerpos de baja afinidad que se separan de los hematíes en los lavados previos a la realización de la prueba (81).

Durante mucho tiempo el diagnóstico de AHAI con PAD negativa se realizaba por exclusión. Actualmente se cuenta con una serie de procedimientos, que si bien no son todo lo eficientes que se desea, pueden establecer un diagnóstico en alrededor de un 40 % de los casos.

Los métodos más usados son: La prueba de antiglobulina en autoanalizador, el inmunorradioanálisis, la técnica de polibreno, los ensayos inmunoenzimáticos y la citometría de flujo (9).

La frecuencia de AHAI con prueba de Coombs negativa oscila entre el 4 al 10% del total de casos (22,50).

2.3.5 Prueba de antiglobulina directa positiva en individuos normales

Si una PAD negativa no excluye el diagnóstico de AHAI, un resultado positivo no necesariamente significa la presencia de la enfermedad.

En el 10% de los pacientes hospitalizados y entre 1 en 1000 y 1 en 9000 donantes de sangre se ha detectado una PAD positiva sin manifestaciones clínicas de hemólisis inmune. Los resultados serológicos de estos casos son similares a los encontrados en pacientes con AHAI (82). Los autoanticuerpos más frecuentemente encontrados son de la subclase IgG 1 y, en algunas ocasiones, IgG3 (9). Con la introducción de la técnica de antiglobulina en gel se ha observado una mayor frecuencia de donantes de sangre con PAD positiva (83).

En el 18 al 25% de los pacientes con infección por VIH se detecta una PAD positiva. En el eluato de estos casos no se identifican autoanticuerpos eritrocitarios sino la presencia de inmunocomplejos adheridos en los hematíes por el receptor del complementol (RC1) (84).

2.4 Detección de autoanticuerpos en la AHAI

La importancia que poseen las Igs en la destrucción de eritrocitos en las AHAI está bien establecida. Durante muchos años la PAD era el único medio para evaluar la cantidad relativa de inmunoproteínas unidas a los hematíes, pero esta prueba no permite su cuantificación (2)

Los estudios cuantitativos han aportado evidencias en cuanto a la relación entre la concentración de Igs en los eritrocitos y su supervivencia (85). Se han comprobado signos y síntomas de hemólisis en pacientes con pequeñas cantidades de anticuerpos recubriendo sus células y resultados negativos en la PAD (77,86). De esta forma se han introducido diferentes ensayos para la cuantificación de anticuerpos con el objetivo de investigar el número de moléculas de Igs que recubren a los eritrocitos *in vivo* en estados de salud y enfermedad.

2.4.1 Prueba de consumo de antiglobulina

Uno de los primeros métodos utilizados se basó en el consumo de antiglobulina. Este emplea anticuerpos contra la inmunoproteína a investigar (generalmente IgG) y mide la cantidad de anticuerpo libre después que reacciona con un número conocido de eritrocitos. Esta medición se realiza también con la fijación del complemento y la hemólisis resultante de las células blanco se determina espectrofotométricamente. La reducción en el porcentaje de fijación de complemento se relaciona en curvas estándares y se determina el número de moléculas de IgG o de C3 por eritrocitos (87, 88).

Otros procedimientos para estimar el consumo de anticuerpos se basan en el radiomunoanálisis (89), el ELISA (90) y la inhibición de la hemaglutinación (91).

Se ha utilizado una técnica automatizada para medir el consumo de antiglobulina después de la aglutinación de los eritrocitos con polivinil pirrolidona (PVP) (92). Este método es lo suficientemente sensible para detectar un promedio de 24 moléculas de IgG por eritrocito.

Las técnicas de consumo cuantitativo de antiglobulina no se utilizan en la actualidad porque, aunque brindan resultados confiables, consumen tiempo y requieren de un considerable soporte técnico.

2.4.2 PAD con autoanalizador

Para proveer datos cuantitativos se ha utilizado un método de antiglobulina donde la reacción de aglutinación entre el anticuerpo y los eritrocitos se facilita con PVP. Para esta prueba las muestras de eritrocitos se incuban con el antisuero específico en un

autoanalizador continuo en presencia de PVP. Después de la remoción de los aglutinados, los eritrocitos no aglutinados se lisan y se registra la densidad óptica (DO). Se calcula el porcentaje de la aglutinación y el número de moléculas de anticuerpo que están unidas a los eritrocitos se deriva del porcentaje de aglutinación del estándar. Este método es capaz de detectar menos de 8 moléculas de IgG anti-RhD por hematíe (11).

2.4.3 Radioinmunoanálisis (RIA)

EL RIA se ha usado extensivamente para medir inmunoproteínas. Básicamente, se hace reaccionar un número conocido de eritrocitos sensibilizados con exceso de reactivo antiglobulínico marcado con un isótopo radiactivo (usualmente ¹²⁵I). La reactividad de las células sensibilizadas se relaciona con la de muestras controles (88). Este método puede brindar resultados consistentes y se ha convertido en un método estándar para cuantificar inmunoproteínas unidas a eritrocitos.

2.4.4 Citofluorometría de flujo

El uso de la citofluorometría de flujo para evaluar inmunoproteínas unidas a eritrocitos ha encontrado muchos adeptos (94-96).

En esta técnica se unen los anticuerpos marcados con fluoresceína a los eritrocitos a estudiar y estos pasan a través de una cámara de flujo donde un láser de argón interactúa con ellos. Los impulsos resultantes de esta interacción se transforman en señales digitales que son analizadas en un sistema computarizado. La fluorescencia por célula se puede usar como una medida de la concentración de Igs unidas a la célula. Una ventaja de este método es que pueden utilizarse 2 ó más marcadores fluorescentes y de esta forma analizar diferentes inmunoproteínas simultáneamente. El límite de detección de anticuerpos por este método es de 400 moléculas por célula por lo que no es tan sensible como otras técnicas.

2.4.5 Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)

La utilización del ELISA para cuantificar inmunoproteínas unidas a eritrocitos se ha incrementado con el pasar de los años. Los estudios iniciales con células sensibilizadas "*in vitro*" confirmaron que los valores de densidad óptica eran linealmente proporcionales a la concentración de los anticuerpos IgG (97). Se encontró además una buena correlación entre los resultados del ELISA y los obtenidos por la técnica de RIA para la cuantificación de IgG(98). Este método se ha empleado para estimar la concentración de IgG, IgA e IgM unida a los eritrocitos de sujetos sanos y de pacientes con AHAI, así como para la cuantificación de

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

las subclases de IgG (11). Una de las aplicaciones más recientes de esta técnica en inmunohematología es la cuantificación de autoanticuerpos eritrocitarios involucrados en la patogenia de la AHAI (99).

2.5 Características generales de los ensayos inmunoenzimáticos

Los ensayos inmunoenzimáticos muestran numerosas ventajas tales como: elevada sensibilidad y especificidad, alta precisión y exactitud, el uso de reactivos de larga vida y de una gran variedad de cromógenos, así como del empleo de un equipamiento relativamente barato. Estos métodos constituyen el desarrollo ulterior de los radioinmunoensayos, que en lugar de los peligrosos radioisótopos de corta vida media, se emplean enzimas como sustancias marcadoras y se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la gran especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas (100).

A través de la combinación de la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible, el efecto inmunológico se refuerza con la amplificación enzimática, de forma que se consigue una elevada sensibilidad y detectabilidad de gran aplicación en el diagnóstico clínico (101). Gracias a ello se han podido estudiar hormonas, fármacos, péptidos y proteínas, vitaminas, agentes patógenos, otros analitos y por supuesto los anticuerpos (102, 103). La reacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante un cambio de color o la emisión de luz, producidos por la interacción de la enzima y su sustrato. Ambos efectos son cuantificables y proporcionales a la intensidad de la interacción. La popularidad de las enzimas como elemento marcador se debe a su enorme poder catalítico, su alta especificidad, el amplio espectro de sustratos que pueden usarse y la gran estabilidad de los conjugados (100, 104). Las enzimas más usadas en los ensayos heterogéneos son: peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, ureasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, glutamato descarboxilasa y anhidrasa carbónica. Entre ellas, la primacía la tienen las dos primeras. La peroxidasa es la enzima más empleada, son hemoproteínas que transfieren el hidrógeno de moléculas donadoras al peróxido de hidrógeno. Se conjuga fácilmente, tiene una elevada actividad catalítica y un gran número de cromógenos que permiten la lectura fotométrica. Dentro de ellos la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y el orto-fenilendiamina (OPD) son los más empleados. Los sustratos de depósito como el 4-cloro-1-naftol, 3-amino-9-etilcarbazol y el 3,3'-diaminobencidina, son muy apropiados para la visualización de los resultados (104, 105)

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La fosfatasa alcalina es de más difícil conjugación, sin embargo, sus conjugados son muy estables. Hidroliza numerosos ésteres de fosfato, lo que le permite tener un gran número de sustratos, entre ellos el cromogénico, para-nitrofenil fosfato, el sustrato fluorogénico, 4-metil umbeliferil fosfato, y el de depósito 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato con azul de nitrotetrazolio (104). Aunque la sensibilidad, para sustratos cromogénicos, es inferior a la que puede alcanzarse con la peroxidasa, la fosfatasa alcalina tiene como ventajas el ser menos dependiente de factores que interfieren en la muestra, como la hemoglobina y la lectura, en la mayor parte de los ensayos, puede hacerse sin que se requiera detener la reacción (100). La actividad enzimática puede estimarse mediante fluorimetría, luminometría o colorimetría, como medida de los productos solubles formados, o mediante sustratos de depósito (106). Los productos fluorescentes y luminiscentes brindan generalmente una superior sensibilidad, detectabilidad y permiten una mayor dilución de los inmunoreactantes, así como una reducción del tiempo de ejecución de los ensayos y del volumen de reacción (104). Sin embargo, la colorimetría sigue siendo el método más empleado debido a la posibilidad que brinda de una evaluación visual y del uso de un equipamiento más sencillo así como de una mayor estabilidad de los productos formados.

Clasificación

Existen diferentes criterios de clasificación para los ensayos inmunoenzimáticos; según la naturaleza del sistema pueden ser competitivos o no competitivos, conforme a la naturaleza del conjugado se han identificado los ensayos con antígenos o anticuerpos marcados (100, 101). La clasificación más usada se basa en si se requiere o no de procedimientos para separar las fases del ensayo. De acuerdo con este criterio los se clasifican en heterogéneos y homogéneos (101).

Los ensayos inmunoenzimáticos homogéneos se ejecutan sin una fase sólida y no requieren la separación entre los reactantes enlazados y libres. Su principio se basa en una inhibición o activación de la reacción enzimática por el complejo antígeno-anticuerpo. En la reacción enzimática de comprobación la actividad catalítica se mide en comparación con el conjugado libre, lo que hace superflua la separación de fases, razón por la cual se le denomina ensayo homogéneo (104).

En estos ensayos aunque queda eliminada la fase de separación, se introduce el riesgo de que los componentes de la muestra puedan interferir en la actividad enzimática. La principal limitante de estos es que son menos sensibles que los heterogéneos, por lo que generalmente no son empleados para la detección de anticuerpos (101).

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el ensayo inmunoenzimático heterogéneo conocido con el nombre ELISA, se realiza una separación entre el inmunocomplejo formado sobre la fase sólida y las biomoléculas no fijadas. Esta separación puede hacerse por aspiración y lavado, con lo que se eliminan todos los componentes de la muestra que podrían interferir en el ensayo (100, 104). La separación entre los inmunoreactantes libres y fijados puede hacerse también por la captura de los inmunocomplejos de interés, filtración, difusión radial y otros principios inmunocromatográficos que han servido de base a ensayos rápidos, sencillos y que no requieren de equipamiento costoso (104). No obstante, los lavados continúan siendo el procedimiento de elección y son necesarios entre cada paso de reacción, lo que obstaculiza la automatización. Esta limitante se ha superado con el uso de ensayos, en un solo paso, en el que se añaden simultáneamente los inmunoreactantes, dirigidos contra diferentes epitopos donde se requiere lavar tan sólo en el paso previo al sustrato (107).

La técnica ELISA se fundamenta en que al acoplar antígenos solubles o anticuerpos a una matriz sólida insoluble, éstos conservan la actividad inmunológica además que estas biomoléculas también pueden unirse a una enzima, reteniendo el conjugado resultante, tanto la actividad enzimática como inmunológica (106). Su principal ventaja está dada en su alto grado de sensibilidad, detectabilidad, precisión y exactitud, lo que hace que estos ensayos puedan equipararse a los radioinmunoensayos, sin sus desventajas (105).

Existen diferentes clasificaciones para los ELISA basadas fundamentalmente en los principios de reacción. Los ELISA pueden ser competitivos o no competitivos. En los ensayos competitivos, los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, es inhibida por la presencia de un analito no marcado en la muestra. En general la sensibilidad y detectabilidad de estos ensayos es inferior a los no competitivos (101).

Los ensayos heterogéneos no competitivos pueden subdividirse de acuerdo al inmunoreactante inmovilizado en, ensayos de captura de anticuerpos o de antígenos. Entre los primeros se destaca el principio de ensayo indirecto, en el cual los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por el conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, o proteína A-enzima, y la degradación ulterior del sustrato (100). Este método es el de elección para detectar anticuerpos de clase IgG o IgA. Los anticuerpos IgM pueden investigarse previa absorción de los anticuerpos IgG, aunque este isotipo se estudia preferentemente con ensayos de captura (101). Los ensayos indirectos presentan una alta detectabilidad que depende de la densidad de epitopos de relevancia diagnóstica presentes en la fase sólida (100).

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El ensayo sandwich de doble anticuerpo es el ejemplo clásico de un método para la detección de antígenos, el primer anticuerpo fijado a la fase sólida captura el antígeno de la muestra que es detectado a través del conjugado anticuerpo-enzima o amplificado con un conjugado dirigido contra el segundo anticuerpo (sandwich doble anticuerpo modificado) (104).

En general los ensayos tipo sandwich son más apropiados para la automatización de los sistemas ELISA, ya que puede disminuirse un paso de reacción añadiendo simultáneamente muestras y conjugado, sin embargo, hay que prever las posibles interferencias del conjugado, a elevadas concentraciones de antígenos o anticuerpos en la muestra (101). La detectabilidad de todos estos ensayos puede incrementarse usando métodos de amplificación no inmunológicos (por ejemplo el sistema avidina-biotina y cascadas enzimáticas) o inmunológicos (por ejemplo el sistema peroxidasa-antiperoxidasa) (100,104). La selección de uno u otro principio depende principalmente de los propósitos del ensayo, la disponibilidad y calidad de los reactivos, así como de su utilización en la práctica (104).

Adsorción de biomoléculas a la fase sólida.

En los ELISA es extremadamente importante la sensibilización de la fase sólida. En estos ensayos hay una proporcionalidad entre el número de moléculas inmovilizadas sobre la matriz sólida y las que reaccionan en capas posteriores (108, 109). Es vital, además, que la orientación de las moléculas inmovilizadas sea la correcta, por ejemplo, los anticuerpos deben unirse por el fragmento Fc para permitir una interacción adecuada con el antígeno. También son requisitos necesarios que estas moléculas presenten una disociación mínima y que mantengan la actividad biológica (110). El número de moléculas adsorbidas en la primera capa es aproximadamente de 100 ng/cm² en plásticos normales, cuando se usan superficies de alta captación puede incrementarse alrededor de 400 ng/cm² (108). La adsorción de las biomoléculas depende principalmente de las fuerzas de atracción intermoleculares, basados en polaridades eléctricas intramoleculares y estacionarias, mediadas principalmente en el primer caso por grupos hidrofóbicos y en el segundo por grupos hidrofílicos (110).

Se usan un gran número de materiales y formas. Las matrices sólidas particuladas, como perlas o micropartículas, las membranas. Los formatos de tubos, tiras o placas, generalmente brindan una mayor sensibilidad y detectabilidad al aumentar la superficie de contacto y posibilitan disminuir los tiempos de reacción (110). Las microplacas, son las matrices de elección en los ELISA cuando se desea procesar un elevado número de

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

muestras (100, 108). Aunque existen un gran número de materiales; cloruro de polivinilo, polipropileno, acrílico, nitrocelulosa, entre otros, el poliestireno es el más usado por su excelente cualidad óptica. Las microplacas de poliestireno pueden ser estándares o de alta captación. Estas últimas además de los grupos hidrofóbicos característicos de este material, tienen una fina red de grupos hidrofílicos capaces de establecer puentes de hidrógeno. La alta energía requerida para la introducción de átomos de oxígeno, nitrógeno u otros grupos polares al poliestireno puede ser producida por irradiación gamma o beta. Esta modificación produce una superficie con excelentes propiedades para la captación de moléculas hidrofílicas (100,109,110)

Existen diferentes factores que determinan la adsorción efectiva de la biomolécula a la fase sólida. La velocidad de difusión de la biomolécula disminuye proporcionalmente al aumento del volumen hidrodinámico, por consiguiente la velocidad y por tanto la adsorción de las grandes moléculas es menor que las pequeñas. Según sea su hidrofobicidad y el tipo de soporte sólido, se favorecerá o no la adsorción (106,108). A mayor concentración se incrementa la adsorción. Las concentraciones entre 1-10 mg/mL son generalmente suficientes, aunque deben estimarse en cada caso. Las concentraciones muy elevadas pueden provocar una disminución de la sensibilidad y la detectabilidad del ensayo (efecto gancho") por la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos subsiguientes inhibiendo los inmunoreactantes en la fase líquida (100,108).

El tiempo y la temperatura de incubación son directamente proporcionales a la adsorción. Generalmente un incremento de la temperatura aumenta la velocidad de difusión que favorece la interacción entre la biomolécula y la fase sólida. El tiempo debe ser definido en cada caso para lograr una inmovilización efectiva. No obstante se conoce que cuando se prolonga demasiado el tiempo o se aumenta excesivamente la temperatura, puede disminuir la adsorción por desnaturalización de las biomoléculas. Existe una relación inversa entre tiempo y temperatura que debe ser controlada estrechamente. De esta forma incubaciones de 2 - 4 horas a 37 °C son equivalentes a 16-20 horas a 2 - 8 °C. Generalmente esta última combinación es satisfactoria, aunque el tiempo y la temperatura óptimos son particulares para cada biomolécula (104,106).

La adsorción es más fuerte cerca del punto isoeléctrico de la biomolécula, sin embargo el amortiguador para la dilución de esta se determina experimentalmente. El más común y de mejores resultados es el carbonato / bicarbonato 0.05 M, pH 9.6. No deben emplearse amortiguadores con elevada fuerza iónica, detergentes, u otras moléculas que puedan

competir con los sitios de unión a la fase sólida o aumentar la viscosidad de la solución (100,104).

La concentración óptima de recubrimiento con una temperatura, tiempo y amortiguador definidos, habitualmente se determina cuando con el suero positivo empleado para este fin, se alcance en el ensayo la mayor señal (106,108). En la práctica se prefiere recubrir a un ligero exceso de material biológico, siempre y cuando se cumplan las condiciones anteriores. Los posibles espacios libres pueden bloquearse con moléculas que no interfieran con el inmunoensayo enzimático, como la albúmina sérica bovina, la gelatina, la leche descremada, la caseína, sueros de diferentes especies animales y el tween 20 que además de ser un efectivo detergente es un verdadero agente bloqueador(100,106,108)

2.5.1 Parámetros de validación de los ensayos inmunoenzimáticos

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos.

No existe un acuerdo universal acerca de la definición de algunos parámetros y a su vez el mismo parámetro puede ser determinado por diferentes métodos (111).

Los parámetros estudiados en los ensayos cuantitativos son: precisión, exactitud, linealidad, rango o intervalo, límite de detección, límite de cuantificación y selectividad.

Dentro de los parámetros estudiados en aquellos ensayos en los que se realice un análisis cualitativo se encuentran: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, eficacia o coincidencia, estudios de concordancia y ancho de la zona "gris" como medida de precisión.

La precisión se define como el grado de cercanía o dispersión de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces (111). Puede dividirse en:

Precisión intraensayo o repetibilidad: Es la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. En este ensayo se analizarán muestras que hayan sido procesadas independientemente, desde la preparación hasta los resultados finales y usarse al menos dos diferentes concentraciones del analito, alta y baja, aunque es preferible añadir una muestra de concentración media, o más muestras si se quiere alcanzar una mejor evaluación. Una de éstas debe tener una concentración próxima al valor de decisión clínica, otra un valor cercano al límite superior del intervalo analítico y la tercera un valor cercano al límite inferior. El número de repeticiones recomendado varía desde 5 a 10 (111,112).

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Precisión interensayo: Es la que se obtiene entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones. Se evalúan muestras con diferentes concentraciones, tal y como anteriormente describimos. De cada muestra se hacen entre 3 a 10 replicados en un ensayo, repitiendo este procedimiento al menos dos veces en días diferentes para un total de 3 ensayos. La precisión interensayo permite también explorar la reproducibilidad del trabajo de un laboratorio durante un período de tiempo determinado, para evaluar la ejecución entre los técnicos, la variación entre laboratorios y lotes de reactivos (111,112).

Los ensayos inmunoenzimáticos, por su propio carácter, son menos precisos que las técnicas químicas, físicas o bioquímicas, por lo que el criterio de validación es menos riguroso. El coeficiente de variación [$CV = (\text{Desviación estándar} / \text{promedio}) \times 100$] no debe superar el 10 % en la prueba de precisión intraensayo y el 20 % en la interensayo, siendo óptimos los inferiores al 5 % y al 10 % respectivamente (111,112). Sin embargo, las normas vigentes de la Organización Mundial de la Salud admiten un rango entre el 5 % y el 20 % (113).

La exactitud es el grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con cierto método y el contenido real del analito en la muestra. Indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al valor verdadero. Si la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Con la evaluación de este parámetro se investigan los componentes que influyen en la veracidad del método (error sistemático), además de predecir la magnitud y la dirección del error (111). Para evaluar la exactitud se recomienda efectuar los estudios siguientes (111).

Ensayo de recuperación. Evalúa la capacidad del método de recobrar una concentración exógena de analito, añadida a una muestra con concentración endógena libre de éste o con baja concentración. Se expresa y calcula matemáticamente en forma de porcentajes de recuperación. Para su estudio se puede emplear una muestra de concentración conocida que se analiza de 6 a 10 veces, aunque es más recomendable usar al menos tres cantidades diferentes de analito, de forma tal que se abarque el rango analítico y analizarlas en triplicado.

- Ensayo de paralelismo o de dilución. Este ensayo es usado también para evaluar la linealidad. Para que los resultados de este método sean válidos es esencial que el analito en el estándar y las muestras tengan un comportamiento similar, por esta razón las diluciones no deben afectar el resultado final. Con este ensayo se evalúa el efecto matriz. Se utiliza el diluyente especificado y se preparan al menos tres diluciones de no menos cinco muestras que se evalúan en triplicado.

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Ensayo de comparación de métodos. La comparación con otro método de referencia tiene como objetivo determinar la equivalencia de métodos analíticos diferentes y permite explorar, además de la exactitud, la precisión. Debe tenerse en cuenta que si se encuentran diferencias, éstas pueden ser causadas por las propias limitaciones del método, por lo que estos estudios nunca deben emplearse de forma aislada para evaluar el error sistemático. Éste estudio se puede llevar a cabo a concentración única del analito o preferentemente con varias concentraciones diferentes que abarquen el rango analítico. El tamaño de la muestra debe ser adecuado para permitir el estudio estadístico, y diferirá en función del modelo estadístico empleado para el tratamiento de datos.

En los estudios de exactitud pueden usarse varios métodos de cálculo como el porcentaje de recuperación o través de un análisis de regresión (112). El porcentaje de recuperación es un procedimiento sencillo y eficaz para evaluar la exactitud. La recuperación se define como el error (%) entre el valor observado u obtenido y el real o esperado (valor obtenido en el ensayo $\times 100 /$ valor esperado) y debe encontrarse entre el 90 % y 110 % (112).

La exactitud puede estudiarse calculando la recta de regresión entre los valores teóricos y los obtenidos en el ensayo, previa verificación de la homogeneidad de las varianzas para cada punto de la curva con la prueba C de Cochran. El coeficiente de determinación (R^2) debe ser > 0.98 y el de correlación (r) > 0.99 . Para confirmar si la recuperación es satisfactoria o no, se aplica la prueba t de Student. Si la t calculada es menor que la tabulada no existe diferencia significativa, por lo que la exactitud es correcta (111).

El CV es también empleado en los ensayos de dilución. Se basa en que al diluir una muestra de concentración conocida y luego de corregida por el factor de dilución, los resultados deben ser idénticos dentro del error experimental, por lo que el CV no debe superar el 10 % (111,112).

Se entiende como Linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. Se prefiere hablar de comportamiento lineal pues generalmente en los inmunoensayos enzimáticos no existe *per se*, por lo que se emplean diversos métodos para linealizarla. Dentro del término linealidad se incluye la proporcionalidad entre concentración de analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio. También se relaciona con la sensibilidad de calibrado o cociente diferencial entre la señal medida y la concentración de analito, y es igual al valor de la pendiente de la curva de calibración a una concentración determinada (100,111,112).

Se puede evaluar con los estudios siguientes:

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Ensayo de paralelismo: Descrito previamente. Además en este caso pueden usarse muestras con concentraciones de analito sobre el rango analítico y preparar de 6 a 8 diluciones, analizando cada dilución en triplicado. Se calcula el porcentaje de recuperación y el CV con las concentraciones corregidas por el factor de dilución y la recta de regresión. R^2 y r con los valores sin ajustar (106,111).
- El porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 90 % y 110 %. El R^2 debe ser > 0.98 . $r \geq 0.99$ y el intercepto con el eje de ordenadas no debe diferir estadísticamente de cero en ajustes lineales. El CV de los factores de respuesta no debe ser superior al 10 % en los inmunoensayos, aunque para otros tipos de ensayos de comportamiento lineal no debe exceder del 5 % (106,111).

El rango es el intervalo entre el mayor y el menor nivel de analito que pueden ser medidos con aceptable precisión y exactitud. Puede medirse utilizando un diseño similar al empleado en los estudios de exactitud y linealidad, lo que nos permite realizar el estudio del rango de forma simultánea. Una vez realizado todo este conjunto de ensayos, deberán cumplirse los criterios de exactitud y precisión en cada uno de los niveles del intervalo, así como la linealidad a lo largo del mismo (100,111).

El límite de detección ó detectabilidad es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. Es decir, la concentración mínima de una sustancia que genera una respuesta consistentemente mayor que el fondo del ensayo. Para obtener el límite de detección se analiza un blanco adecuado, o una muestra libre del analito estudiado. Aunque se ha sugerido usar un número pequeño, entre 6 y 10, de réplicas, es preferible usar un número mayor, al menos 20 (106,111).

Después de verificar la normalidad de la distribución, se calcula el límite de detección, adicionándole al valor medio de la señal obtenida, 2 ó 3 desviaciones estándar en los ensayos con curvas de calibración con pendiente positiva, como es el caso de los ELISA indirectos, o sustrayéndole los valores correspondientes si la pendiente es negativa. La concentración correspondiente se obtiene interpolando este valor en una curva de calibración apropiada que incluya concentraciones bajas de anticuerpos contra el analito estudiado. Una metodología sencilla para curvas lineales consiste en multiplicar 2 ó 3 desviaciones estándar del blanco a la concentración de una muestra estándar y dividirlo entre la densidad óptica de la muestra (100, 106,111).

El límite de cuantificación: es la mínima concentración del analito que puede determinarse con una precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas.

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible), mientras que el de detección es cualitativo (menor cantidad detectable) (105,106,111).

La selectividad se define como la capacidad del método para determinar el analito para el cual está diseñado, exactamente y sin que interfieran otros componentes de la muestra. Es una característica intrínseca del método, que depende del principio de la reacción y del material que se investiga. Los términos selectividad y especificidad se consideran equivalentes, aunque se ha definido la selectividad como la capacidad de detectar separadamente sustancias diferentes presentes en una misma muestra y especificidad la capacidad de detectar el analito sin interferencia de ningún otro compuesto. Se evalúa ensayando muestras que contengan componentes estructuralmente cercanos al analito, u otros que pudieran interferir en los resultados, tales como hemoglobina, lípidos, anticoagulantes, inmunoglobulinas dirigidas contra otros antígenos relacionados con el estudiado y anticuerpos que reaccionen con los reactantes (111).

Para diferenciar el término de sensibilidad usado en los ensayos cualitativos, se ha empleado el término de sensibilidad diagnóstica en oposición a la sensibilidad analítica, que es definida como la sensibilidad del ensayo a cambios en la concentración del analito y depende de la pendiente de la curva dosis-respuesta y de la imprecisión en la determinación de la concentración del analito. En los ensayos cualitativos la sensibilidad es definida como la proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba empleada (100, 105, 106, 109,111).

El valor predictivo positivo es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo cuando el resultado de la prueba que se le practica resulta reactivo. El valor predictivo negativo es la probabilidad que tiene un individuo de ser negativo cuando el resultado de la prueba es no reactivo (100,106).

Los valores predictivos (VPP, VPN), manteniendo la sensibilidad (S) y especificidad (E) invariables, se modifican drásticamente de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad, marcador inmunológico, genético, bioquímico o de otra índole, estudiado en la población. A medida que la prevalencia (P) disminuye el VPN aumenta y el VPP disminuye (100). Esta probabilidad se calcula según el teorema de Bayes.

$$VPP = [S \times P] / [S \times P + (1 - E) \times (1 - P)]$$

$$VPN = [E (1 - P)] / [E (1 - P) + (1 - S) \times P]$$

La eficacia o coincidencia es la capacidad general de un ensayo para detectar correctamente todos los positivos y los negativos. Una eficacia óptima se alcanzará con aquella técnica que

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

no tenga falsos resultados positivos ni falsos negativos (100,105,106). Para el cálculo de estos últimos parámetros deben estudiarse, siempre y cuando sea posible, al menos 100 muestras representativas de la población sobre la que la técnica será utilizada, en las que se deben encontrar muestras con diverso grado de positividad y muestras negativas (100,105,106,111).

Resulta muy útil el uso de tablas de contingencia:

Ensayo a evaluar	Referencia		Total
	Resultados Positivos	Resultados Negativos	
Resultados Positivos	VP (a)	FP (b)	a + b
Resultados Negativos	FN (c)	VN (d)	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Donde:

VP = Verdaderos positivos o positivos correctamente detectados.

FP = Falsos positivos.

VN = Verdaderos negativos o negativos correctamente detectados.

FN = Falsos negativos.

Sensibilidad = $[a / (a + c)] \times 100$

Especificidad = $[d / (b + d)] \times 100$

Valor predictivo positivo = $[a / (a + b)] \times 100$

Valor predictivo negativo = $[d / (c + d)] \times 100$

Eficacia = $[(a + d) / (a + b + c + d)] \times 100$

Estudios de concordancia:

Cuando se requiere la evaluación de diferentes métodos frente a un mismo panel de sueros de referencia, se usan estudios de concordancia (o eficiencia), como son la prueba de Mac Nemar y el más usado índice Kappa (100,105,106,111):

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ensayo estudiado	Referencia		Total
	Resultados Positivos	Resultados Negativos	
Resultados Positivos	a	b	a + b
Resultados Negativos	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n=a + b + c + d

Procedimiento de cálculo:

$$K = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$$

Donde:

$$p_o = (a + d) / n$$

$$p_e = (P + N) / n$$

$$\text{Concordancia en el caso de positivos } P = [(a + b) / n] \times [(a + c) / n] \times n$$

$$\text{Concordancia en el caso de negativos } N = (c + d) - \{(a + c) - P\}$$

El índice de concordancia (K) puede clasificarse en 5 grupos distintos:

Concordancia Kappa

Deficiente < 0.20

Regular 0.21 – 0.40

Moderada 0.41 - 0.60

Buena 0.61 - 0.80

Muy buena 0.81- 1.00

En la práctica, cualquier valor de Kappa < 0.5 denota una baja correlación. Un problema del uso de este índice es que los valores dependen de la proporción (prevalencia) de muestras de cada categoría, haciendo que no sea posible la comparación de diferentes índices procedentes de estudios distintos (100,105,106,111).

Ancho de la zona "gris" como medida de precisión: La zona "gris" es aquella en la que los resultados no pueden clasificarse con certeza como positivos o negativos, o son claros pero no reproducibles. El ancho de esta zona es importante y define la precisión de un ensayo cualitativo, que será mayor a medida que sea más estrecha (100,105,106,111). Se evalúa preparando varias diluciones de una muestra de referencia, analizando al menos 20 replicados de cada dilución en orden aleatorio y registrando los resultados en positivos o negativos, según el valor de corte definido para el ensayo. El valor de discriminación

corresponderá a la dilución en la que se obtenga el 50 % de resultados positivos y la zona gris se extenderá entre el 5 % y el 95 % de resultados positivos (100,105,106.111).

2.6 AHAI inducida por drogas

Los primeros casos descritos de AHAI por autoanticuerpos inducidos por drogas se relacionaron con la administración de alfa metildopa (2). Después de esta observación otras drogas han sido identificadas como inductoras de autoinmumdad contra eritrocitos. Los hallazgos serológicos de estos casos son indistinguibles de los asociados a las AHAI (3).

Se han sugerido diferentes mecanismos para explicar la inducción de la autoinmunidad por drogas. Unos se apoyan en que la droga altera los antígenos del hematíe siendo estos reconocidos como ajenos por el sistema inmune (13). También en ensayos *"in vitro"* se ha demostrado que la droga interfiere en la función de las células T supresoras lo que facilita la producción de autoanticuerpos por las células B. Otros estudios no confirman estos resultados (114).

Los hallazgos inmunohematológicos relacionados con la inducción de autoanticuerpos por la alfa metildopa son los siguientes: PAD positiva en aproximadamente el 15 % de los pacientes que reciben tratamiento con dicho fármaco, pero sólo entre el 0.5 y el 1 % desarrollan anemia hemolítica. En los eritrocitos se identifica IgG y raramente C3. La PAD puede ser positiva a los 6 meses después del tratamiento y disminuir progresivamente después que es suspendido el fármaco (13).

Los pacientes con autoanticuerpos eritrocitarios sin manifestaciones clínicas de anemia hemolítica deben ser cuidadosamente monitoreados serológica y hematológicamente. Es de valor en estos casos la realización de la prueba de antiglobulina indirecta. En los pacientes con PAD positiva y PAI negativa la anemia hemolítica es improbable. En los que ambas pruebas resulten positivas hay alto riesgo de aparición de la anemia hemolítica inducida por el tratamiento con el medicamento (13).

El interferón desde su descubrimiento se ha usado en el tratamiento de enfermedades malignas. Los mejores resultados en el tratamiento de las hemopatías malignas se han obtenido en la leucemia de células peludas y en la leucemia mieloide crónica (115). Numerosos informes han documentado la modificación de algunos parámetros de la respuesta inmune por esta droga como son: un incremento en la actividad de las células asesinas naturales, alteraciones en la actividad supresoras de los linfocitos y un incremento de la expresión de las moléculas de clase I del sistema principal de histocompatibilidad.

Estos parámetros se han relacionado con la inducción de autoinmunidad por el interferón alfa (IFN a) (115).

Asociado con el tratamiento con este fármaco se ha detectado la presencia de autoanticuerpos en relación con enfermedades autoinmunes como la hepatitis autoinmune la anemia perniciosa, enfermedades del tiroides y vasculitis (14). Por otra parte se ha señalado que en el 15 al 20% de los pacientes con tratamiento con IFN a se observan síntomas de enfermedades autoinmunes. La AHAI se ha identificado en un reducido número de casos pero en general existen pocas comunicaciones sobre el tema (14).

2.7 AHAI por anticuerpos fríos

En este grupo de AHAI se identifican el síndrome de aglutininas frías y la hemoglobinuria paroxística a frigore.

El SAF es el tipo más común de anemia hemolítica asociada con autoanticuerpos fríos y representa del 16 al 32 % del total de casos con hemólisis autoinmune. Este síndrome se manifiesta de forma aguda o crónica. La forma aguda es secundaria a enfermedades linfoproliferativas o a la infección por *Mycoplasma pneumoniae*. La forma crónica se observa en pacientes de edad avanzada con manifestaciones de anemia ligera o moderada (2).

El fragmento C3 del complemento es la única proteína detectada en los hematíes. Los autoanticuerpos fríos son de la clase IgM y se unen a los hematíes en la circulación periférica a temperaturas inferiores de 32°C. La IgM activa la cascada del complemento y particularmente promueve la unión del C3b a los eritrocitos. Al circular el eritrocito por áreas donde la temperatura es mayor, los autoanticuerpos se disocian y solo queda unido a los hematíes el complemento. La acción de los factores I y H provoca que el C3b sea transformado a C3bi y a C3dg (13).

En el suero de estos pacientes se identifican autoanticuerpos IgM reactivos a bajas temperaturas denominados crioaglutininas con especificidad para el antígeno I de grupo sanguíneo. Las crioaglutininas muestran títulos superiores a 1:1000 en períodos de incubación de 12 horas a 4°C. Estas son capaces también de aglutinar los hematíes a 37°C en presencia de albúmina. Es importante tener en cuenta este aspecto ya que los autoanticuerpos fríos se consideran "naturales" y están presentes en la mayoría de los individuos sanos pero en títulos inferiores a 1:64 e incapaces de reaccionar con los hematíes a 37°C (3,116).

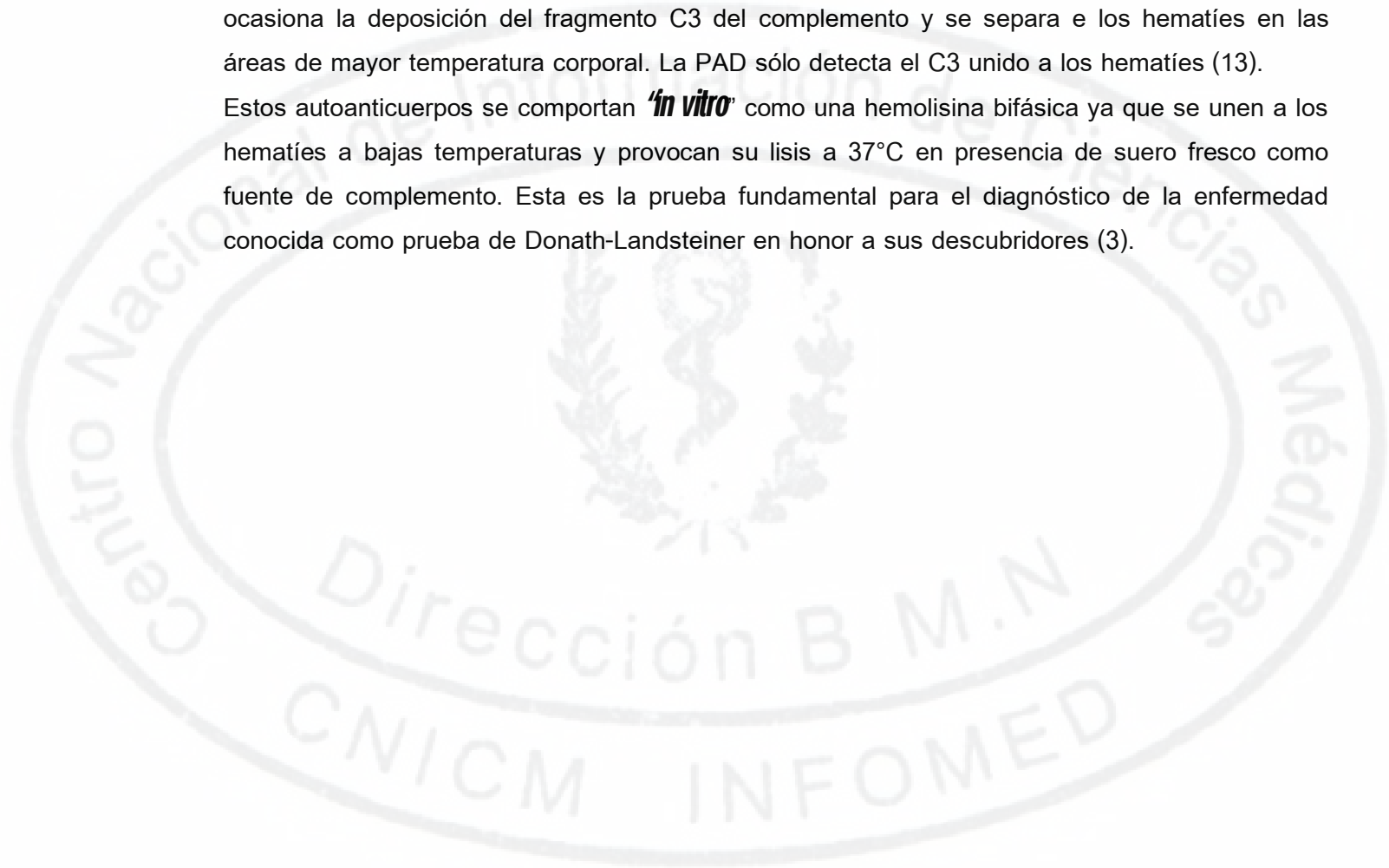
La hemoglobinuria paroxística a frigore es poco frecuente. En el pasado se encontró asociada a la sífilis. Aparece comúnmente como un proceso agudo ocasional secundario a

Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

infecciones virales particularmente en niños y puede presentarse como una enfermedad crónica idiopática en personas de edad avanzada (13).

Los autoanticuerpos causantes de la HPF son de la clase IgG con especificidad para el antígeno P de grupo sanguíneo. Al igual que las crioaglutininas, estos autoanticuerpos reaccionan con los eritrocitos en las áreas de menor temperatura, generalmente en las extremidades, lo que ocasiona la deposición del fragmento C3 del complemento y se separa e los hematíes en las áreas de mayor temperatura corporal. La PAD sólo detecta el C3 unido a los hematíes (13).

Estos autoanticuerpos se comportan *'in vitro'* como una hemolisina bifásica ya que se unen a los hematíes a bajas temperaturas y provocan su lisis a 37°C en presencia de suero fresco como fuente de complemento. Esta es la prueba fundamental para el diagnóstico de la enfermedad conocida como prueba de Donath-Landsteiner en honor a sus descubridores (3).



Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diagnóstico de AHAI

El diagnóstico de la AHAI en los pacientes se realizó por una disminución de la hemoglobina inferior a 120g/L, un incremento de los reticulocitos superior al 2% y de la bilirrubina no conjugada en valores superiores a 13.7 $\mu\text{mol/L}$ (cuando estuvo disponible) y la detección de autoanticuerpos eritrocitarios reactivos a 37°C así como la ausencia de autoanticuerpos fríos de importancia clínica, excluidos por un título de crioaglutininas dentro del rango normal y un resultado negativo en la prueba de Donath-Landsteiner (D-L). El diagnóstico se apoyó a su vez con el hallazgo en el medulograma de una hiperplasia del sistema eritropoyético con cambios megaloblásticos y con coloración azul de prusia positiva, que evidencia la acumulación de hierro producto de la hemolisis. El hemograma se realizó por las técnicas convencionales y sus resultados se obtuvieron de la historia clínica. Todos los casos fueron investigados en el Departamento de Inmunoematología del Instituto de Hematología e Inmunología en el período comprendido entre Octubre del 1995 y Septiembre del 2001.

3.2 Pruebas inmunohematológicas

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa y se colectaron en tubos que contenían EDTA al 5%. Posteriormente la sangre total colectada se centrifugó a 270 x g durante 8 minutos a temperatura de 20-22°C y se eliminó el plasma y la capa leucoplaquetaria. Los eluatos se obtuvieron por el método del éter a partir de 1 ml del concentrado de hematíes lavados 10 veces por centrifugación con 10 volúmenes de solución salina fisiológica al 0.9%. Al paquete de hematíes lavados se le añadió 1 ml de solución salina balanceada de fosfato 0.15 mol/L, pH 7.2 (SSBF) con albúmina bovina al 0.4% y 1 ml de éter dietílico (Merck). La mezcla se incubó 10 minutos a 37°C en baño de agua. Posteriormente se centrifugó a 270 x g durante 3 minutos y se eliminó la capa superior de éter. El eluato con hemoglobina libre se transfirió a un tubo de cristal y se incubó a 37°C durante 15 minutos para evaporar los residuos de éter (3). Se obtuvo un promedio de 1 ml de eluato por cada muestra extraída que fueron almacenados hasta su uso a -30°C.

A los pacientes se les realizaron las siguientes determinaciones: la PAD y la prueba de antiglobulina indirecta (PAI) con suero de Coombs poliespecífico obtenido en nuestra institución según los criterios de calidad establecidos (3,117). La presencia de autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgA e IgM y del fragmento C3 del complemento en los

hematíes se determinó en la PAD con suero antiglobulina humana monoespecífico anti-IgG (Dako), anti-IgA, anti-IgM y anti-C3 (Behring). La PAD se realizó por la técnica de tubo con la adición de 50 μ L de la suspensión al 5% en solución salina al 0.9% de los hematíes del paciente previamente lavados tres veces con esta solución y 100 μ L del suero antiglobulina poliespecífico o monoespecífico en dependencia de la determinación. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 250g durante 30 segundos y se realizó la lectura de la aglutinación resuspendiendo el botón suavemente. La presencia de aglutinados se consideró un resultado positivo y su ausencia se clasificó como negativo (3). La PAI se realizó con la adición a tubos de 50 μ L de la suspensión al 5% de los hematíes testigos pertenecientes a un panel de trabajo y 100 μ L del suero del paciente o el eluato de los hematíes. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y se lavaron los hematíes tres veces con solución salina al 0.9% previo a la adición de 100 μ L del suero antiglobulina poliespecífico o monoespecífico. La lectura de la aglutinación se realizó de acuerdo a lo explicado con anterioridad (3).

3.3 Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de IgG, IgA e IgM asociadas a los hematíes.

3.3.1 Componentes del ELISA para cuantificar IgG, IgA e IgM asociada a los hematíes.

Recubrimiento: El proceder se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Immunoplates) que se recubrieron con 100 μ L en el pocillo correspondiente, de la fracción IgG de anticuerpos de carnero anti-IgG(γ), anti-IgA(α) o anti-IgM(μ) humano (Sigma) en solución balanceada de carbonato bicarbonato 0.05M, pH 9,6.

Lavados: Se realizaron cuatro lavados seguidos de cada paso de incubación con solución salina balanceada con fosfato 0.15 mol/L pH 7.2 y Tween 20 al 0.05% (SSBF-Tw-0.05), a excepción de los lavados efectuados posterior al recubrimiento donde se empleó como solución de lavado SSBF-Tw al 0.2%.

Curva de calibración: Se utilizó como analito el suero humano de concentración conocida Nor-Partigen (Lot 0488181, Behring, WG) diluido en SSBF-Tw -0.05% con albúmina bovina al 0.4% (SSBF-Tw-A) en concentraciones desde 0.0025 μ g hasta 0.07 μ g de IgG, IgA e IgM por ml. Se dispensó 100 μ L de cada concentración del analito.

Controles: Como controles positivos se seleccionaron los eluatos de los hematíes de pacientes con AHAI que mostraron una aglutinación en la PAD de 4+, 2+ y 1+ con el suero de Coombs monoespecífico anti-IgG (Dako, UK) y de 3+, 2+ y 1+ con los sueros de Coombs monoespecíficos anti-IgA y anti-IgM (Behring, WG). Para el control normal del ensayo se

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

seleccionó una mezcla de eluatos de hematíes, obtenido por el método del éter descrito previamente, proveniente de 10 donantes de sangre.

Blanco: Como blanco del ensayo se utilizó la SSBF-Tw 0.05% con albúmina bovina al 0.4%

Conjugados: Se utilizaron la fracción IgG de carnero anti-Fc de la IgG, IgA e IgM humana (Sigma) marcados con peroxidasa y diluidos en SSBF-Tw-A. La cantidad añadida del conjugado fue de 100 μ l por pocilio.

Sustrato: Se dispensó 100 μ l por pocilio de una solución de 0.24 mg/ml de OPD (Merck) en tampón de ácido cítrico pH 5.0 con peróxido de hidrógeno al 0.024%. Las placas fueron incubadas con esta solución 15 minutos en cámara oscura y se detuvo la reacción con la adición de 100 μ l de H₂SO₄ 2 M.

Lectura: Las densidades ópticas de cada muestra en duplicado se leyeron a 492 nm en un lector de microelisa (Titertek Multiscan, Flow Lab).

Cálculo de las concentraciones: Las concentraciones de inmunoglobulinas (Igs) en los eluatos de los hematíes fueron calculadas a partir de los valores de las densidades ópticas que se interpolaron en un gráfico de densidad óptica contra concentración conocida de IgG, IgA e IgM humana a partir de la curva patrón. Para el cálculo de los resultados se multiplicó por el factor de dilución de la muestra.

Cálculo del número de moléculas por hematíe: El resultado se expresó como un aproximado del número de moléculas de Igs por hematíe con el uso del número de Avogadro y del peso molecular de la IgG o IgA (160.000 daltons) y de la IgM (970,000 daltons). De acuerdo al número de Avogadro 1 μ g contiene 370×10^{10} moléculas de IgG o IgA y 62×10^{10} moléculas de IgM. El número de moléculas de Igs por hematíe es igual a la concentración de Igs en ng/mi del eluato multiplicado por el número de moléculas de Igs en 1fig y dividido entre el número de hematíes en 1 mi (1.1×10^{10} hematíes).

3.3.2 Determinación de las condiciones óptimas del ensayo.

Ajuste de las concentraciones óptimas de los recubrimientos y de los conjugados.

En este ensayo los recubrimientos se incubaron de 16 a 18 horas de 2-8°C, los controles y calibradores 1 hora a 37°C al igual que los conjugados. Las concentraciones empleadas de los calibradores fueron de 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 ng/ml de IgG, IgA e IgM. La elección de estas condiciones de incubación y de las concentraciones de los calibradores se realizó de acuerdo a que éstas fueron las más frecuentemente reportadas en la literatura para este tipo de ensayo (89,90,94). Las concentraciones evaluadas de los recubrimientos fueron de 1, 3, 5 y 7 μ g/ml. Las diluciones ensayadas de los

conjugados anti-IgG y anti-IgM fueron de 1:500, 1:1000, 1:3000, 1:5000 y 1:7000, y para el anti-IgA de 1:500, 1:1000, 1:3000 y 1:5000.

La selección de la concentración de los recubrimientos y de las diluciones de los conjugados se realizó teniendo en cuenta la combinación de estos que mostrara el valor mayor de la K de discriminación y el mejor coeficiente de correlación (r). El valor de K se calculó dividiendo el valor de densidad óptica del control débil positivo, con aglutinación de 1+ en la PAD, entre el valor de densidad óptica del control normal.

Ajuste del tiempo de incubación de la muestra y de los conjugados:

En este paso se utilizó la mejor combinación de la concentración del recubrimiento y de las diluciones de los conjugados seleccionados anteriormente. Se evaluó a temperatura de 37°C los tiempos de incubación para la muestra de 30, 60 y 90 minutos y de 15, 30 y 60 minutos para los conjugados. Las condiciones de tiempos de incubación óptimos se seleccionaron teniendo en cuenta la K de discriminación y el coeficiente de correlación como se explicó previamente.

3.3.3 Evaluación del efecto de la hemoglobina y del éter contenido en los eluatos en la cuantificación de Igs por el ELISA.

Para este ensayo se obtuvo hemoglobina a partir de hematíes humanos de la siguiente forma:

Se colectaron 6 ml del paquete de hematíes de una mezcla de 10 donantes de sangre del grupo sanguíneo O positivo. La muestra se dispensó en volúmenes de 1 ml en tubos de centrifuga. Los hematíes se lavaron 10 veces con SSBF y se les añadió 1 ml de solución hipotónica de lisado 5 M de fosfato de sodio pH 7.4. Posteriormente, se incubó 10 minutos a 37°C, se colectó la hemoglobina libre por centrifugación a 370 g durante 30 minutos y se desechó la capa de estroma. La hemoglobina fue dializada contra 20 volúmenes de SSBF durante 16 horas.

Las diferentes concentraciones de la curva de calibración de IgG, IgA e IgM humanas se prepararon a partir de un suero humano de referencia (Nor-Partigen, Behring) y se utilizó para su dilución la solución de hemoglobina. A cada una de las concentraciones se le añadió igual volumen de éter y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se retiró la capa de éter y se evaporó a 37°C. A cada muestra se le añadió albúmina bovina al 0.4% y Tween 20 al 0.05%. Como blanco de este ensayo se usó una muestra de la solución de hemoglobina tratada con éter sin la adición de Igs. Los pasos siguientes se realizaron acorde a los parámetros funcionales del ensayo explicados anteriormente.

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se compararon las pendientes y las elevaciones de las curvas preparadas en la solución de hemoglobina y tratadas con éter con la curva en la que se utilizó como diluyente la SSBF-T-A. La comparación se realizó por la t de Student para comparar dos pendientes y dos elevaciones. Se consideró significativo una $p < 0.05$.

Por otra parte y con el objetivo de conocer si era posible que la hemoglobina se adsorbiera a la fase sólida y produjera una señal inespecífica, se añadió en triplicado 100 ni de la solución de hemoglobina no diluida y de las diluciones 1:5, 1:10, 1:100 y 1:500 en SBTF-Tw-A en pocillos sin recubrir incubándolos en iguales condiciones que las muestras.

3.3.4 Parámetros de validación.

Evaluación de la linealidad de la curva estándar:

Con el objetivo de conocer el intervalo de concentración en el cual el ensayo era lineal, se estudiaron 10 replicas de diferentes concentraciones del patrón de IgG, IgA e IgM humano (Norpartigen, Behring). Se realizó una dilución inicial ajustada a 0.1 $\mu\text{g/ml}$ a partir de la cual se prepararon las concentraciones 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de IgG, IgA e IgM. Con los resultados obtenidos se seleccionó el ensayo de regresión que mostrara un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.98$ y de correlación $r \geq 0.99$. Una vez seleccionado el intervalo en que el ensayo tenía utilidad analítica se procedió a evaluar la linealidad tomando los 5 primeros y últimos puntos de la curva de calibración por separados. Este procedimiento se llevó a cabo con el propósito de explorar si la curva era igualmente lineal en todo su intervalo analítico.

Precisión:

Para evaluar la repetibilidad (imprecisión intraensayo) se emplearon tres eluatos obtenidos a partir de hematíes de pacientes con AHAI con autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgA e IgM que mostraron diferentes puntuaciones de la aglutinación en la PAD y dos eluatos de donantes de sangre (controles normales), así como también un suero de concentración conocida (Immunotrol, Bio-Merieux) que se ajustó a una concentración de 0.052 $\mu\text{g/ml}$ de IgG, IgA o IgM. De cada muestra se montaron 10 réplicas. Para evaluar la reproducibilidad (imprecisión interensayo) se tomaron las mismas muestras anteriores y se montaron por duplicado durante 20 días consecutivos. Se calculó la X, la DE y el coeficiente de variación (CV). Se utilizó como criterio un CV menor del 10% en la repetibilidad y menor del 20% en la reproducibilidad (111).

Exactitud:

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

La exactitud se estudió a través de un ensayo de recuperación y de paralelismo. Recuperación: A 6 muestras libres de analito se le añadieron cantidades conocidas de IgG, IgA e IgM humana (Immunotrol, Bio-Merieux) para obtener concentraciones de IgG de 0.006, 0.025, 0.035, 0.045, 0.055 y 0.065 µg/ml, de IgA de 0.005, 0.011, 0.023, 0.047, 0.055 y 0.061ng/ml y de IgM de 0.012, 0.018, 0.037, 0.045, 0.055 y 0.068 µg/ml. Se calculó el porcentaje de recuperación a partir del valor de la concentración obtenida y el valor esperado ($[\text{valor obtenido} / \text{valor esperado}] \times 100$). El porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 90% y el 110% (100,111).

Paralelismo:

Se seleccionaron tres eluatos de hematíes de pacientes con AHAI con autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgA e IgM y dos eluatos de donantes de sangre. A cada eluato se le realizaron diluciones en SSBF-T-A. La elección de las diluciones se realizó teniendo en cuenta que mostraran densidades ópticas dentro del intervalo analítico del ensayo. Los resultados de las concentraciones de Igs obtenidas en el ELISA de cada una de las diluciones fueron multiplicadas por el factor de dilución de la muestra para verificar que no se afecta el resultado final. Los resultados se interpolaron en un gráfico de dilución de la muestra contra concentraciones de Igs. Las curvas resultantes deben mostrar pendientes con tendencia a un valor cero.

Límite de detección: Se asumió como criterio de límite de detección la concentración de IgG, IgA o IgM correspondiente al valor de densidad óptica de la media (X) del blanco del ensayo, más tres veces su desviación estándar (DE). La media se calculó a partir de 20 réplicas del blanco (SSBF-T-A) (100,111).

Perfil de precisión: Se obtuvo a partir de la realización de 3 ensayos con 10 réplicas para cada punto de la curva. Se calculó el CV de cada una de las concentraciones de la curva (100,111).

Límite de cuantificación: Se asumió como criterio de límite de cuantificación el número de moléculas de Igs que correspondió a la mínima concentración de la curva estándar medible con buena precisión y exactitud (100,111).

3.3.5 **Cuantificación de IgG, IgA e IgM en los hematíes de individuos sanos y de pacientes con AHAI.**

Se cuantificó el número de moléculas de IgG, IgA e IgM por hematíes en el eluato de 200 donantes de sangre con PAD negativa, 60 pacientes con AHAI y PAD positiva y en dos pacientes con AHAI y PAD negativa. En 39 casos la AHAI se consideró idiopática y en el resto estuvo asociada a lupus eritematoso sistémico (4 pacientes), infecciones respiratorias

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

(4 pacientes), leucemia linfocítica crónica (4 pacientes), tratamiento con metildopa (3 pacientes), hepatitis crónica activa (3 pacientes), mieloma múltiple (2 pacientes), leucemia linfocítica aguda (2 pacientes) y linfoma no Hodgkin (un paciente). El rango de edad de los pacientes fue de 1-84 años (mediana: 45 años); 41 del sexo femenino y 21 del masculino. Todos los pacientes con PAD positiva presentaron autoanticuerpos de la clase IgG acompañados en 11 y 6 pacientes de autoanticuerpos de los isotipos IgA e IgM, respectivamente.

Los eluatos de los donantes se utilizaron sin diluir o diluidos 1:5 mientras que los de los pacientes fueron investigados en diluciones seriadas en SSBF-T-A para asegurar que las densidades ópticas obtenidas estuvieran en el intervalo analítico del ensayo.

Cálculo del valor de corte del ensayo:

Con los resultados del número de moléculas de IgG, IgA e IgM obtenidos en los donantes de sangre se realizó la distribución de frecuencias mediante el método de Kolmogorov-Smirnov (K-S) utilizando el paquete Statistic 6.1. De comprobarse una distribución normal de los datos. (K-S. $p > 0.05$), se asumió como valor de corte del ensayo la media del número de moléculas de Igs por hematíe más tres desviaciones estándar, con lo que se excluye el 99.7% de la población normal. Cuando el valor de corte del ensayo mostró un valor menor al intervalo superior de número de moléculas de Igs por hematíe obtenido en los donantes de sangre, (ejemplo: valor de corte 49 con intervalo 1-81) se realizaron las siguientes investigaciones adicionales que se describen a continuación.

Los eluatos de los donantes de sangre que mostraron valores de número de moléculas de Igs por hematíe entre el valor de corte y el valor superior de número de moléculas de Igs por hematíe fueron concentrados con polietilenglicol (PEG). En cada caso se utilizaron 10 ml del eluato que fueron dispensados en membrana de diálisis la que fue recubierta con PEG 6000 para concentrar la muestra hasta un volumen de 1 ml (99). La presencia de autoanticuerpos se investigó en técnica de antiglobulina indirecta con los eluatos concentrados (118). Se seleccionó como valor de corte el número de moléculas de Igs por hematíe en los donantes en los que se detectaron los autoanticuerpos de los isotipos investigados con los eluatos concentrados. De no detectarse autoanticuerpos con los eluatos concentrados se seleccionó como valor de corte el número inferior de moléculas de Igs por hematíe obtenido en los pacientes con AHAI con presencia de autoanticuerpos de los isotipos analizados.

Correspondencia entre el ELISA y la prueba de antiglobulina directa

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para relacionar los patrones de aglutinación con el número de moléculas de IgG, IgA e IgM obtenido en el ELISA se evaluó la puntuación de la aglutinación en la PAD (3) con el suero monoespecífico anti-IgG en 42 pacientes con autoanticuerpos de la clase IgG y en la totalidad de los casos con autoanticuerpos de las clases IgA e IgM con los sueros antiglobulínicos anti-IgA y anti-IgM. Se estratificaron los valores de aglutinación con el número de moléculas de cada Ig por hematíe obtenidos en el ELISA. La puntuación de la aglutinación se determinó según lo recomendado por la Asociación Americana de Bancos de Sangre como se describe a continuación (3).

Aglutinación	Descripción	Puntuación
4+	Un solo cúmulo grande en un fondo claro	12
3+	Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro	10
2+	Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo	8
1+	Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo	5
+/-	Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos	3
0	Ausencia de aglutinación	0

La evaluación de la especificidad y sensibilidad diagnóstica, así como la eficacia o coincidencia se describirán en 3.4.

3.4 Comparación entre la prueba de antiglobulina directa, la técnica de microplacas y el ELISA en la detección de autoanticuerpos en los hematíes de pacientes con AHAI.

El estudio abarcó una muestra de 117 pacientes con AHAI; 98 adultos (66 femeninos y 32 masculinos) y 19 niños (10 femeninos y 9 masculinos). El rango de edad de los pacientes adultos fue de 20 a 75 años y de 1 a 16 años para los niños. En el 50% de los casos la AHAI se consideró idiopática (8 casos con síndrome de Evans-Fisher) y en el resto estuvo asociada a otras enfermedades: 17 pacientes con hemopatías malignas, 5 con tumores sólidos, 5 con otras enfermedades autoinmunes, 25 con infecciones virales, 4 secundarios al tratamiento con alfa metildopa y 3 asociados con otras entidades.

Para la determinación de la especificidad y la sensibilidad de las técnicas utilizadas se estudiaron 3 pacientes con anemia drepanocítica y 2 con mieloma múltiple. Estos últimos con anemia secundaria a su enfermedad pero sin manifestaciones de hemólisis. Se analizaron además 35 casos con anemia y PAD negativa, de los cuales 10 habían sido diagnosticados como esferocitosis hereditaria, 3 con deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, 2 con hemoglobinuria paroxística nocturna, 2 con púrpura trombocitopénica

trombótica. 16 con anemia por déficit de hierro, y 2 con anemia por déficit de vitamina B₁₂. Ninguno de los pacientes de este grupo había recibido transfusiones de sangre en los últimos tres meses antes del estudio.

Los autoanticuerpos fueron investigados en el eluato por el método del éter en la técnica de microplacas y a través del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de Igs referido anteriormente. Los valores positivos en el ELISA se determinaron de acuerdo al valor de corte del ensayo descrito en 3.3.5.

3.4.1 Técnica de microplacas (Mp) para la detección de autoanticuerpos eritrocitarios en el eluato de los hematíes (119).

Se sensibilizó una mezcla de hematíes de donantes de sangre de grupo O y de fenotipo Rh, R₁R₁, R₂R₂ y rr, con cada uno de los eluatos de los pacientes de la siguiente forma: En tubos de cristal de 12 x 75 mm se añadieron 10µL de la mezcla de hematíes de donantes y 100µL de los eluatos, los que se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, los hematíes se lavaron tres veces con solución salina al 0,9% y se resuspendieron al 0,5% en solución salina. En microplacas rígidas de 96 pocillos de fondo en V (Greiner) se mezclaron, en el pocillo correspondiente, 25µL de la suspensión de los hematíes sensibilizados con 25µL de las diluciones de los reactivos antiglobulínicos mono-específicos. Los reactivos utilizados fueron: anti-IgG (Dako), anti-IgA y anti-IgM (Behring) en las diluciones 1:20, 1:40 y 1:20, respectivamente, en solución salina balanceada de fosfato 0.15 mol/L, pH 7.2 (SSBF) que contenía suero fetal bovino al 1%. Como controles positivos se utilizaron hematíes sensibilizados con anticuerpos anti-D de los isotipos IgG, IgA y anticuerpos anti-Le^a de la clase IgM y como control negativo hematíes del grupo O no sensibilizados. La placa se incubó 12 horas a 4°C y la lectura se realizó después de inclinarla en un ángulo de 45° durante 10 minutos. Se consideró un resultado positivo la presencia de un botón de hematíes en el fondo del pozo y como negativo el corrimiento de los hematíes hasta los bordes externos del pozo.

La presencia de autoanticuerpos en los pacientes con AHAI que mostraron resultados negativos en esta técnica se investigó en la PAI con los eluatos concentrado en PEG como se describió en 3.3.5.

Se utilizó la prueba Chi-cuadrado (χ^2) para la comparación entre la PAD, la Mp y el ELISA en la detección de autoanticuerpos en los hematíes. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Se determinó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de las técnicas empleadas en la detección de inmunoglobulinas en los

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

hematíes en comparación con el diagnóstico clínico de AHAI (100). Se consideraron como verdaderos positivos la detección de autoanticuerpos eritrocitarios por cada una de las técnicas en los pacientes con diagnóstico de AHAI y como verdaderos negativos la ausencia de autoanticuerpos en estas técnicas en los pacientes con otras enfermedades hematológicas sin AHAI. Para el análisis se aplicó el procedimiento siguiente:

Técnica	Pacientes		Total
	Con AHAI	Sin AHAI	
Resultado positivo	Verdadero + (a)	Falso + (b)	a + b
Resultado negativo	Falso - (c)	Verdadero - (d)	c + d
Total	a + c	b + d	N

Donde la sensibilidad (S) = $a / (a+c)$, la especificidad (E) = $d / (b+d)$, el valor predictivo positivo (vpp) = $a / (a+b)$ y el valor predictivo negativo (vpn) = $d / (c+d)$. Los resultados se multiplicaron por 100 para expresarlos en porcentaje.

La eficacia o coincidencia se determinó como $[(a+d) / N] \times 100$ (111).

3.5 Cuantificación de autoanticuerpos en los hematíes de pacientes con AHAI y prueba de Coombs negativa.

Se seleccionaron para el estudio 18 pacientes; 15 adultos (10 femeninos y 5 masculinos) y 3 niños (1 femenino y 2 masculinos) con anemia hemolítica de etiología desconocida y con sospecha de etiología inmune donde se observó un incremento de las cifras de hemoglobina y una disminución de los reticulocitos después del tratamiento con prednisona. El rango de edad de los pacientes adultos fue de 21 a 67 años y de 2 a 6 años en los niños. En 12 pacientes (67%) la anemia hemolítica se consideró idiopática y en el resto estuvo asociada con otras enfermedades como: 2 pacientes con hepatitis B, 2 con linfoma no-hodgkiniano, 1 con neutropenia autoinmune y uno con síndrome mielodisplásico.

Todos los casos habían mostrado resultados negativos en la PAD con los sueros antiglobulínicos poliespecífico y monoespecíficos donde se habían descartado a su vez las hemoglobinopatías y las enzimatopatías por las técnicas habituales.

A las muestras de sangre venosa se les realizó la detección de autoanticuerpos en el eluato en la técnica de microplacas (Mp) y en el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de inmunoglobulinas en los hematíes. Estos procedimientos se realizaron de acuerdo a lo referido en 3.3 y 3.4.1.

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinó también la presencia de autoanticuerpos en los hematíes en la técnica manual de polibreno directa (TPD) como se describe a continuación:

En un tubo de cristal de 13 x 100 mm se añadió una gota de la suspensión al 3% en solución salina 0.9% de los hematíes del paciente, 2 gotas de suero autólogo y 1 ml del medio de baja fuerza iónica de dextrosa-EDTA. La mezcla se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después se añadieron 2 gotas de una solución al 0.05% en solución salina al 0.9% de polibreno (Sigma) y se incubó durante 30 segundos. Posteriormente se centrifugó a 150 g durante 30 segundos y se decantó el sobrenadante. La primera lectura de la aglutinación se realizó después de añadir 2 gotas de la solución de resuspensión de citrato- dextrosa. Posteriormente se añadieron 2 gotas adicionales de la solución de resuspensión y se realizaron 3 lavados de los hematíes con solución salina para la lectura en la fase de antiglobulina con el uso del suero antiglobulínico anti-IgG (86).

A todos los pacientes se les realizó la cuantificación sérica de IgG, IgA e IgM por la técnica de inmunodifusión radial simple (120).

3.6 Relación entre la hemolisis y la presencia y cuantificación de inmunoglobulinas en los hematíes de los pacientes con AHAI.

El estudio se realizó en una muestra de 135 pacientes con AHAI; 111 adultos (76 femeninos y 35 masculinos) y 24 niños (13 femeninos y 11 masculinos). El rango de edad de los adultos fue de 20 a 88 años y de 1 a 16 años para los niños. En 70 (51.8%) casos la AHAI se consideró idiopática (8 casos con síndrome de Evans-Fisher) y en el resto estuvo asociada a otras enfermedades como: 20 pacientes con hemopatías malignas, 5 con tumores sólidos, 6 con otras enfermedades autoinmunes, 27 con infecciones virales, 4 secundarios al tratamiento con alfa metildopa y en 3 asociado con otras entidades. El patrón de inmunoproteínas presentes en los eritrocitos y el número de moléculas de Igs por hematíe se determinó en el ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de Igs en el eluato que se ha referido previamente en 3.3.

En 51 pacientes con autoanticuerpos de la clase IgG se investigó además las subclases presentes en los eluatos en la técnica de microplacas descrita en 3.4.1 y que se resume a continuación:

Se sensibilizó una mezcla de hematíes de donantes de sangre de grupo O con cada uno de los eluatos de los hematíes de los pacientes los cuales se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, los hematíes se lavaron tres veces con solución salina al 0,9% y se resuspendieron al 0,5% en solución salina. En microplacas fondo en V (Greiner) se

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

mezclaron, en el pocillo correspondiente 25 μ L de la suspensión de los hematíes sensibilizados con 25 μ L de la dilución 1:20 en solución salina balanceada de fosfato 0.15 mol/L de pH 7.2 (SSBF) que contenía suero fetal bovino al 1%, de los reactivos anti-IgG1, - IgG2, -IgG3 y anti-IgG4 (CLB, Amsterdam). Como controles positivos se utilizaron hematíes sensibilizados con anticuerpos monoclonales anti-D(IgG) de las cuatro subclases y como control negativo hematíes del grupo O no sensibilizados. La placa se incubó 12 horas a 4°C y la lectura se realizó después de inclinarla en un ángulo de 45° durante 10 minutos. Se consideró un resultado positivo la presencia de un botón de hematíes en el fondo del pocillo y como negativo el corrimiento de los hematíes hasta los bordes externos del mismo.

A todos los pacientes se les determinó las valores de haptoglobina plasmática estimada por su capacidad de unión a la hemoglobina y su posterior separación por filtración en gel (Sephadex G-100, Pharmacia) (118) Los valores normales de haptoglobina plasmática de referencia en nuestro laboratorio oscilan entre 0.4 y 2.4 g/L.

La intensidad de la hemolisis se clasificó según la concentración de hemoglobina (Hb), el conteo de reticulocitos y las cifras de haptoglobina plasmática. Se consideró en el grupo con hemolisis de alto grado a aquellos casos que presentaron cifras de Hb menores de 90 g/L, conteo de reticulocitos superiores al 5% y valores de haptoglobina menores de 0.4g/L, y en el grupo con hemolisis de bajo grado a aquellos casos que presentaron cifras de Hb entre 90 y 105 g/L, conteo de reticulocitos entre el 3 y el 5% y valores normales de haptoglobina plasmática.

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para el análisis de la distribución de los patrones de Igs y de las subclases de IgG en los hematíes de los pacientes de los grupos con hemolisis de alto y bajo grado. La prueba U de Mann-Whitney se empleó para la comparación entre el número de moléculas de Igs/hematíes en los casos estudiados de acuerdo a la intensidad de la hemolisis. Para ambos ensayos se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

3.7 Autoanticuerpos eritrocitarios en pacientes hematológicos tratados con interferón alfa.

Se estudiaron 45 pacientes con enfermedades hematológicas: 32 con leucemia mieloide crónica (LMC) y 13 con otras hemopatías malignas (HM). Todos los pacientes con HM y 20 pacientes con LMC recibían tratamiento con IFNa (natural o recombinante α_2b , CIGB. IMEFA, Cuba) en el momento del estudio. La duración media de tratamiento fue 27 meses (rango 1-96) y la dosis media administrada fue 3 millones 3 veces a la semana.

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio de estos casos, además de las investigaciones inmunohematológicas tradicionales referidas al inicio de este capítulo, se realizó el fenotipo Rh (C, c, D, E, e) y la detección de anticuerpos con eritrocitos tratados con papaína (3).

Se investigó, a su vez y a través de un ensayo inmunoenzimático de antiglobulina directa (EIAD) la presencia en los hematíes de los pacientes de autoanticuerpos IgG no detectables en la PAD. El proceder se realizó según la técnica comunicada previamente con modificaciones (121).

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos de fondo en V (Greiner), a las que se les adicionaron 25 μ L de la suspensión de eritrocitos al 25% previamente lavados tres veces con solución salina y 50 μ L del conjugado anti-IgG (y) humano-fosfatasa alcalina (Sigma). Después de incubar la mezcla 1 hora a 37°C, los hematíes fueron lavados tres veces con solución salina y transferidos a otra placa donde se les adicionó 150 μ L del sustrato (p- nitrofenil -fosfato, Sigma). La reacción se detuvo con 50 μ L de formalina al 10%. Se determinó la densidad óptica a 405 nm en un fotómetro Titertek Multiscan, Flow Lab. Se consideró un resultado como positivo cuando se obtuvo una DO mayor a la media más 3 desviaciones estándar de las DO de los controles normales. Estos se establecieron en cada ensayo a partir de los hematíes de cuatro donantes de sangre sanos procesados en iguales condiciones que los pacientes.

Se utilizó la t pareada para la comparación de las medias de las cifras de hemoglobina y el conteo de reticulocitos de los pacientes con LMC antes y después del tratamiento con IFNa. La probabilidad exacta de Fisher se utilizó para determinar si existía asociación entre la duración del tratamiento con IFN y la presencia o ausencia en los hematíes de IgG y C3 detectados en la PAD o en la reacción positiva en el EIAD. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

3.8 Anemia hemolítica autoinmune inducida por el interferón alfa.

Se estudió una paciente femenina de 20 años de edad con diagnóstico de enfermedad de Hodgkin que se remitió al laboratorio de Inmunohematología como parte de un estudio que incluía la detección de autoanticuerpos eritrocitarios antes y después del tratamiento con IFN alfa. La paciente no tenía antecedentes de transfusiones, embarazos o de AHA.

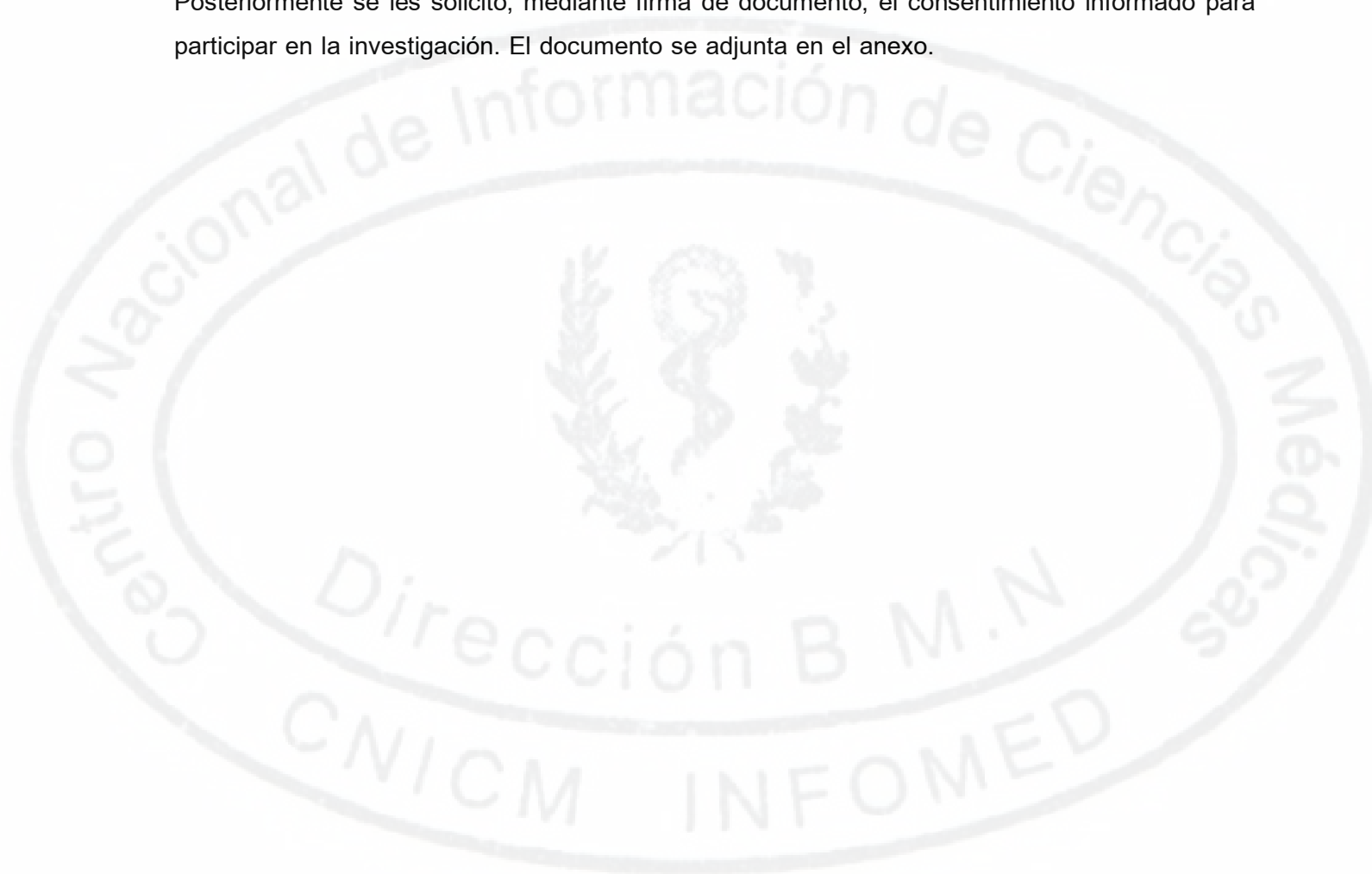
Se realizó un estudio evolutivo desde antes de la administración del fármaco y a las 6 y 10 semanas posteriores de tratamiento con 6×10^6 UI de IFN $\alpha 2b$ recombinante (INREC 3M; CIGB. IMEFA. Cuba), 3 veces a la semana. La investigación se extendió hasta después de

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

descontinuado el tratamiento. En el estudio se realizaron las determinaciones referidas previamente en 3.7.

3.9 Bioética.

A todos los pacientes se les explicó en un lenguaje comprensible la naturaleza del estudio, los riesgos y beneficios de los procedimientos a emplear y la confidencialidad de los resultados. Posteriormente se les solicitó, mediante firma de documento, el consentimiento informado para participar en la investigación. El documento se adjunta en el anexo.



Capítulo IV RESULTADOS

4.1 Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de IgG, IgA e IgM asociada a los hematíes de pacientes con AHAI y de donantes de sangre.

Ajuste de las concentraciones de recubrimiento, de las diluciones del conjugado y del tiempo de incubación de la muestra y del conjugado.

Los valores superiores de K de discriminación y de coeficientes de correlación se obtuvieron con la combinación de la concentración de 5µg/mL de los recubrimientos con la dilución 1:5000 de los conjugados anti-IgG y anti-IgM y de 1:1000 para el anti-IgA (Tablas 1, 2 y 3) (Figuras 1, 2 y 3).

Tabla 1. Valores de la K de discriminación y del coeficiente de correlación (r) para diferentes concentraciones del recubrimiento y diluciones del conjugado en la normalización de un ELISA para la cuantificación de IgG en el eluato de los hematíes.

Dilución del conjugado	Concentración de recubrimiento (µg/ml)							
	1		3		5		7	
	K	r	K	r	K	r	K	r
1:500	1.98	0.965	2.95	0.964	4.05	0.988	3.75	0.988
1:1000	1.97	0.967	2.99	0.968	3.95	0.990	3.82	0.989
1:3000	2.17	0.968	2.92	0.979	4.75	0.992	4.27	0.988
1:5000	2.26	0.963	3.46	0.976	5.11	0.997	4.05	0.988
1:7000	2.08	0.958	3.32	0.975	4.71	0.994	4.75	0.988

Tabla 2. Valores de la K de discriminación y del coeficiente de correlación (r) para diferentes concentraciones de recubrimiento y diluciones del conjugado en la normalización de un ELISA para cuantificar IgA en el eluato de los hematíes.

Dilución del conjugado	Concentración de recubrimiento (µg/ml)							
	1		3		5		7	
	K	r	K	r	K	r	K	r
1:500	7.2	0.985	9.1	0.986	10.4	0.979	10.5	0.984
1:1000	6.4	0.941	8.8	0.979	12.3	0.991	8.9	0.965
1:3000	6.2	0.975	8.5	0.953	11.9	0.987	8.8	0.977
1:5000	5	0.947	8	0.949	11	0.990	8.3	0.973

Capítulo IV. RESULTADOS

Tabla 3. Valores de la K de discriminación y del coeficiente de correlación (r) para diferentes concentraciones del recubrimiento y diluciones del conjugado en la normalización de un ELISA para la cuantificación de IgM en el eluato de los hematíes.

Dilución del conjugado	Concentración de recubrimiento ($\mu\text{g/ml}$)							
	1		3		5		7	
	K	r	K	r	K	r	K	r
1:500	15.4	0.955	15.5	0.973	16.2	0.950	13.6	0.956
1:1000	16.1	0.939	16.4	0.980	16.8	0.981	15.1	0.935
1:3000	18.2	0.943	17.2	0.988	17.2	0.993	16.2	0.970
1:5000	18.2	0.971	18.6	0.976	19.1	0.996	17.2	0.988
1:7000	17.2	0.969	18.5	0.989	18.9	0.967	13.1	0.953

Los mejores resultados con respecto a los tiempos de incubación de la muestra y de los conjugados fueron de 60 minutos para la muestra y de 30 minutos para los conjugados (Tablas 4, 5 y 6) (Figura 4).

Tabla 4. Valores de la K de discriminación y del coeficiente de correlación (r) para diferentes tiempos de incubación de la muestra y del conjugado en la normalización de un ELISA para la cuantificación de IgG en el eluato de los hematíes.

Tiempos de incubación del conjugado (minutos)	Tiempos de incubación de las muestras (minutos)					
	30		60		90	
	K	r	K	r	K	r
15	1.98	0.914	2.95	0.966	3.98	0.990
30	2.17	0.960	5.07	0.997	4.86	0.996
60	2.26	0.950	4.46	0.988	4.36	0.996

Capítulo IV. RESULTADOS

Tabla 5. Valores de la K de discriminación y del coeficiente de correlación (r) para diferentes tiempos de incubación de la muestra y del conjugado en la normalización de un ELISA para cuantificar IgA en el eluato de los hematíes.

Tiempos de incubación del conjugado (minutos)	Tiempos de incubación de las muestras (minutos)					
	30		60		90	
	K	r	K	r	K	r
15	5.0	0.914	12.0	0.986	12.2	0.986
30	6.1	0.960	12.9	0.995	12.7	0.991
60	5.9	0.950	12.4	0.991	12.3	0.988

Tabla 6. Valores de la K de discriminación y del coeficiente de correlación (r) para diferentes tiempos de incubación de la muestra y del conjugado en la normalización de un ELISA para cuantificar IgM en el eluato de los hematíes.

Tiempos de incubación del conjugado (minutos)	Tiempos de incubación de las muestras (minutos)					
	30		60		90	
	K	r	K	r	K	r
15	15.8	0.950	18.2	0.981	16.2	0.977
30	16.4	0.978	20.0	0.993	19.0	0.990
60	18.2	0.981	17.5	0.983	16.4	0.978

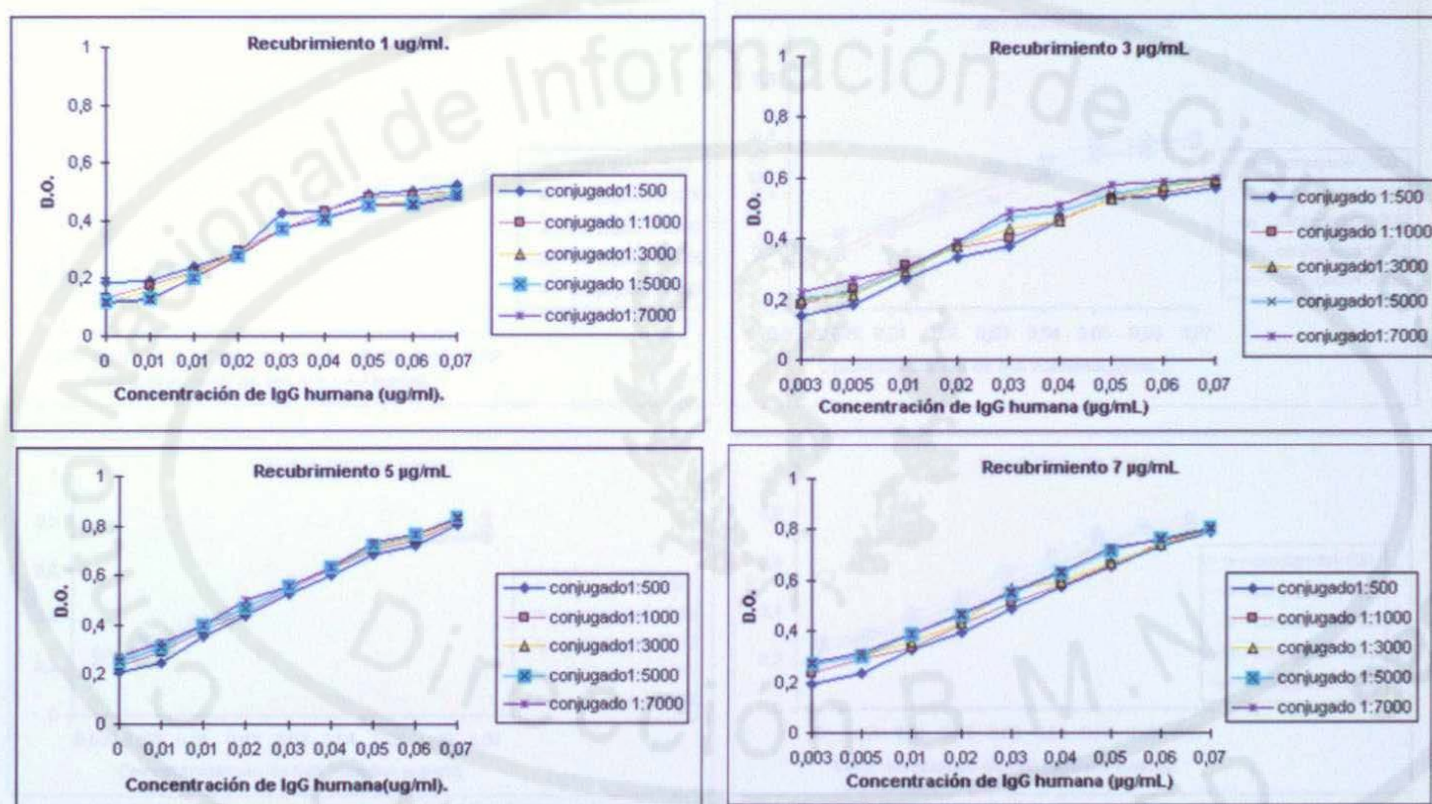


Figura 1. Ajuste de la concentración óptima de recubrimiento y de la dilución del conjugado en un ELISA para cuantificar IgG en el eluato de los hematíes.

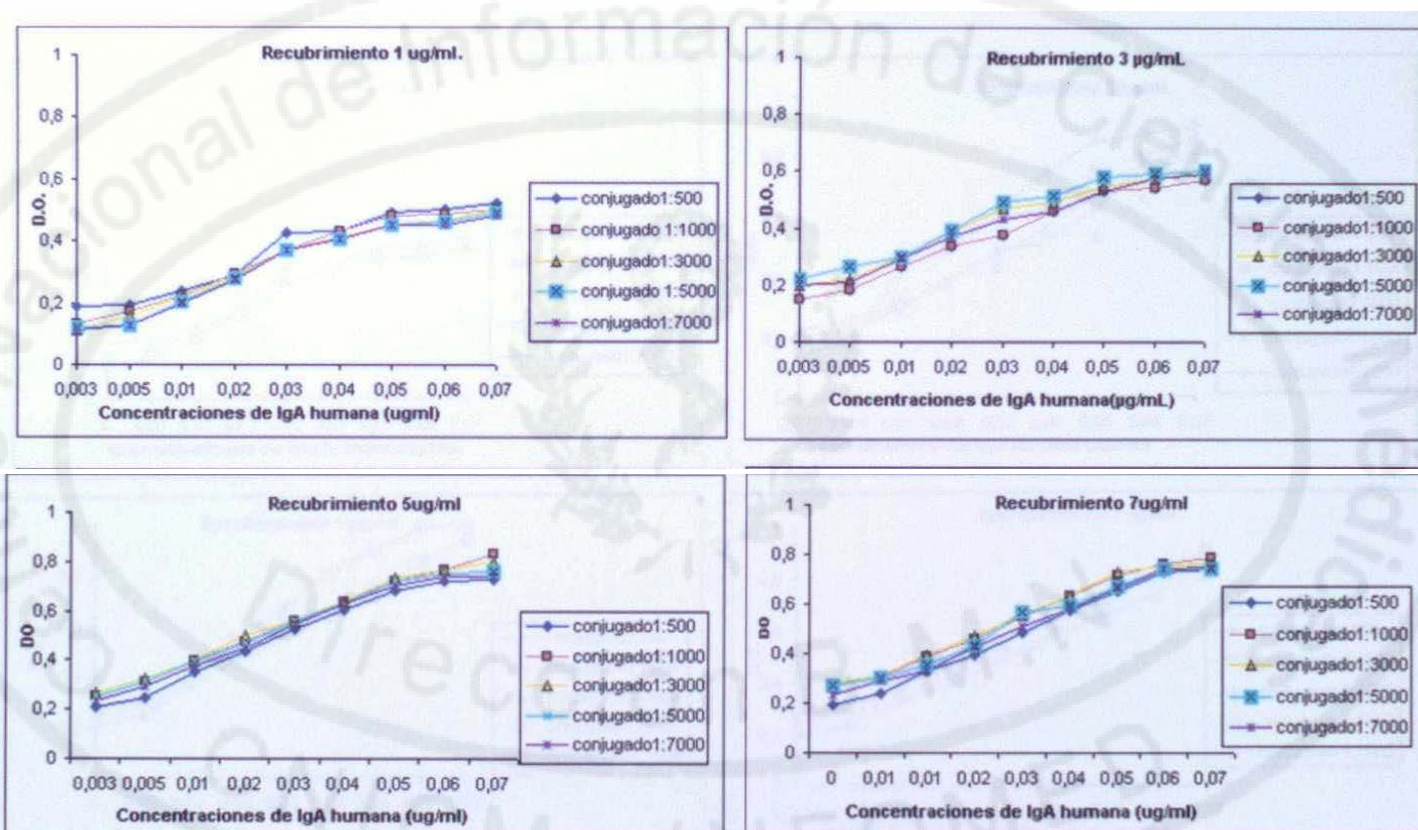


Figura 2. Ajuste de la concentración óptima de recubrimiento y de la dilución del conjugado en un ELISA para cuantificar IgA en el eluato de los hematies.

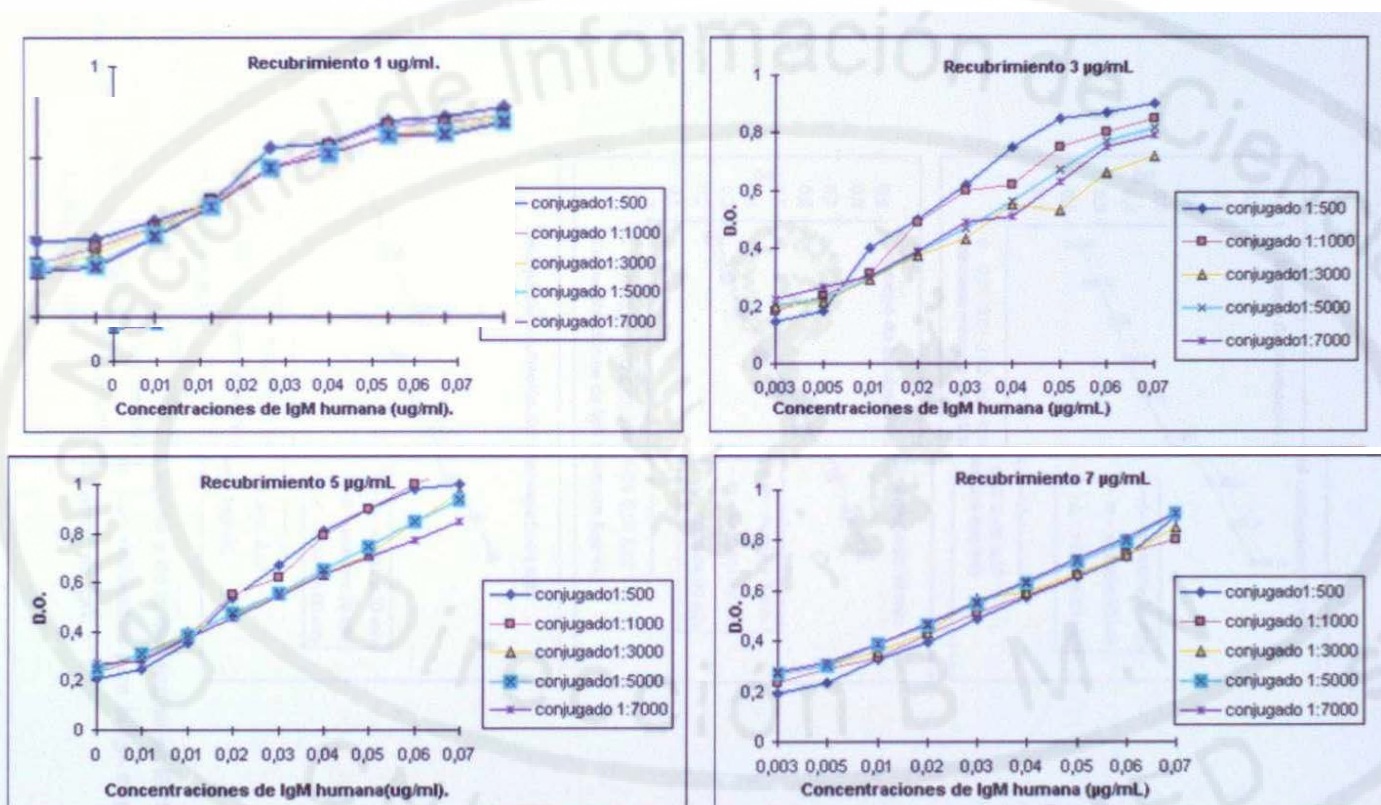


Figura 3. Ajuste de la concentración óptima de recubrimiento y de la dilución del conjugado en un ELISA para cuantificar IgM en el eluato de los hematíes.

Capítulo IV. RESULTADOS

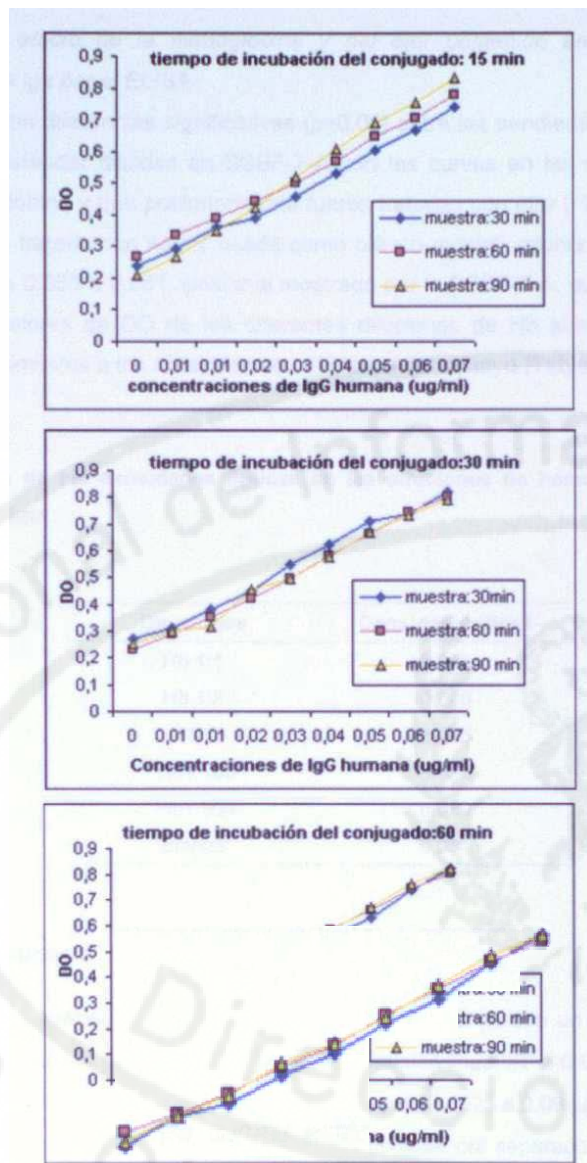


Figura 4. Ajuste del tiempo de incubación del conjugado y de la muestra en un ELISA para la cuantificación de IgG en el eluato de los hematíes. Los resultados para la IgA e IgM fueron similares a los obtenidos en el ELISA para la cuantificación de IgG.

Evaluación del efecto de la hemoglobina y del éter contenido en los eluatos en la cuantificación de Igs por el ELISA.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las pendientes y las elevaciones de las curvas estándar diluidas en SSBF-T-A con las curvas en las que se utilizó como matriz la hemoglobina y que posteriormente fueron tratadas con éter (Figura 5). La solución de hemoglobina tratada con éter y usada como blanco mostró valores de densidad óptica en rangos desde 0.053 a 0.061, similar al mostrado por la SSBF-T-A, que fue de 0.051. Por otra parte los valores de DO de las diferentes diluciones de Hb añadidas a pocillos sin recubrir fueron similares a los obtenidos con el blanco del ensayo (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de las densidades ópticas de las diluciones de hemoglobina añadidas a pocillos sin recubrir

Diluciones	Densidad ópticas
Hb 1:1	0.061
Hb 1:5	0.060
Hb1:10	0.055
Hb1:100	0.053
Hb1:500	0.050
Blanco	0.051

Parámetros de validación.

Evaluación de la linealidad de las curvas estándar: El ensayo mostró un mejor coeficiente de determinación estimado a través de un modelo de regresión lineal ($R^2 \geq 0.98$) en un intervalo de concentraciones de 0.0025 a 0.07 $\mu\text{g/ml}$ de IgG e IgM y de 0.0025 a 0.06 $\mu\text{g/ml}$ de IgA (figura 6). No se observaron variaciones en estos resultados al evaluar por separado las cinco primeras y últimas concentraciones de las curvas estándar. Al incluir concentraciones superiores de Igs que las expuestas anteriormente se observó una disminución a 0.98 del coeficiente de determinación (Tablas 8, 9, 10).

Capítulo IV. RESULTADOS

Tabla 8. Valores del coeficiente de determinación (R^2) en diferentes intervalos de la curva de calibración correspondientes a la validación de un ELISA para cuantificar IgG en el eluato de los hematíes.

Intervalo ($\mu\text{g/ml}$)	R^2
0.0025-0.1	0.996
0.0025-0.07	0.999
0.0025-0.03	0.996
0.03-0.07	0.999
0.0025-0.1	0.986

Tabla 9. Valores de los coeficientes de determinación (R^2) en diferentes intervalos de la curva de calibración correspondientes a la validación de un ELISA para cuantificar IgA en el eluato de los hematíes.

Intervalo ($\mu\text{g/ml}$)	R^2
0.0025-0.1	0.995
0.0025-0.06	0.998
0.0025-0.03	0.996
0.03-0.06	0.999
0.0025-0.1	0.985

Tabla 10. Valores de los coeficientes de determinación (R^2) en diferentes intervalos de la curva de calibración correspondientes a la validación de un ELISA para cuantificar IgM en el eluato de los hematíes.

Intervalo ($\mu\text{g/ml}$)	R^2
00.0025-0.1	0.997
0.0025-0.07	0.991
0.0025-0.03	0.996
0.03-0.07	0.999
0.0025-0.1	0.980

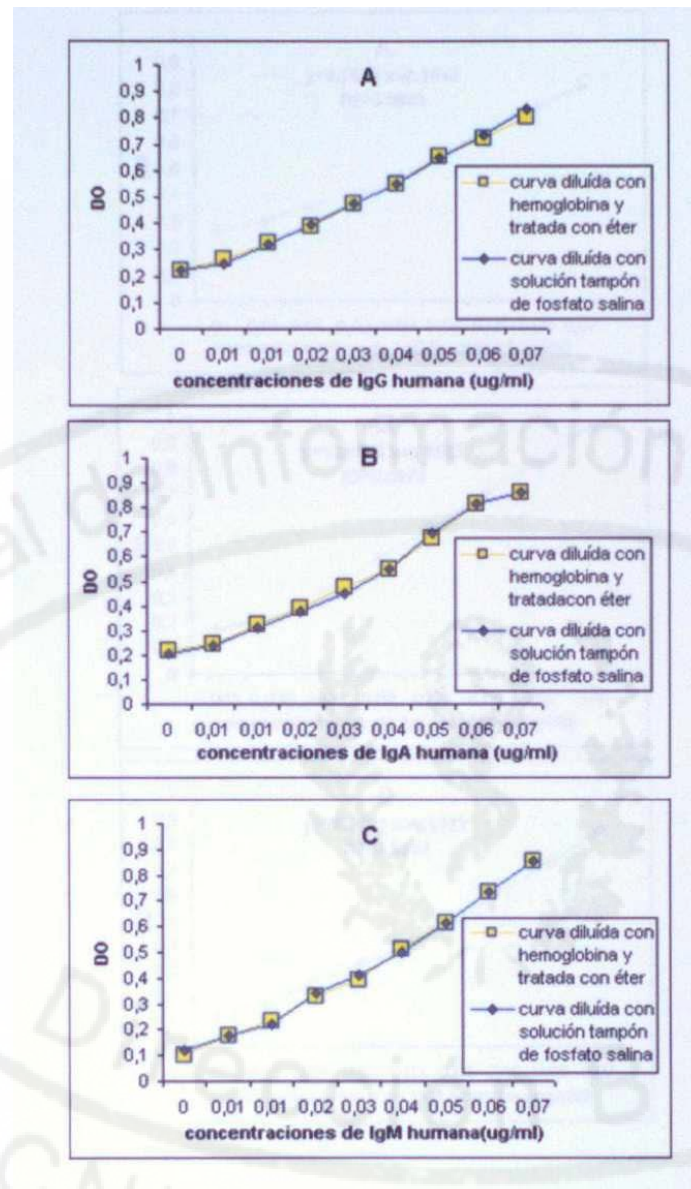


Figura 5. Curva de cuantificación de IgG (A), IgA (B) e IgM (C) con los estándares diluidos en solución de fosfato salina y con una solución de hemoglobina con tratamiento posterior con éter.

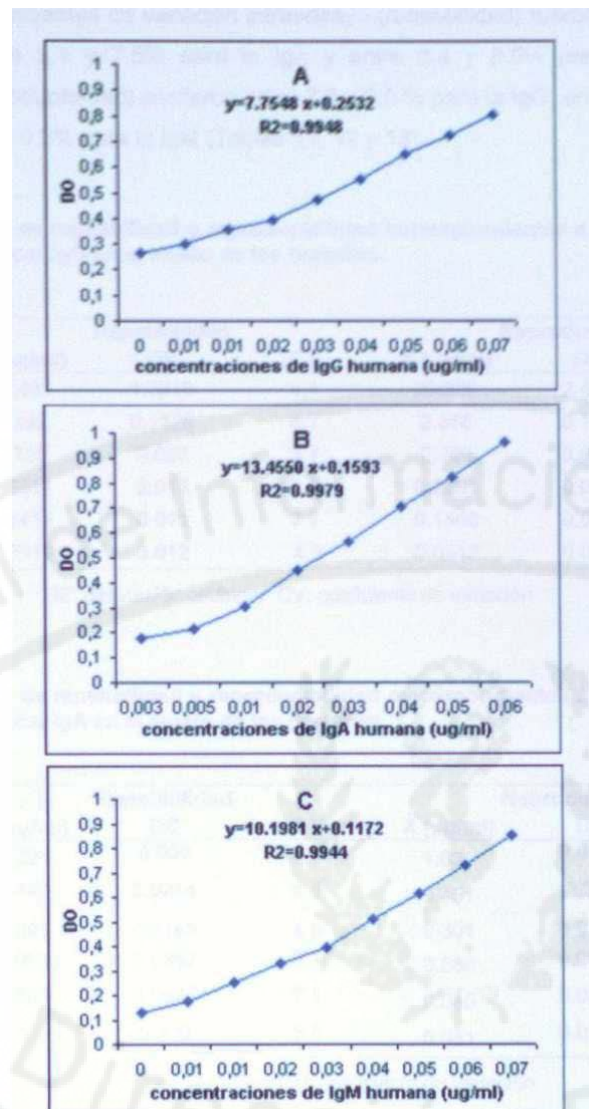


Figura 6. Curvas de calibración del ELISA para la cuantificación de IgG (A), IgA (B) e IgM (C) en el eluato de los hematíes.

Capítulo IV. RESULTADOS

Precisión: Los coeficientes de variación intraensayo (repetibilidad) fueron entre 3.7 y 7.7 % para la IgG, entre 3.1 y 7.5% para la IgA y entre 3.4 y 8.0% para la IgM. Los de interensayos (reproducibilidad) oscilaron entre 7.3 y 9.5 % para la IgG, entre 5.5 y 9.2% para la IgA y entre 5.2 y 9.3% para la IgM (Tablas 11, 12 y 13).

Tabla 11. Estudios de repetibilidad y reproducibilidad correspondientes a la validación de un ELISA para cuantificar IgG en el eluato de los hematíes.

Controles	X (ug/ml)	Repetibilidad DE	C.V	X (ug/ml)	Reproducibilidad DE	C.V
4+	29.461	1.3013	4.4	29.336	2.405	8.1
2+	2.392	0.1126	4.7	2.368	0.173	7.3
1 +	0.719	0.027	3.7	0.706	0.061	8.4
C normal 1	0.2311	0.013	5.6	0.2301	0.019	8.2
C normal 2	0.1412	0.011	7.7	0.1466	0.014	9.5
Immunotrol	0.0519	0.012	4.3	0.0512	0.009	5.6

X: media aritmética DE: desviación estándar CV: coeficiente de variación

Tabla 12. Estudios de repetibilidad y reproducibilidad correspondientes a la validación de un ELISA para cuantificar IgA en el eluato de los hematíes.

Controles	X (µg/ml)	Repetibilidad DE	C.V	X (ug/ml)	Reproducibilidad DE	C.V
3+	1.026	0.009	5.5	1.031	0.0109	6.8
2+	0.446	0.0214	4.8	0.451	0.038	8.4
1 +	0.293	0.0143	4.8	0.301	0.0192	6.5
C normal 1	0.064	0.0002	3.1	0.066	0.0005	7.6
C normal 2	0.049	0.0037	7.5	0.048	0.0044	9.2
Immunotrol	0.052	0.009	5.5	0.051	0.0109	6.8

X: media aritmética DE: desviación estándar CV: coeficiente de variación

Capítulo IV. RESULTADOS

Tabla 13. Estudios de repetibilidad y reproducibilidad correspondientes a la validación de un ELISA para cuantificar IgM en el eluato de los hematíes.

Controles	Repetibilidad			Reproducibilidad		
	X (µg/ml)	DE	C.V	X (µg/ml)	DE	C.V
3+	1.960	0.49	3.4	1.953	0.211	8.0
2+	1.277	0.11	8.6	1.223	0.12	9.3
1 +	0.574	0.022	3.8	0.562	0.032	5.5
C normal 1	0.120	0.015	8.0	0.098	0.010	9.3
C normal 2	0.071	0.016	4.3	0.067	0.009	7.4
Immunotrol	0.052	0.012	4.2	0.051	0.009	5.2

X: media aritmética DE: desviación estándar CV: coeficiente de variación

Exactitud: Los valores de recuperación de los ensayos realizados se encontraron entre el 91 y 106 % para todas las Igs analizadas (Tablas 14, 15 y 16). Las concentraciones estimadas por el ELISA de los controles positivos y negativos en los estudios de paralelismo mostraron curvas con pendientes con tendencia a cero cuando se emplearon diferentes diluciones de los mismos, por lo que la dilución de la muestra no afectó la determinación de la concentración de Igs humanas al hacer la corrección multiplicando por el factor de dilución (figuras 7 y 8).

Tabla 14. Valores de recuperación obtenidos en la validación de un ELISA para cuantificar IgG en el eluato de los hematíes.

Muestras	Valor esperado µg/ml	Valor observado µg/ml	Porcentaje de recuperación
1	0.006	0.006	100
2	0.025	0.026	104
3	0.035	0.036	102
4	0.045	0.043	95
5	0.055	0.051	92
6	0.065	0.060	92

Tabla 15. Valores de recuperación obtenidos en la validación de un ELISA para cuantificar IgA en el eluato de los hematíes.

Muestras	Valor esperado $\mu\text{g/ml}$	Valor observado $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de recuperación
1	0.005	0.005	100
2	0.011	0.012	109
3	0.023	0.022	95
4	0.047	0.045	95
5	0.055	0.058	105
6	0.061	0.059	96

Tabla 16. Valores de recuperación obtenidos en la validación de un ELISA para cuantificar IgM en el eluato de los hematíes.

Muestras	Valor esperado $\mu\text{g/ml}$	Valor observado $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de recuperación
1	0.012	0.011	91
2	0.018	0.019	105
3	0.037	0.038	102
4	0.045	0.048	106
5	0.055	0.051	92
6	0.068	0.065	95

Límite de detección: La concentración mínima diferente de cero que el ensayo es capaz de detectar fue de 0.62 ng/mL de IgG, 1.1 ng/ml de IgA y 6.8 ng/ml de IgM.

Perfil de precisión: Los CV de los puntos de la curvas estándar de IgG, IgA e IgM se encontraron entre el 3.2 y el 9.4 % (Figura 9).

Límite de cuantificación: El límite de cuantificación del ensayo fue de 1 molécula de IgG e IgA y de 0.2 moléculas de IgM por hematíe

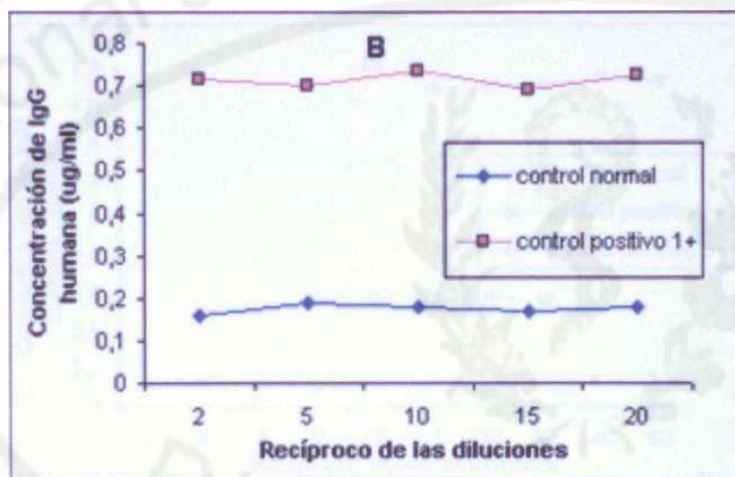
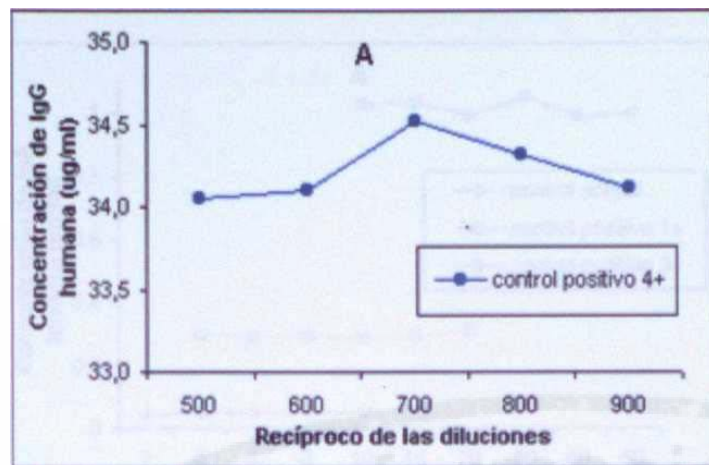


Figura 7. Estudio de paralelismo en los eluatos que mostraron reacción positiva de 4+ (A), 1 + (B) y reacción negativa en la prueba de antiglobulina directa con anti-IgG.

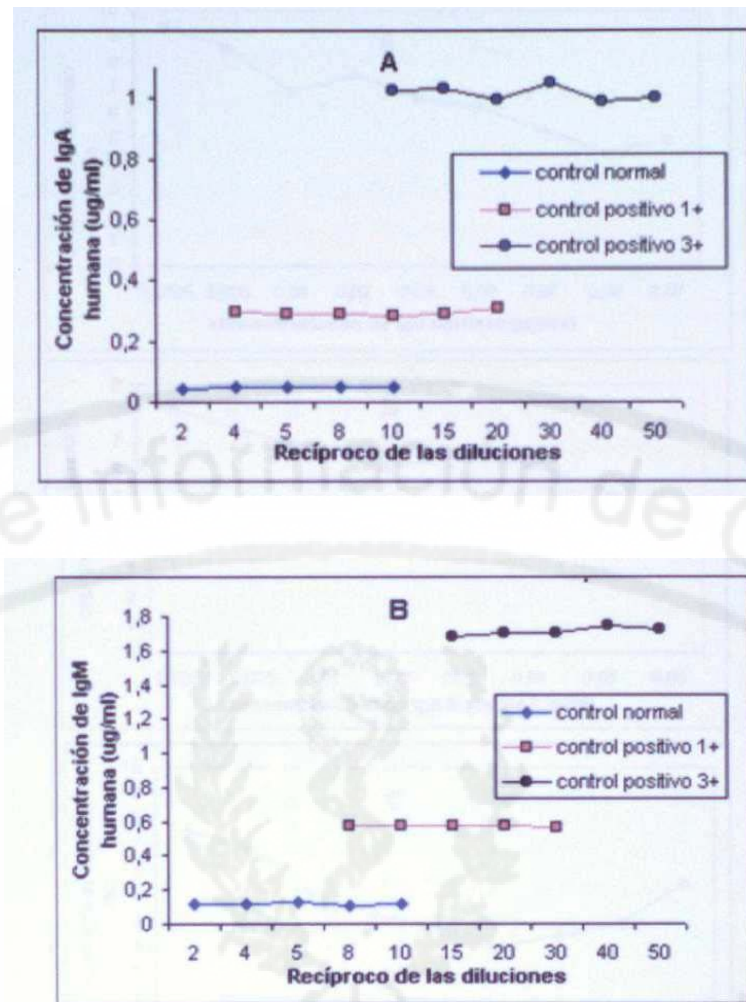


Figura 8. Estudio de paralelismo en los eluatos que mostraron reacción positiva de 3+, 1+ y reacción negativa en la prueba de antiglobulina directa con anti-IgA (A) y anti-IgM (B).

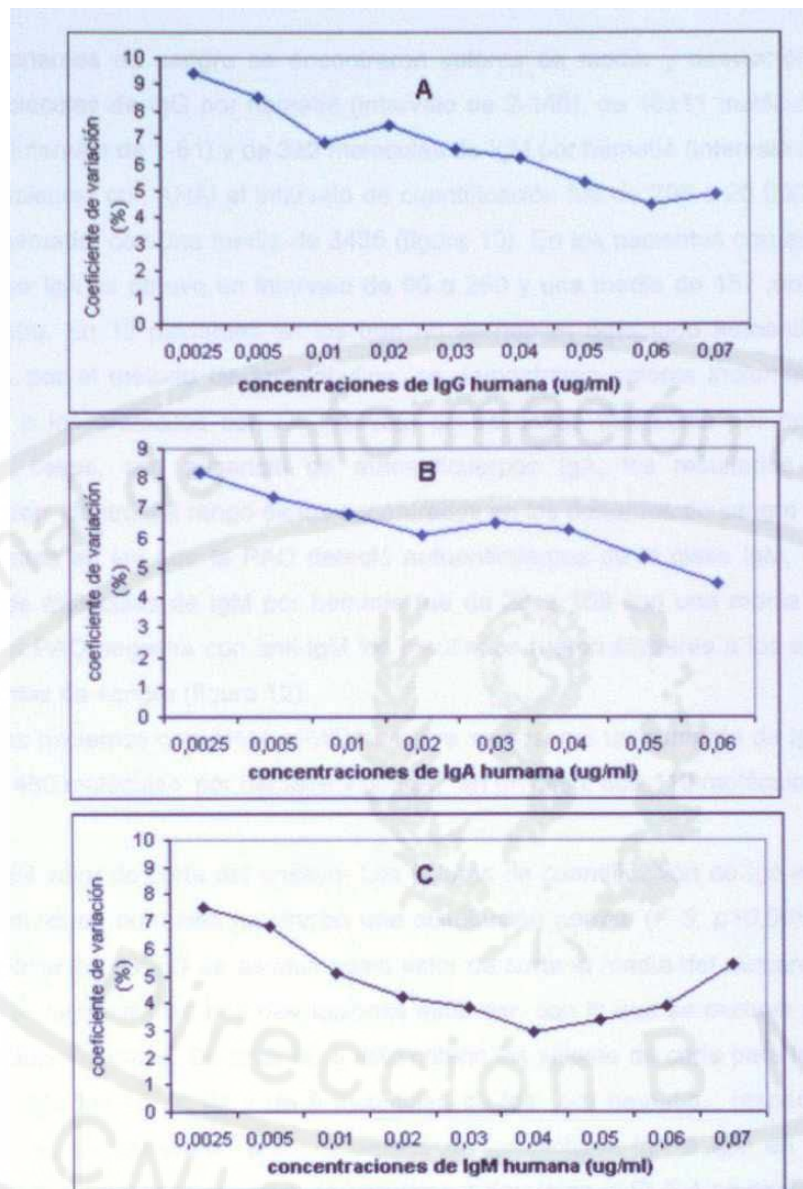


Figura 9. Perfil de precisión de las concentraciones de las curvas estándar para la cuantificación de IgG (A), IgA (B) e IgM (C) en el eluato de los hematíes.

Cuantificación de IgG, IgA e IgM en los hematíes de individuos sanos y de pacientes con AHAI.

En los donantes de sangre se encontraron valores de media y desviación estándar de 58 ± 35 moléculas de IgG por hematíe (intervalo de 2-146), de 16 ± 11 moléculas de IgA por hematíe (intervalo de 1-81) y de 3 ± 2 moléculas de IgM por hematíe (intervalo de 1 a 11).

En los pacientes con AHAI el intervalo de cuantificación fue de 206 a 20 000 moléculas de IgG por hematíe, con una media de 3435 (figura 10). En los pacientes con autoanticuerpos de la clase IgA se obtuvo un intervalo de 90 a 250 y una media de 157 moléculas de IgA por hematíe. En 12 pacientes en los que no se habían detectado autoanticuerpos de la clase IgA por el método de antiglobulina, se demostraron valores incrementados de IgA asociada a los eritrocitos con un intervalo de 94 a 385 moléculas por hematíe. En los restantes casos, con ausencia de autoanticuerpos IgA, los resultados obtenidos se comportaron dentro del rango de los encontrados en los donantes de sangre (figura 11). En los pacientes en los que la PAD detectó autoanticuerpos de la clase IgM, el intervalo de número de moléculas de IgM por hematíe fue de 26 a 109 con una media de 69. En los casos con PAD negativa con anti-IgM los resultados fueron similares a los encontrados en los donantes de sangre (figura 12).

En los dos pacientes con AHAI y PAD negativa se observó un aumento de IgG con valores de 370 y 460 moléculas por hematíe y de IgA, en un caso, con 119 moléculas por hematíe.

Cálculo del valor de corte del ensayo: Los valores de cuantificación de Igs en los hematíes de los individuos normales mostraron una distribución normal ***(K-S, $p > 0.05$)***. En el ensayo de cuantificación de IgG se asumió como valor de corte la media del número de moléculas de IgG por hematíe más tres desviaciones estándar, con lo que se excluye más del 99.7% de la población normal. De acuerdo a este criterio los valores de corte para la cuantificación de IgA e IgM fueron de 49 y de 9 moléculas de Igs por hematíe, respectivamente. Sin embargo, no se detectaron autoanticuerpos de los isotipos IgA e IgM en la PAI con los eluatos concentrados en los donantes de sangre donde en el ELISA se encontraron valores entre el valor de corte y el valor superior de número de moléculas de Igs por hematíe. Por este motivo se seleccionó como valor de corte el número inferior de moléculas de IgA e IgM por hematíe obtenido en los pacientes con AHAI con presencia de autoanticuerpos de estos isotipos revelados en la PAD. De esta forma se consideró, como un resultado positivo un número de moléculas de $IgG \geq 163$, de $IgA \geq 90$ y de $IgM \geq 20$ moléculas.

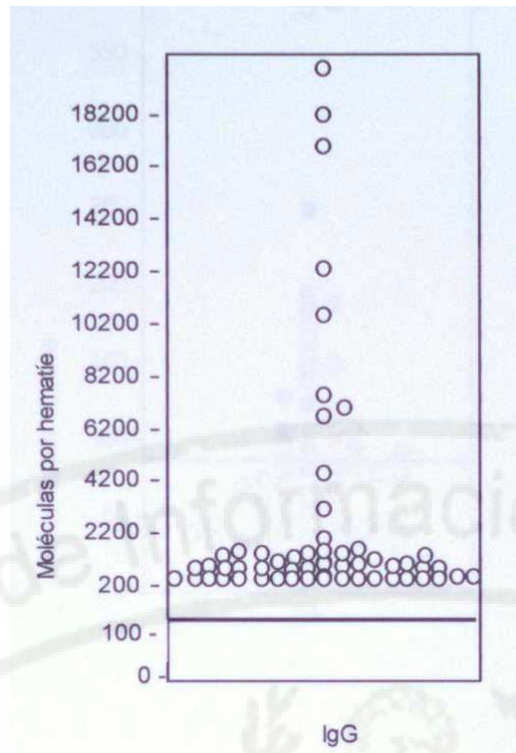


Figura 10. Número de moléculas de IgG por hematíe en los pacientes con anemia hemolítica autoinmune. La línea horizontal en el interior de la figura muestra el rango superior de valores de moléculas de IgG por hematíe obtenido en los donantes de sangre.

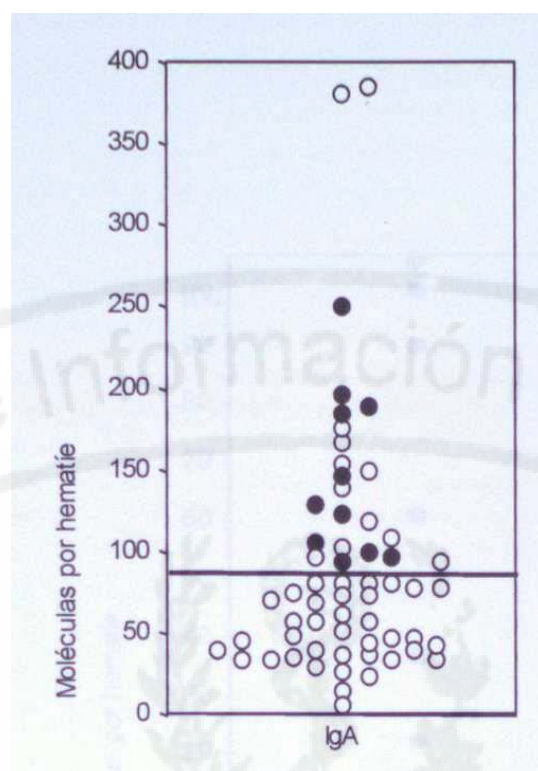


Figura 11. Número de moléculas de IgA por hematíe en los pacientes con anemia hemolítica autoinmune. Los valores superiores al rango normal se observaron en pacientes con autoanticuerpos IgA (•). Se observó un incremento en el número de moléculas de IgA por hematíe en 12 pacientes (O) en los que no se demostraron autoanticuerpos IgA en sus hematíes por las técnicas de aglutinación. La línea horizontal en el interior de la figura muestra el rango superior de valores de moléculas de IgA por hematíe obtenido en los donantes de sangre.

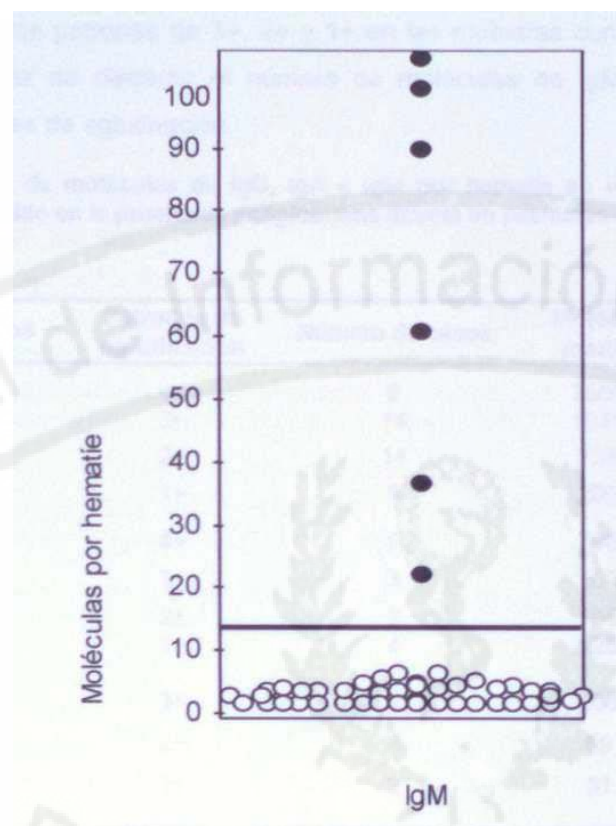


Figura 12. Número de moléculas de IgM por hematíe en los pacientes con anemia hemolítica autoinmune. Los valores superiores al rango normal se observaron en pacientes con autoanticuerpos IgM (•). La línea horizontal en el interior de la figura muestra el rango superior de valores de moléculas de IgM por hematíe obtenidos en los donantes de sangre.

Correspondencia entre el ELISA y la prueba de antiglobulina directa La estratificación de los resultados según el patrón de aglutinación obtenido en la PAD evidenció que el número de moléculas de Igs por hematíe fue mayor a medida que aumentaba la aglutinación (Tabla 17). Los valores superiores de cuantificación de Igs correspondieron con una aglutinación de 4+. Se observó un solapamiento entre los intervalos de número de moléculas de IgG por hematíe en los patrones de aglutinación de 3+ y 2+ y entre los patrones de 3+, 2+ y 1+ en las muestras con autoanticuerpos IgA. El ensayo fue capaz de discernir el número de moléculas de IgM por hematíe entre los diferentes patrones de aglutinación.

Tabla 17. Número de moléculas de IgG, IgA e IgM por hematíe en los diferentes patrones de aglutinación obtenido en la prueba de antiglobulina directa en pacientes con AHAI

Autoanticuerpos	Patrones de aglutinación	Número de casos	Moléculas de Igs/ hematíe media rango	
IgG	4+	9	7550	2115-9000
	3+	14	1041	450-1479
	2+	14	734	404-1137
	1 +	5	206	200-225
IgA	4+	2	796	741-851
	3+	3	200	184-341
	2+	2	165	134-197
	1 +	4	126	90-130
IgM	3+	2	106	103 -109
	2+	3	69	58-84
	1 +	2	31	26-36

Igs: Inmunoglobulinas

4.2 Comparación entre la prueba de antiglobulina directa, la técnica de microplacas y el ELISA en la detección de autoanticuerpos en ios hematíes de los pacientes con AHAI.

Los pacientes fueron clasificados en cinco grupos de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas para la investigación de autoanticuerpos eritrocitarios.

En el 65% de los casos las técnicas de aglutinación (PAD, Mp) y el ELISA detectaron igual patrón similar de inmunoproteínas en los hematíes de los pacientes con AHAI (Tabla 18). En 29 (24,8%) casos de este mismo grupo de pacientes se demostraron otras inmunoglobulinas en las técnicas de Mp y ELISA que no fueron detectadas en la PAD (Tabla 19). Estos procederes, a su

Capítulo IV. RESULTADOS

vez, revelaron la presencia de inmunoglobulinas en los hematíes de 12 (10,2%) pacientes con AHAI en los que la PAD detectó el fragmento C3 del complemento como única inmunoproteína en los hematíes (Tabla 20).

Tabla 18. Pacientes con AHAI en los que las técnicas de aglutinación y el ELISA detectaron similar patrón de inmunoproteínas en los hematíes.

No de Pacientes	Inmunoglobulinas PAD/ Mp / ELISA	Complemento (C3)	Número de moléculas de Igs/hematíe (x)		
			IgG	IgA	IgM
42	IgG	+	2743	48	3
17	IgG	0	1991	52	3
6	IgG, IgM	+	724	60	57
5	IgG, IgA	+	5266	137	3
5	IgG, IgA, IgM	+	1614	326	76
1	IgG, IgA	0	641	102	4

PAD: prueba de antiglobulina directa, Mp: técnica de microplacas
Las áreas sombreadas señalan los resultados positivos en el ELISA

Tabla 19. Pacientes con AHAI en los que las técnicas de aglutinación y el ELISA detectaron diferentes patrones de inmunoproteínas en los hematíes.

No de Pacientes	PAD	Inmunoglobulinas		Complemento (C3)	Número de moléculas de Igs/hematíe (x)		
		Mp	ELISA		IgG	IgA	IgM
13	IgG	IgG	IgG, IgA	+	3341	232	4
7	IgG	IgG	IgG, IgA	0	660	619	3
2	IgG	IgG, IgA	IgG, IgA	0	1830	189	3
2	IgA	IgG, IgA	IgG, IgA	+	3794	156	4
1	IgG	IgG, IgA	IgG, IgA	+	642	189	4
1	IgG	IgG	IgG, IgA, IgM	0	477	334	27
1	IgM	IgG	IgG, IgM	+	256	31	106
1	IgM	IgM	IgA, IgM	+	120	156	67
1	IgA	IgA	IgG, IgA	+	201	98	2

PAD: prueba de antiglobulina directa, Mp: técnica de microplacas
Las áreas sombreadas señalan los resultados positivos en el ELISA

Tabla 20. Pacientes con AHAI en los que la prueba de antiglobulina directa (PAD) detectó sólo complemento en los hematíes.

No de Pacientes	Inmunoglobulinas		IgG	Número de moléculas de Igs/hematíe (x)	
	Mp	ELISA		IgA	IgM
10	IgG	IgG	216	44	3
1	0	IgA	138	832	2
1	0	IgG, IgA	493	216	7

Mp: técnica de microplacas, Las áreas sombreadas señalan los resultados positivos en el ELISA

En los pacientes con anemia drepanocítica y mieloma múltiple el ELISA detectó un incremento de Igs en los hematíes que en algunos casos fue también detectado en la PAD o la Mp (Tabla 21). En los 32 pacientes restantes con anemia de etiología no inmune no se detectaron autoanticuerpos eritrocitarios y se obtuvieron valores de cuantificación de Igs en los hematíes dentro del rango normal (Tabla 22).

Tabla 21. Resultados obtenidos en pacientes con anemia drepanocítica (AD) y con mieloma múltiple (MM).

No de Pacientes	Enfermedad	Inmunoglobulinas			Numero de molécula de Igs/hematíe (x)		
		PAD	Mp	ELISA	IgG	IgA	IgM
1		IgG	IgG	IgG	6929	41	3
1	AD	0	0	IgG	318	30	4
1		0	0	IgG, IgA	785	832	3
1		IgG	0	IgG, IgA	2344	832	2
1	MM	0	0	IgG	1653	77	4

PAD: prueba de antiglobulina directa, Mp: técnica de microplacas
Las áreas sombreadas señalan los resultados positivos en el ELISA

Tabla 22. Número de moléculas de inmunoglobulinas por hematíe estimado por el ELISA en pacientes con anemia de etiología no inmune.

No de Pacientes	Enfermedad	Número de moléculas de Igs/hematíe (x)		
		IgG	IgA	IgM
16	D-Fe	60	22	5
10	EH	80	41	3
3	D-G6PD	72	30	4
2	HPN	56	32	3
2	PTT	36	57	4
2	D-B ₁₂	92	18	3

D-Fe: anemia por deficiencia de hierro, EH: esferocitosis hereditaria

D-G6PD: deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

HPN: hemoglobinuria paroxística nocturna, PTT: púrpura trombocitopénica trombótica

D-B₁₂: deficiencia de vitamina B₁₂

El análisis del total de pacientes con AHAI estudiados reveló que la PAD detectó autoanticuerpos de la clase IgG en el 85,4% de los casos mientras que la técnica de Mp los identificó en el 95,7% ($X^2= 6.071$, $p=0.015$) y el ELISA en el 98.2% ($X^2= 11.2$, $p=0.0008$). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la Mp y el ELISA en la detección de autoanticuerpos de este isotipo ($X^2= 0.58$, $p=0.44$). Por otra parte, el ELISA fue más sensible que la PAD ($X^2= 16.0$, $p=0.000$) y la técnica de Mp ($X^2= 12.1$, $p=0.000$) al detectar autoanticuerpos IgA en el 35% de los pacientes en comparación con el 11 y 14% revelados en la PAD y la Mp, respectivamente. Con las técnicas empleadas se obtuvieron similares resultados en la identificación de autoanticuerpos de la clase IgM ($p>0.05$) (Tabla 23). El ELISA identificó anticuerpos de dos o más isotipos en el 40% de los pacientes mientras que la PAD y la técnica de Mp los detectó en el 14.5 y el 19%, respectivamente.

Tabla 23. Comparación entre las técnicas de aglutinación y ELISA en la detección de las diferentes clases de autoanticuerpos eritrocitarios en pacientes con AHAI.

Clase de Inmunoglobulina	Técnica	No de pacientes	%
IgG	PAD	100	85.4
	Mp	112	95.7
	ELISA	115	98.2
IgA	PAD	14	11.9
	Mp	17	14.5
	ELISA	41	35.0
IgM	PAD	13	11.1
	Mp	12	10.2
	ELISA	14	11.9

PAD: prueba de antiglobulina directa, Mp: técnica de microplaca

Los parámetros de especificidad, sensibilidad y los valores predictivos positivo y negativo de las diferentes técnicas empleadas se muestran en la Tabla 24. La eficacia o coincidencia fue de un 91% para la PAD, de 98% para la Mp y de un 96% para el ELISA.

Tabla 24. Resultados de los parámetros de calidad de las diferentes técnicas empleadas.

Técnica	Sensibilidad	Parámetros de calidad (%)		Vpn
		Especificidad	Vpp	
PAD	89	95	98	76
Mp	98	97	99	95
ELISA	100	87	95	100

PAD: prueba de antiglobulina directa, Mp: técnica de microplaca,
Vpp: Valor predictivo positivo, Vpn: Valor predictivo negativo

4.3 Cuantificación de autoanticuerpos en los hematíes en pacientes con AHAI y prueba de Coombs negativa.

Los 18 pacientes estudiados con AHAI Coombs negativa representaron el 13.3% de los 135 casos de AHAI diagnosticados en el período en que se realizó la investigación.

Los tres procedimientos técnicos empleados detectaron anticuerpos eritrocitarios que no fueron revelados en la PAD. La TPD detectó los anticuerpos en 5 casos (28%), la Mp resultó positiva en 11 pacientes (61%) y el ELISA demostró un aumento del número de moléculas de Igs por eritrocito en todos los pacientes (Tabla 25). Este último ensayo reveló la presencia de anticuerpos de la clase IgG en 17 casos (94,4%), de la clase IgA en 8 pacientes (44,4%) y de la clase IgM en un caso (5,5%) (Tabla 26). En todos los casos se evidenció hemoglobinemia, reticulocitosis e hiperbilirrubinemia.

En 10 pacientes (55,5%) la cuantificación de IgG asociada a los eritrocitos se comportó en un rango de 200 a 460 moléculas por hematíe (casos 1, 3, 6, 9, 10, 11,12,13,15 y 17). En el resto se obtuvieron valores superiores a 900 moléculas de IgG por hematíe (Tabla 26)

Tabla 25. Resultados de las técnicas de aglutinación y el ELISA en la detección de autoanticuerpos eritrocitarios en pacientes con AHAI con prueba de antiglobulina negativa.

Detección de autoanticuerpos	TPD		Técnicas Mp		ELISA	
	No	%	No	%	No	%
Positivo	5	28	11	61	18	100
negativo	13	72	7	39	0	0

TPD: técnica de polibreno directa

Tabla 26. Hallazgos inmunohematológicos en 18 pacientes con AHAI y prueba de antiglobulina directa (Coombs) negativa.

Pacientes	Hb g/L	Ret % I	B-nc μmol/L	Inmunoglobulinas			Moléculas de Igs/hematíe		
				TPD	Mp	ELISA	IgG	IgA	IgM
1	90	6.3	43	IgG	IgG	IgG	250	15	3
2	100	3.6	24	IgG	IgG	IgG, IgA	4132	173	1
3	98	3.6	63	IgG	IgG	IgG	200	50	2
4	68	5.0	28	IgG	IgG	IgG	48356	40	4
5	100	11.0	27	IgG	IgG, IgA	IgG, IgA	15231	133	3
6	78	7.0	33	0	IgG	IgG	254	44	4
7	60	6.8	55	0	IgG	IgG	3192	14	1
8	89	11.0	47	0	IgG	IgG	4500	51	4
9	75	15.0	38	0	IgG	IgG, IgA	267	372	2
10	65	10.0	45	0	IgG	IgG	225	68	2
11	100	6.7	15	0	IgG	IgG, IgA	225	122	2
12	82	11.8	14	0	0	IgG	333	37	3
13	70	5.0	27	0	0	IgG, IgA	460	119	2
14	66	6.2	33	0	0	IgG, IgA	13128	232	3
15	70	7.0	76	0	0	IgG	450	4	6
16	63	3.0	66	0	0	IgG	970	50	6
17	50	15.0	48	0	0	IgG, IgA	375	105	8
18	90	5.0	54	0	0	IgA, IgM	57	170	20

Ret: conteo de reticulocitos, B-nc: bilirubina no conjugada, TPD: técnica de polibreno directa, Mp: técnica de microplacas, **Las áreas sombreadas señalan los resultados positivos en el ELISA**

En todos los pacientes la cuantificación de Igs en el suero se encontró dentro de los valores normales. En los niños se obtuvieron valores de cuantificación sérica de IgG en un rango de 6.13 a 10.24 g/L, de IgA de 0.92 a 2.17g/L y de IgM de 0.3 a 1.10 g/L. En los adultos la cuantificación sérica de IgG se comportó entre 9.65 -15.0 g/L, de IgA entre 2.36 - 4.25g/L y de IgM entre 0.5 - 1.3g/L.

4.4 Relación entre la hemólisis y la presencia y cuantificación de Inmunoglobulinas asociadas a los hematíes de los pacientes con AHAI.

En el 97.8% de los pacientes se detectó IgG en los hematíes. Los autoanticuerpos de la clase IgA se evidenciaron en el 36.3% y los de la clase IgM en el 11.1% de los casos. En un paciente se identificó solo anticuerpos IgA (Tabla 27).

Tabla 27. Patrón de inmunoglobulinas en los hematíes de 135 pacientes con AHAI

Inmunoglobulinas	No de pacientes	%
IgG	78	57.8
IgG, IgA	41	30.4
IgG, IgM	7	5.2
IgG, IgA, IgM	6	4.4
IgA, IgM	2	1.5
IgA	1	0.7
Total	135	100

Los autoanticuerpos de la subclase IgG1 fueron los más frecuentes y se hallaron combinaciones de subclases en 26 pacientes (51.0%), la combinación de IgG1+ IgG3 fue la observada (23.6%). En dos casos la subclase IgG2 fue la única identificada en los hematíes (Tabla 28).

Tabla 28. Frecuencia de las subclases de IgG de los autoanticuerpos en los hematíes de 51 pacientes con AHAI.

Subclases de IgG	No de pacientes	%
Una subclase	25	49.0
IgG1	23	45.1
IgG2	2	3.9
Combinaciones	26	51.0
IgG 1+3	12	23.6
IgG 1+4	7	13.7
IgG 1+2+4	4	7.8
IgG 1+2	2	3.9
IgG 2+3+4	1	2.0
Total	51	100

Los autoanticuerpos IgM en combinación con los de los isotipos IgG, IgA o con ambos, se detectaron solamente en los pacientes con hemólisis de alto grado. El número de moléculas de IgM por hematíe no fue objeto de análisis debido a que todos los casos con autoanticuerpos IgM

Capítulo IV. RESULTADOS

perteneían a este grupo. La presencia en los eritrocitos de IgG e IgA fue más frecuente también en el grupo con hemólisis de alto grado (Tabla 29). El número de moléculas de IgG e IgA por hematíe no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados en los pacientes con este patrón de Igs en los eritrocitos (tabla 30).

Tabla 29. Relación entre el patrón de inmunoglobulinas presentes en los eritrocitos y la hemólisis en pacientes con AHAI.

Clasificación	Patrón de Inmunoglobulinas					
	IgG	%	IgG, IgA	%	IgM *	%
Hemólisis de alto grado	26	33.3	27	65.9	15	100
Hemólisis de bajo grado	52	66.7	14	34.1	0	0.0
Total	78	100	41	100	15	100

* IgM asociada a la IgG, IgA o con ambas. $\chi^2 = 18.31$, $p = 0.0001$

Tabla 30. Número de moléculas de IgG e IgA por hematíe y su relación con la hemólisis en pacientes con AHAI con presencia de estas inmunoglobulinas en los eritrocitos.

Clasificación	No/pacientes	Número de moléculas de IgG/hematíe		Número de moléculas de IgA/hematíe	
		mediana	intervalo	mediana	intervalo
Hemólisis de alto grado	27	795	201- 15231	136	94 - 3348
Hemólisis de bajo grado	14	685	267- 12603	149	90-818
		U=183, p= 0.587		U=186, p= 0.634	

La mayoría de los casos en los que se detectó IgG como única inmunoproteína en los hematíes fueron clasificados dentro del grupo con hemólisis de bajo grado (Tabla 29). Sin embargo, el número de moléculas de IgG por hematíe fue significativamente superior ($p=0.003$) en los pacientes del grupo con hemólisis de alto grado (Tabla 31). No fue posible definir un valor de corte en el número de moléculas de IgG que permita diferenciar a los pacientes por la severidad de la hemólisis debido a la gran superposición de los resultados (figura 13). No se observaron diferencias significativas entre la presencia de IgG3, IgG1 o de dos o más subclases en los eritrocitos de los pacientes estudiados (Tablas 32-33).

Capítulo IV. RESULTADOS

Tabla 31. Número de moléculas de IgG por hematíe y su relación con la hemólisis en pacientes con AHAI con presencia solamente de autoanticuerpos de la clase IgG.

Clasificación	No de Pacientes	Número de moléculas de IgG / hematíe	
		mediana	intervalo
Hemólisis de alto grado	26	1293	200-18220
Hemólisis de bajo grado	52	569	200- 17010

p= 0.003, U= 398

Tabla 32. Relación entre la presencia de la subclase IgG3 en los eritrocitos y la hemólisis en pacientes con AHAI.

Clasificación	Presente	Subclase IgG3		
		%	Ausente	%
Hemólisis de alto grado	8	61.5	24	63.2
Hemólisis de bajo grado	5	38.5	14	36.8
Total	13	100	38	100

X²= 0.052. p= 0.81

Tabla 33. Relación entre el patrón de subclases presentes en los eritrocitos y la hemólisis en pacientes con AHAI.

Clasificación	IgG1 sola	Patrón de Subclases		
		%	Dos o más subclases	%
Hemólisis de alto grado	13	56.5	18	69.2
Hemólisis de bajo grado	10	43.5	8	30.8
Total	23	100	26	100

X²= 0.389, p= 0.53

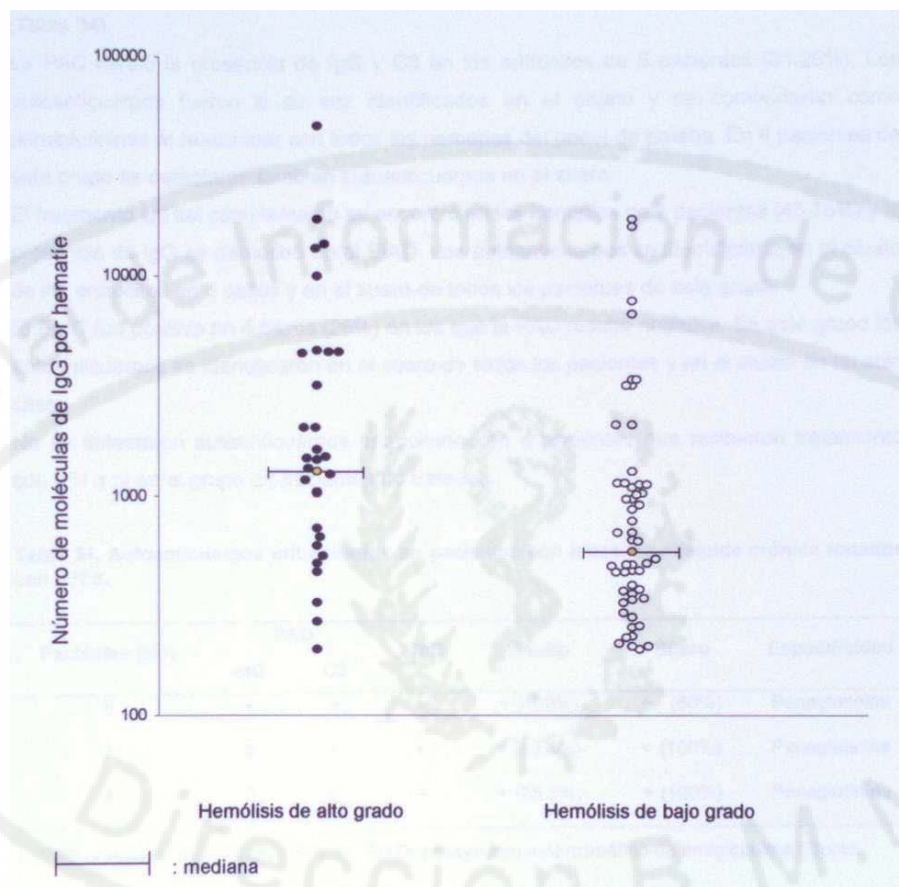


Figura 13. Número de moléculas de IgG por hematíe en los pacientes con anemia hemolítica autoinmune en relación con la intensidad de la hemólisis.

**4.5 Autoanticuerpos eritrocitarios en pacientes hematológicos tratados con interferón alfa
Pacientes con LMC**

Se detectaron autoanticuerpos eritrocitarios en 16 pacientes (80%) tratados con IFN alfa (Tabla 34).

La PAD reveló la presencia de IgG y C3 en los eritrocitos de 5 pacientes (31.25%). Los autoanticuerpos fueron a su vez identificados en el eluato y se comportaron como panaglutininas al reaccionar con todos los hematíes del panel de prueba. En 4 pacientes de este grupo se detectaron también autoanticuerpos en el suero.

El fragmento C3 del complemento se encontró en los hematíes de 7 pacientes (43.75%) y la presencia de IgG se demostró en el EIAD. Los autoanticuerpos se identificaron en el eluato de los eritrocitos en 3 casos y en el suero de todos los pacientes de este grupo.

El EIAD fue positivo en 4 casos (25%) en los que la PAD resultó negativa. En este grupo los autoanticuerpos se identificaron en el suero de todos los pacientes y en el eluato en un solo caso.

No se detectaron autoanticuerpos eritrocitarios en 4 pacientes que recibieron tratamiento con IFN a ni en el grupo de pacientes no tratados.

Tabla 34. Autoanticuerpos eritrocitarios en pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con IFN a.

Pacientes (No)	PAD			Eluato	Suero	Especificidad
	IgG	C3	EIAD			
5	+	+	+	+ (100%)	+ (80%)	Panaglutinina
7	0	+	+	+ (42.8%)	+ (100%)	Panaglutinina
4	0	0	+	+ (33.3%)	+ (100%)	Panaglutinina

PAD: prueba de antiglobulina directa, EIAD: ensayo inmunoenzimático de antiglobulina directa

No se demostró asociación entre la duración del tratamiento con IFN a y la ausencia o presencia de IgG y C3 en los hematíes detectados en la PAD o en el EIAD (Tabla 35). En los pacientes con presencia de autoanticuerpos las cifras de hemoglobina antes y después del tratamiento no mostraron diferencias, los reticulocitos se elevaron significativamente ($p < 0.05$) después del tratamiento con el fármaco (Tabla 36).

Capítulo IV. RESULTADOS

En los pacientes con LMC tratados con IFN α y con presencia de autoanticuerpos no se manifestaron síntomas y signos de anemia hemolítica autoinmune.

Tabla 35. Detección de autoanticuerpos y complemento en los eritrocitos de los pacientes con leucemia mieloide crónica y su relación con el tiempo de tratamiento con IFN α .

Pacientes	PAD	EIAD	Tiempo de tratamiento con IFN (meses)
1	IgG, C3	NR	3
2	IgG, C3	NR	4
3	IgG, C3	NR	3
4	IgG, C3	NR	7
5	IgG, C3	NR	48
6	C3	IgG	66
7	C3	IgG	48
8	C3	IgG	12
9	C3	IgG	1
10	C3	IgG	12
11	C3	IgG	12
12	C3	IgG	12
13	0	IgG	96
14	0	IgG	72
15	0	IgG	36
16	0	IgG	1
17	0	0	24
18	0	0	60
19	0	0	4
20	0	0	2

p*=0.076

PAD : prueba de antiglobulina directa, EIAD : ensayo inmunoenzimático de antiglobulina directa., NR : no realizado, *. probabilidad exacta de Fisher

Tabla 36. Cifras de hemoglobina y número de reticulocitos antes y después del tratamiento (tto) con IFN a en los pacientes con leucemia mieloide crónica.

Pacientes	Hemoglobina (g/L)		Reticulocitos (%)	
	Antes del tto	Después del tto	Antes del tto	Después del tto
1	90	108	2.2	2.0
2	126	120	0.3	2.4
3	152	123	0.2	0.4
4	132	134	0.2	1.2
5	134	143	0.2	0.3
6	145	137	0.3	1.8
7	133	128	0.3	0.8
8	145	147	0.8	5.0
9	104	107	0.2	2.8
10	97	104	0.3	2.2
11	140	95	1.6	5.0
12	104	104	0.2	3.0
13	153	151	0.1	3.0
14	113	119	0.6	0.2
15	149	124	0.2	5.0
16	110	114	0.3	0.8
x ± DE	126.6 ±20.9	122.3 ± 16.7 NS	0.6 ±0.5	2.2 ±1.6
			p* = 0.002	

NS: No significativo, * : t pareada

Pacientes con otras hemopatías malignas

En este grupo se detectaron autoanticuerpos eritrocitarios en 3 pacientes (23%). En estos la PAD fue positiva por presencia de C3 y los autoanticuerpos se identificaron en el eluato de los hematíes. En una paciente con enfermedad de Hodgkin se comprobaron síntomas de anemia hemolítica autoinmune después de 10 semanas de tratamiento con IFN a. Los hallazgos inmunohematológicos y el curso clínico de este caso se detallan a continuación.

4.6 Anemia hemolítica autoinmune inducida por el interferón alfa.

Antes del tratamiento el hemograma fue normal y no se detectaron anticuerpos eritrocitarios en el suero y en el eluato en la PAI ni cuando se emplearon hematíes tratados con papaína. La presencia en los hematíes de autoanticuerpos IgG no detectados en la PAD se descartó a través del EIAD.

Después de 6 semanas de tratamiento con IFN $\alpha 2b$ recombinante no se demostraron anticuerpos eritrocitarios en los procedimientos convencionales, excepto con el EIAD que mostró un valor DO considerado positivo (0.402) con respecto al valor de DO de los controles normales (0.08 ± 0.05).

A las 10 semanas de tratamiento la PAD fue positiva por presencia de C3. En el eluato se detectaron autoanticuerpos IgG reactivos en la PAI. La especificidad de los autoanticuerpos fue anti-Rh(e) en adición a una panaglutinina. En el suero los autoanticuerpos se demostraron con eritrocitos papainizados. En el EIAD se obtuvo un valor de 0.42. En ese momento la Hb había descendido a 109 g/L y el conteo de reticulocitos fue de 2.5%. En la lámina de sangre periférica se observó ligera hipocromía y anisocitosis.

El tratamiento con IFN α fue suprimido y la paciente se mantuvo en observación. Cuatro semanas después de discontinuado el tratamiento se obtuvieron hallazgos similares a los anteriores. El valor de DO en el EIAD fue de 0.33 (controles 0.078 ± 0.046). La cifra de Hb era de 104 g/L y el conteo de reticulocitos de 4.0%.

Se inició tratamiento con prednisona oral 1mg/kg/día durante dos semanas y después se fue disminuyendo lentamente en un intervalo de 2 meses. La cifra de Hb aumentó a 120g/L y el conteo de reticulocitos descendió a 2.5%.

La PAD se mantuvo positiva durante 6 meses y los anticuerpos en el suero desaparecieron a los 2 meses de iniciado el tratamiento inmunosupresor. Los resultados de las investigaciones realizadas se resumen en la Tabla 37.

Tabla 37. Estudio inmunohematológico evolutivo en una paciente con AHAI inducida por el tratamiento (tto) con IFN a.

Semanas de tto con IFN	Hb g/L	Ret (%)	Investigaciones Inmunohematológicas			
			PAD	Eluato	PAI	EIAD
0	123	1.2	0	0	0	0
6	120	1.6	0	0	0	+
10	109	2.5	C3	IgG	+	+
Semanas después de descontinuado el tto						
4*	104	4.0	C3	IgG	+	+
12	120	2.5	C3	IgG	0	+

Ret: conteo de reticulocitos, PAD : prueba de antiglobulina directa ,PAI: prueba de antiglobulina indirecta, EIAD : ensayo inmunoenzimático de antiglobulina directa, *: Inicio del tratamiento inmunosupresor

Capítulo V. Discusión

5.1 Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de IgG, IgA e IgM asociadas a los hematíes de pacientes con AHAI y de donantes de sangre.

Ajuste de las concentraciones de recubrimiento, de las diluciones del conjugado y del tiempo de incubación de la muestra y del conjugado.

Las concentraciones de recubrimientos inferiores a 5 µg/ml no fueron capaces de producir un incremento proporcional de la densidad óptica a medida que aumentan las concentraciones de Igs humanas. Esta tendencia se evidenció a partir de concentraciones superiores a 0.04 ng/ml de Ig de las curvas estándar. Este comportamiento puede deberse a que los anti-Igs utilizados en la sensibilización de la fase sólida provienen de la fracción IgG del suero de camero. En esta fracción hay presencia de inmunoglobulinas que no son específicas contra las Igs humanas por lo que la concentración de proteína no se corresponde enteramente con la de los anticuerpos específicos. Por esta razón pudo haber ocurrido la adsorción de una proporción mayor de anticuerpos no específicos que explica la tendencia de las curvas a disminuir sus pendientes. De haberse utilizado como recubrimiento anticuerpos específicos purificados es probable que se obtuvieran resultados satisfactorios con concentraciones inferiores. No obstante, es recomendable sensibilizar la fase sólida con un ligero exceso de material siempre que no se obtenga un efecto "gancho", provocado por la formación de sobrecapas que se eluyen en pasos posteriores y que pueden neutralizar el analito en la solución (100,101). Las concentraciones de los recubrimientos de 5 ng/ml mostraron un comportamiento lineal de las concentraciones de Igs de la curva, así como una mejor discriminación entre el control débil positivo y el control normal. Este hallazgo concuerda con el intervalo de 0.1-20 µg/ml comunicado en la literatura (100, 101,105). Las diluciones seleccionadas de los conjugados son similares a las utilizadas por otros autores en ensayos similares (102).

De los tiempos de incubación estudiados para la muestra, el mejor resultó ser el de 60 minutos. Los resultados obtenidos con la incubación a 90 minutos no difieren ostensiblemente de los mostrados con 60 minutos, pero se seleccionó esta última, además de por mostrar valores superiores de K de discriminación, por la disminución en el consumo del tiempo.

Con el tiempo de incubación de 30 minutos para los conjugados se observó los mejores resultados de linealidad y de discriminación entre control débil positivo y control normal.

Estos hallazgos concuerdan con lo recomendado en la literatura con respecto a la utilización de tiempos cortos de incubación para el conjugado, ya con el incremento del tiempo de incubación se favorecen las interacciones inespecíficas (104)

Evaluación del efecto de la hemoglobina y del éter contenido en los eluatos en la cuantificación de Igs por el ELISA.

Las diferencias entre la matriz de dilución de las muestras a estudiar y el diluyente utilizado en la curva estándar pueden producir efectos inespecíficos que modifiquen la cinética de la reacción antígeno-anticuerpo y de esta forma afectar la estimación de la concentración de Igs a partir de la curva patrón (11). Sin embargo, la presencia de hemoglobina y el tratamiento con éter de las inmunoglobulinas no modificaron la curva estándar del ensayo, por lo que todas las determinaciones fueron realizadas con las Igs estándar diluidas en SSBF-T-A.

La hemoglobina, por su actividad de peroxidasa, puede dar lugar a reacciones inespecíficas en los ensayos inmunoenzimáticos que utilizan conjugados con peroxidasa (100). En este ELISA se demostró que la hemoglobina contenida en los eluatos no interfirió en los resultados. Cuando se incubaron diferentes diluciones de hemoglobina en pocillos sin recubrir las lecturas de las densidades ópticas fueron similares a las del blanco del ensayo por lo que las condiciones de incubación de la muestra no favorecen la fijación de esta, aún cuando existían sitios libres en la fase sólida. Otros autores han comunicado resultados similares en el desarrollo de diferentes ensayos inmunoenzimáticos que utilizan conjugados con peroxidasa para la cuantificación de Igs en el eluato con presencia de hemoglobina como resultado del método empleado para la elución de los anticuerpos de los hematíes (98,122,123). Por otra parte, el tratamiento con éter de las inmunoglobulinas no afectó su detección en el ELISA. Este resultado es esperado, ya que este método de elución se ha utilizado comúnmente para la disociación de los anticuerpos unidos a los hematíes para su posterior caracterización (13).

Parámetros de validación

El ensayo mostró un coeficiente de determinación superior a 0.99 cuando se realizó la regresión lineal con los valores de concentración de IgG e IgM humana de 0.0025-0.07 $\mu\text{g/ml}$ y de IgA de 0.0025-0.06 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones superiores de Igs provocaron una disminución en este coeficiente debido probablemente a una saturación de los anti-Igs utilizados como recubrimientos que no permite un incremento proporcional de la densidad óptica a medida que se incrementa la concentración del analito (100,106). Por esta razón el límite superior de cuantificación fue 0.07 ($\mu\text{g/ml}$ para la IgG e IgM y 0.06 $\mu\text{g/ml}$ para la IgA,

Capítulo V. DISCUSIÓN

por lo que las muestras con altas concentraciones de Igs deberán ser diluidas para su cuantificación en el intervalo analítico del ensayo.

Los coeficientes de variación intraensayo e interensayos fueron inferiores de 10% lo que denota una excelente precisión y se corresponde con los requerimientos exigidos para este tipo de método (101,111)

La exactitud encontrada fue buena lo que indica que no existieron errores sistemáticos y avala la estrategia seguida para el desarrollo del método (101,111).

Los coeficientes de variación de todos los puntos de las curvas de calibración en el perfil de precisión fueron inferiores al 10%. Se encontró una tendencia a mejorar la precisión a con el aumento de las concentraciones de Igs. En este sentido deberá seleccionarse para el estudio de la muestra la dilución que muestre una densidad óptica dentro del intervalo intermedio y alto de las curvas de calibración.

El ensayo fue capaz de cuantificar las Igs en un amplio intervalo de concentraciones. El límite de detección fue bajo y el límite de cuantificación fue de 1 molécula de IgG e IgA y de 0.2 moléculas de IgM por hematíe; lo que permite la cuantificación de Igs asociadas a los hematíes de individuos normales y a los de pacientes con autoanticuerpos eritrocitarios.

Cuantificación de IgG, IgA e IgM en los hematíes de individuos sanos y de pacientes con AHAI.

El número de moléculas de Igs por hematíe en los donantes mostró una media de 58 para la IgG, 16 para la IgA y de 3 para la IgM. Otros investigadores han encontrado resultados similares para la IgG y la IgM con el empleo de otros métodos de cuantificación de anticuerpos (90,99,122,124). Al parecer existe una única comunicación previa sobre la cuantificación de IgA en los hematíes de individuos normales, donde se encontró una media menor de 29 moléculas de IgA por hematíe, lo cual es similar a lo determinado en este estudio (122).

Diferentes investigaciones han demostrado Igs asociadas a los hematíes de los individuos normales. La caracterización de estos anticuerpos ha evidenciado la presencia de Igs citofílicas de los isotipos IgG, IgA e IgM debido a una atracción electrostática entre la carga positiva de estas Igs y la carga negativa de la membrana de los hematíes (2,73). Otros autores aislaron de los hematíes, con una detección posterior por técnicas de inmunoblotting, autoanticuerpos fisiológicos contra el antígeno de senescencia eritrocitaria (ASE) que se expresa por el estrés oxidativo de la banda 3 eritrocitaria (74). Estos hallazgos describieron el mecanismo de

Capítulo V. DISCUSIÓN

senescencia de estas células carentes de núcleo y por tanto de una apoptosis programada (76). Los autoanticuerpos eritrocitarios fisiológicos, a diferencia de los identificados en la AHAI, tienen la característica de que no son detectados en la técnica de antiglobulina debido probablemente a una localización críptica del ASE en la membrana que no permite que el reactivo antiglobulínico forme puentes inter-hematíes y se visualice la aglutinación (75).

Esta característica de los autoanticuerpos fisiológicos permitió una mejor selección del valor de corte del ensayo para la IgA y la IgM ajustado este sobre la base de considerar un resultado positivo en el ELISA el valor de cuantificación de Igs por hematíe a partir del cual los autoanticuerpos fueran detectados en el eluato o, con un concentrado del mismo, por la técnica de antiglobulina (77). Sin embargo, en el ensayo de cuantificación de IgG se asumió como criterio la media más tres desviaciones estándar del número de moléculas de IgG por hematíe de los individuos normales. Esta selección fue posible debido a que, a diferencia de los resultados obtenidos con la IgA y la IgM, todos los valores de cuantificación de IgG obtenidos en los donantes de sangre fueron inferiores al valor de corte del ensayo de $IgG > 163$.

El número de moléculas de Igs por hematíe en los pacientes con AHAI se distribuyó en un amplio rango de concentraciones, lo que demuestra la capacidad del ensayo para discernir entre diferentes grados de sensibilización de los eritrocitos. Los resultados son comparables con investigaciones previas en las que se comunican resultados entre 230 y 30000 moléculas de IgG, entre 29 y 4500 moléculas de IgA y entre 20 y 168 moléculas de IgM por hematíe (90,99,122,124)

Las medias del número de moléculas de Igs por eritrocito mostraron una diferencia evidente entre individuos sanos y pacientes con AHAI, sin solapamiento de los intervalos entre ambos grupos.

En el estudio de los pacientes se encontró un incremento del número de moléculas de IgA asociadas a los eritrocitos (intervalo de 94 a 385) en 12 casos en los que no se habían demostrado anticuerpos de este isotipo en la PAD ni en los eluatos en la PAI. La relevancia clínica de estos anticuerpos detectados únicamente por el ELISA debe ser confirmada en otros estudios, ya que puede haber un aumento de Igs asociadas a los hematíes debido a la presencia de inmunocomplejos o por la adsorción inespecífica de Igs a la membrana de los eritrocitos, que pueden detectarse en ensayos muy sensibles como el ELISA(22,44). Similares consideraciones se aplican a los resultados encontrados en los dos pacientes con AHAI y PAD negativa en los que los autoanticuerpos no se detectaron en los eluatos. Sin embargo, existen otras evidencias que sugieren que los anticuerpos IgG e IgA demostrados en el ELISA fueron los responsables de las manifestaciones de la hemólisis en estos pacientes. La

Capítulo V. DISCUSIÓN

anemia hemolítica en estos casos estuvo asociada a la leucemia linfocítica crónica y al linfoma no-hodgkiniano. Es conocido que la incidencia de AHAI es mayor en los pacientes con estas hemopatías que en la población general (2,125). Por otra parte, otros investigadores también han demostrado autoanticuerpos IgG e IgA en los hematíes por métodos más sensibles que la PAD en pacientes con AHAI con prueba de Coombs negativa (86,94,126). Además, en estos casos se excluyó la presencia de otras anemias hemolíticas y se logró la remisión de la enfermedad con la administración de corticosteroides. Estos resultados muestran que la cuantificación de Igs en los eluatos por el ELISA puede ser de utilidad para el diagnóstico inmunohematológico de la AHAI con prueba de Coombs negativa. Sin embargo, deberá realizarse un estudio con un número mayor de casos para la evaluación de este ensayo.

El límite de sensibilidad de la técnica de antiglobulina oscila entre 200 y 500 moléculas de IgG por hematíe y la mayor intensidad de la aglutinación ocurre en un rango entre 1000 y 2000 moléculas de IgG (13,22). Nuestros resultados son comparables con los referidos previamente. El ensayo normalizado fue capaz de diferenciar el número de moléculas de Igs en muestras con una máxima aglutinación en la PAD(4+), por lo que este método es adecuado para evaluar la concentración de autoanticuerpos en los hematíes durante el tratamiento de la enfermedad. Estos resultados se deben a que el patrón de aglutinación obtenido en la PAD no permite apreciar diferencias cuando existen altas concentraciones de anticuerpos. En este sentido nuestro método es más preciso sobre todo cuando se quiere evaluar la respuesta terapéutica individualmente.

Al parecer no existen estudios previos que relacionen la intensidad de la aglutinación en la PAD con el número de moléculas de IgA e IgM en los hematíes. De acuerdo a nuestros resultados los reactivos mono-específicos anti-IgA y anti-IgM son capaces de provocar una aglutinación visible cuando existen aproximadamente 126 moléculas de IgA y 31 moléculas de IgM por eritrocito. La máxima intensidad de aglutinación se alcanza cuando recubren a los hematíes más de 200 moléculas de IgA o más de 100 moléculas de IgM.

El empleo de los eluatos a partir de la técnica de éter permitió comunicar por primera vez en la literatura la cuantificación, en una única muestra, de todos los isotipos de los anticuerpos involucrados en la hemólisis autoinmune y de las Igs asociadas a los hematíes de individuos sanos.

En un ensayo inmunoenzimático cuantitativo publicado previamente se utilizaron eluatos obtenidos por el calentamiento de la muestra a 56°C para la cuantificación de IgG e IgM pero fue incapaz de revelar la presencia de IgA en los eritrocitos (99). Otros autores emplearon la solubilización de los autoanticuerpos eritrocitarios con un detergente no iónico, para

determinar en un ELISA el número de moléculas de IgG e IgA por hematíe, pero este método no fue efectivo para la cuantificación de IgM (122). Existen otros métodos que logran medir con precisión el número de moléculas de Igs unidas a los eritrocitos dentro de los que se encuentran el de antiglobulina marcada con radioisótopo y la citometría de flujo. Estos procedimientos requieren de un equipamiento costoso y para el radioinmunoanálisis la utilización de compuestos radioactivos de riesgosa manipulación. En el ELISA normalizado se utilizó el eluato como muestra debido a que aumenta la sensibilidad del ensayo en comparación con la detección de anticuerpos directamente sobre los hematíes. Las propias características del procedimiento de elución favorecen la concentración de los anticuerpos ya que se recuperan los mismos a partir de un concentrado de hematíes y en un volumen menor a lo que se encuentran en la muestra de sangre extraída (127). Por otra parte, se seleccionó el método del éter teniendo en cuenta que, al igual que con otros solventes orgánicos, se recupera en el eluato el 95% de autoanticuerpos unidos a la membrana eritrocitaria. Además, el éter ofrece otras ventajas como son las de no ser carcinogénico y no afectar la detección de Igs en el ELISA como el Xilol y de ser menos costoso que el cloroformo (40)

En resumen, el ELISA normalizado es un método sensible para la investigación de anticuerpos asociados a los hematíes en pacientes con AHAI, así como en individuos normales. El ensayo podría aplicarse también en la detección en los hematíes de fragmentos del complemento u otras inmunoproteínas, con el uso de los reactivos apropiados para estos fines.

5.2 Comparación entre la prueba de antiglobulina directa, la técnica de microplacas y el EUSA en la detección de autoanticuerpos en los hematíes de los pacientes con AHAI.

Es bien conocida la importancia de las inmunoproteínas unidas a los eritrocitos como mediadores de la hemólisis autoinmune. La PAD se ha utilizado por muchos años para evaluar la presencia de los anticuerpos unidos a estas células (29,77). Sin embargo, el límite de detección de anticuerpos de este método oscila entre 200 y 500 moléculas de IgG por hematíe (94,128); por lo que otros procedimientos más sensibles se han introducido para identificar los autoanticuerpos eritrocitarios que no son detectados en esta técnica.

El estudio de los anticuerpos en el eluato de los hematíes ha demostrado ser más sensible que la detección directa de estas inmunoglobulinas en los eritrocitos (129). La elución aumenta la concentración de los anticuerpos en la fase líquida. De esta forma, una sensibilización posterior de los hematíes testigos con el eluato logra la unión de 500 a 10

Capítulo V. DISCUSIÓN

000 moléculas de anticuerpo por célula, independientemente del número de moléculas de inmunoglobulinas que inicialmente recubrían a los eritrocitos *"in vivo"* (130).

Los resultados de nuestro trabajo corroboran los hallazgos descritos anteriormente, ya que tanto en la técnica de Mp como en el ELISA las determinaciones de los anticuerpos se realizaron en los eluatos y estos procedimientos detectaron autoanticuerpos no revelados en la PAD.

El ELISA cuantitativo demostró ser superior para la identificación de anticuerpos IgA asociados a los hematíes. Si bien no se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la detección de anticuerpos IgG entre la técnica de Mp y el ELISA, este último reveló los autoanticuerpos en dos pacientes donde la técnica de Mp resultó negativa. En estos dos casos la PAD detectó el fragmento C3 como única inmunoproteína en los hematíes y la presencia de los autoanticuerpos causantes de la hemólisis se corroboró por el ELISA. Una PAD positiva por la presencia única de C3 es compatible con el diagnóstico de síndrome de aglutininas frías ó de hemoglobinuria paroxística a frigore, pero estas entidades fueron excluidas en todos los enfermos en las investigaciones de las crioaglutininas y de los anticuerpos bifásicos de Donath- Landsteiner (116). Por otra parte, la presencia de C3 en los hematíes no es exclusiva de las AHAI; puede también encontrarse en pacientes con otras enfermedades autoinmunes y con síndromes linfoproliferativos sin manifestaciones clínicas de hemólisis, por lo que la detección de los autoanticuerpos es crucial para establecer el diagnóstico (41,57). Otros autores han encontrado resultados similares con el empleo de un ensayo inmunoenzimático cualitativo para demostrar los autoanticuerpos eritrocitarios en los hematíes de pacientes con PAD positiva por presencia de C3.(131).

La presencia de autoanticuerpos de la clase IgA se encontró en el 35% de los enfermos con el empleo del ELISA en comparación con el 14-17% detectado en los ensayos de aglutinación (PAD; MP). El porcentaje de autoanticuerpos IgA encontrados difiere de los informados previamente con el uso de un ELISA directo cualitativo donde se demostraron estos anticuerpos en el 14% de los casos (64). Las diferencias pueden deberse a que, como se explicó anteriormente, el estudio de los anticuerpos en el eluato es más sensible que la detección directa de estas inmunoglobulinas en los eritrocitos.

Los tres procedimientos de investigación de autoanticuerpos eritrocitarios utilizados revelaron resultados similares en la detección de anticuerpos de la clase IgM que oscilaron entre el 13- 14% de los casos. La frecuencia de anticuerpos de este isotipo encontrada en este grupo de pacientes coincide con la tradicional mente comunicada en la mayoría de los estudios con el empleo de la PAD (13). Sin embargo, Sokol et al (132), identificaron autoanticuerpos IgM

Capítulo V. DISCUSIÓN

asociados a los hematíes en el 30% de los pacientes con AHAI a través de un ELISA cualitativo que determina la presencia de inmunoglobulinas directamente sobre los eritrocitos.

Otros investigadores utilizan una PAD potenciada en autoanalizador para esclarecer el diagnóstico de casos con resultados dudosos, al considerar que la técnica tradicional no es especialmente sensible para la detección de autoanticuerpos de este isotipo (133).

Los anticuerpos IgM se separan fácilmente de los eritrocitos en los lavados previos requeridos en las técnicas de elución, por lo que se dificulta su obtención en los eluatos (13).

La elución por éter, empleada en este estudio, no ha sido apropiadamente evaluada para la identificación de anticuerpos IgM en los eluatos de los hematíes de pacientes con AHAI (134). No obstante, todos los anticuerpos IgM detectados en la PAD en los pacientes estudiados fueron identificados en los eluatos por el ELISA y también en un paciente donde la PAD con anti-IgM resultó negativa. A su vez, el ELISA cuantitativo utilizado fue capaz de cuantificar bajas concentraciones de autoanticuerpos IgM en los hematíes de individuos normales. Las razones expuestas anteriormente no explican las diferencias de nuestros resultados con los comunicados previamente y deberán proyectarse otros estudios para dilucidarlas.

Aunque los hallazgos de este trabajo favorecen el empleo del ELISA cuantitativo para la detección de autoanticuerpos de diferentes isotipos, la técnica de Mp es de gran utilidad ya que además de ser superior que la PAD para la identificación de autoanticuerpos IgG, permite corroborar la naturaleza autoinmune de los anticuerpos eritrocitarios. Con esta técnica se demostró que las inmunoglobulinas recuperadas en el eluato de los hematíes de la mayoría de los pacientes reaccionan con los antígenos presentes en los hematíes testigos, lo cual es uno de los criterios de diagnóstico más importante en la caracterización de los autoanticuerpos eritrocitarios (135).

En los pacientes con AHAI en los que la técnica de Mp resultó negativa los anticuerpos se detectaron en la técnica de antiglobulina indirecta al concentrar los eluatos. Esto confirmó el diagnóstico de la presencia de autoanticuerpos eritrocitarios. Esta determinación es crucial ya que existe un aumento en la concentración de inmunoglobulinas asociadas a los eritrocitos en pacientes con hemoglobinopatías, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, mieloma, infecciones y en pacientes con procesos inflamatorios agudos (11,42,83).

Estas afirmaciones se corroboraron al estudiar el grupo de pacientes con anemia drepanocítica y con mieloma múltiple donde el ELISA y en algunos casos la PAD y la Mp resultaron positivas. Es conocido que en los pacientes con hemoglobinopatías existe un aumento de Igs asociadas a los hematíes y en algunos casos los anticuerpos pueden ser revelados también en el eluato de los hematíes (57). El significado clínico de estos hallazgos aún no está bien esclarecido y al

Capítulo V. DISCUSIÓN

parecer la presencia de los autoanticuerpos en estos pacientes puede estar relacionado con los regímenes crónicos de transfusión de hematíes a los que están expuestos (136). Otros estudios demuestran que en los hematíes de estos casos existe una expresión incrementada del antígeno de senescencia eritrocitaria debido a la desnaturalización de la hemoglobina y su unión a la banda 3 eritrocitaria formando los cuerpos de Heinz. Este evento provoca un aumento de la unión de los autoanticuerpos fisiológicos dirigidos contra los hematíes senescentes (137).

Por otra parte, la adsorción inespecífica de Igs a los hematíes en pacientes con hipergammaglobulinemia es una de las causas más conocidas de resultados positivos en los ensayos de detección de anticuerpos, sin que esto se relacione con la presencia de hemólisis inmune (3). La concentración de las Igs en los hematíes de estos casos es proporcional a su concentración sérica y la ausencia de hemólisis inmune se explica por el bloqueo mediado por la IgG sérica del receptor para el fragmento Fe de los fagocitos (2). Aunque en los pacientes con mieloma múltiple se puede encontrar AHAI asociada, el diagnóstico de laboratorio de esta última deberá basarse en la detección de autoanticuerpos en el eluato donde se corrobora la naturaleza autoinmune de los anticuerpos detectados en la PAD ya que las Igs unidas inespecíficamente a los hematíes no reaccionan con los antígenos de estas células (2).

En el ELISA se obtuvieron resultados dentro del rango normal en todos los pacientes con PAD negativa sin hemólisis inmune, lo que refleja la aplicación de este ensayo en el diagnóstico inmunohematológico diferencial con estas entidades dentro de las que se incluyen otras anemias hemolíticas en las que la hemólisis no está mediada por autoanticuerpos (138).

A pesar de sus limitaciones, la PAD continúa siendo una técnica de utilidad porque resulta positiva en la mayoría de los pacientes con AHAI, por la rapidez con que se obtienen los resultados y por ser el método de elección para la detección del fragmento C3 del complemento en los hematíes (139).

Un aspecto a considerar en este estudio es el hallazgo en el 40% de los pacientes de inmunoglobulinas de dos o más isotipos en los hematíes con el empleo del ELISA, en comparación con el 14-19% encontrado con las técnicas de aglutinación. Esto ha sido igualmente informado en otras investigaciones cuando se aplican técnicas de mayor sensibilidad que la PAD entre las que se incluyen los ensayos inmunoenzimáticos (132). La presencia de autoanticuerpos de diferentes clases de inmunoglobulinas en los hematíes tiene un efecto sinérgico sobre la destrucción inmune de estas células por el sistema mononuclear fagocítico y podría estar relacionado con la severidad del proceso hemolítico, así como con la respuesta al tratamiento inmunosupresor (22,132).

De los ensayos empleados, el ELISA mostró la mejor sensibilidad, sin embargo, la PAD y la Mp fueron superiores en especificidad al igual que lo encontrado en otros estudios (140). Por otra parte, la eficacia o coincidencia fue de un 98% para la Mp y de un 96% para el ELISA. Estos resultados están influenciados por la gran sensibilidad del ELISA que detectó Igs en los hematíes de los pacientes con hemoglobinopatías y en pacientes con hipergammaglobulinemias. Estos hallazgos lejos de constituir una limitación del ELISA, nos provee de un método para detectar y evaluar la importancia clínica de las Igs asociadas a los hematíes de los pacientes con hemoglobinopatías donde se especula que los autoanticuerpos pueden tener un papel fisiológico importante al bloquear la adherencia de los hematíes al endotelio vascular (137).

De esta forma esta técnica es útil en el diagnóstico cuando exista una sospecha clínica de anemia hemolítica en el que se hayan excluido las hemoglobinopatías y cuando se demuestren autoanticuerpos en el eluato de los pacientes con hipergammaglobulinemia. Al tener en cuenta estos requisitos la especificidad del ELISA puede ser mayor del 98%.

Estas recomendaciones son también aplicables a la PAD para el diagnóstico inmunohematológico de la AHAI. La presencia de anemia no es suficiente para la indicación de esta prueba sino que deberán comprobarse dos o más signos de hemólisis en el paciente antes de su realización (141,142). Teniendo en cuenta estas recomendaciones los valores predictivos positivo y negativo para esta técnica es de un 83% y un 99% respectivamente (143).

Los resultados de este trabajo permiten recomendar la introducción de los ensayos inmunoenzimáticos en las investigaciones inmunohematológicas de los pacientes con AHAI para definir el patrón de inmunoglobulinas presentes en los hematíes. La posibilidad de este ensayo de detectar anticuerpos no revelados en la PAD lo señalan como un proceder de elección para el diagnóstico serológico de la AHAI con prueba de Coombs negativa.

5.3 Cuantificación de autoanticuerpos en los hematíes de pacientes con AHAI y prueba de Coombs negativa.

Es bien conocido que en algunos pacientes con evidencias clínicas de hemólisis inmune no se detectan anticuerpos eritrocitarios por los métodos convencionales (2).

Este estudio documenta los hallazgos inmunohematológicos en 18 pacientes con AHAI y prueba de Coombs negativa que constituyeron el 13.3% de todas los casos de AHAI diagnosticados en el período en que se efectuó la investigación. Estos resultados son similares

Capítulo V. DISCUSIÓN

a los de otros autores, que comunican una frecuencia de un 10 % de pacientes con AHAI con PAD negativa (10,50).

El hallazgo de una PAD negativa en la AHAI se asocia a diferentes causas inherentes a la realización de esta prueba, por lo que es necesario el empleo de técnicas de mayor sensibilidad, como la citometría de flujo, la prueba de polibreno directa y el ELISA para detectar los autoanticuerpos eritrocitarios causantes de la hemólisis (3).

Nuestros resultados sugieren el empleo del ELISA para estos fines ya que reveló la presencia de los autoanticuerpos en todos los pacientes.

Un estudio previo con la introducción de un inmunoensayo, que detecta las Igs directamente sobre los eritrocitos, encontró un incremento de la IgG asociada a los hematíes en el 40% de los casos (126). Sokol et al (144), con la aplicación también de un ELISA directo demostró una asociación entre la presencia de bajas concentraciones de IgG, IgA e IgM en los hematíes y la hemólisis autoinmune en el 75% de los pacientes con AHAI con PAD negativa. El ensayo inmunoenzimático utilizado en este estudio es al parecer más sensible que los descritos previamente, debido probablemente a que la cuantificación de Igs se realizó a partir del eluato obtenido por el método del éter. Como se comunicó previamente, este método permite la identificación de todos los isotipos de Igs causantes de la hemólisis en la AHAI, lo que avala este proceder en la identificación de autoanticuerpos no revelados en la PAD .

La técnica de Mp es un método que también ofrece ventajas, ya que además de identificar los autoanticuerpos en el 61% de los casos, corrobora el diagnóstico al demostrar la reacción de las Igs con los hematíes en el ensayo de antiglobulina indirecta. La ausencia de anticuerpos demostrables en este ensayo y detectados únicamente en el ELISA podría estar relacionado con un aumento de Igs asociadas a los hematíes en pacientes con hipergammaglobulinemia o con hemoglobinopatías sin hemólisis inmune (57).

Sin embargo, en la serie estudiada estas dos condiciones fueron excluidas ya que se descartaron las hemoglobinopatías y se encontraron valores de cuantificación de Igs séricas dentro de los parámetros normales en todos los casos. Estos hallazgos permiten asumir que el ELISA detectó autoanticuerpos en los hematíes de los pacientes con AHAI Coombs negativa (9).

La TPD es más sensible que la PAD para la detección de los autoanticuerpos de la clase IgG (126, 145). Aunque en nuestra casuística resultó positiva sólo en el 28% de los pacientes, debe tenerse en cuenta como una alternativa por ser una técnica fácil de realizar y por la rapidez con que se obtienen los resultados.

La presencia de autoanticuerpos de los isotipos IgA e IgM no fijadores de complemento en los hematíes puede ocasionar una PAD negativa, al no ser detectados los mismos por el suero antiglobulina humana poliespecífico, cuyos componentes principales son los anticuerpos anti-IgG y anti-C3 (21,146). Sin embargo, en los pacientes estudiados la PAD fue igualmente negativa con los reactivos monoespecíficos anti-IgA y anti-IgM. Resultados similares se han comunicado en otras series en los que se empleó igual metodología para el diagnóstico serológico (2).

Aunque la mayoría de los investigadores han centrado su atención en demostrar la presencia de anticuerpos IgG en los hematíes (147-149) de los pacientes con AHAI Coombs negativa, se han encontrado también autoanticuerpos de la clase IgA e IgM involucrados en la hemólisis (86). Al respecto, Sokol et al (131) detectaron anticuerpos IgA e IgM por medio de un ELISA directo en los hematíes de 4 de los 16 pacientes con PAD negativa. Salama et al (150), demostraron autoanticuerpos IgM en los hematíes de 8 casos a través de un ensayo inmunoradiométrico. Otros autores identificaron autoanticuerpos IgA en los hematíes de este grupo de pacientes en la técnica de aglutinación en gel o por un ensayo de citometría (151). Los resultados negativos de la prueba de Coombs en el 55,5% de los casos estudiados pueden ser atribuibles a la presencia de 200 a 500 moléculas de IgG por hematíe, que es el límite de sensibilidad de la técnica de antiglobulina (22). Sin embargo, la teoría cuantitativa no es aplicable a todos los pacientes, ya que en el resto de los casos estudiados se encontraron valores superiores a 900 moléculas de IgG por hematíe e incluso en un paciente se detectaron 48356 moléculas de IgG por célula donde la PAD debía resultar francamente positiva.

Garratty (9) obtuvo resultados similares y plantea como teoría aún no comprobada que el hallazgo de una PAD negativa en la AHAI no es atribuible únicamente a la sensibilidad de la técnica sino que es debido también a que las moléculas de anticuerpos muestran una orientación espacial que no permite que el reactivo antiglobulínico forme puentes entre los hematíes y se produzca la aglutinación. De esta forma, los autoanticuerpos pueden ser detectados por ensayos que no dependan de la aglutinación.

Los resultados de nuestro estudio muestran que el ensayo inmunoenzimático aplicado es particularmente útil para la detección y cuantificación de autoanticuerpos en los hematíes de los pacientes con AHAI y prueba de Coombs negativa y nos provee de un procedimiento muy sensible para el diagnóstico inmunohematológico de esta identidad.

5.4 Relación entre la hemólisis y la presencia y cuantificación de inmunoglobulinas en los hematíes de los pacientes con AHAI.

En la AHAI los anticuerpos causantes de la hemólisis son predominantemente de la clase IgG y con menor frecuencia de las clases IgA e IgM (13). Los resultados de este estudio apoyan estas afirmaciones y coinciden con los comunicados por otros autores para las frecuencias de autoanticuerpos de las clases IgG e IgM, no así en lo que respecta a la IgA (2, 12,43).

La presencia de IgA en los hematíes se ha demostrado en el 1.5 y en el 14% de los pacientes con AHAI (64,153). La frecuencia de autoanticuerpos IgA en el grupo de pacientes que hemos analizado es superior a los comunicados previamente debido a que en el estudio se empleó un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de Igs en los hematíes que es un método más sensible que las técnicas de aglutinación y permite detectar esta Ig en los hematíes con PAD negativa.

La AHAI mediada únicamente por autoanticuerpos de la clase IgA es infrecuente y se ha identificado en el 0.2% del total de pacientes, lo que es similar a lo encontrado en nuestra serie (60).

La distribución de las subclases de IgG de los autoanticuerpos y sus combinaciones se asemejan a las comunicadas en otros estudios (12,127). La presencia de únicamente autoanticuerpos IgG2 en los hematíes se identificó en el 3.9% de los pacientes, lo que coincide con lo demostrado por otros autores (9), pero difiere de otras investigaciones donde se encontró en menos del 1% de los casos (154). Estas diferencias podrían atribuirse al número de casos estudiados y al método de detección de las subclases empleado en los diferentes estudios (9).

El fragmento C3d del complemento se detectó a través de la PAD en el 65% de los pacientes (datos no mostrados). Su presencia no fue tenida en cuenta en su relación con la hemólisis, ya que este no media la destrucción de los hematíes *"in vivo"* (155).

Muy pocas investigaciones han abordado la relación entre la coexistencia de múltiples inmunoglobulinas en los hematíes con la hemólisis mediada por autoanticuerpos, debido probablemente a que con los procedimientos convencionales se detecta este patrón en el 15% de los casos (12). Sin embargo, con la introducción de técnicas más sensibles se demuestra en el 37% de los pacientes con AHAI (127).

El único estudio realizado con el empleo de un ELISA directo cualitativo concluye que la identificación de autoanticuerpos IgG acompañados de autoanticuerpos IgA, IgM o de ambas Igs es la causa principal de la hemólisis autoinmune (127). Esta investigación relacionó la

Capítulo V. DISCUSIÓN

presencia de dos más inmunoglobulinas con la severidad de la hemólisis, pero no clasificó a los pacientes de acuerdo al patrón específico de las Igs detectadas en sus eritrocitos.

Nuestro estudio sugiere que la presencia en los hematíes de autoanticuerpos IgM, en combinación con autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgA o con ambos, es un factor fundamental en la severidad de la hemólisis en los pacientes con AHAI. Estos hallazgos difieren de los anteriores, y le atribuimos a la IgM el papel primordial como mediador de la hemólisis, al encontrarse que todos los pacientes con autoanticuerpos de este isotipo fueron clasificados dentro del grupo con hemólisis de alto grado. Las discrepancias entre nuestros resultados con los comunicados previamente pueden ser debido a las diferencias en las metodologías empleadas para la clasificación de los pacientes de acuerdo a los isotipos de los autoanticuerpos detectados.

Los hematíes sensibilizados con autoanticuerpos IgM, IgG e IgA son atrapados eficientemente por los macrófagos del bazo y del hígado a través de los receptores para el fragmento Fc de la IgG (RFcy) y de la IgA (RFca) y por los receptores RC1 y RC3 para los fragmentos C3b y C3bi del complemento. La presencia de estos últimos es mediada fundamentalmente por los anticuerpos IgM (67).

Los autoanticuerpos calientes IgM generalmente no provocan la lisis directa de los hematíes mediada por complemento, debido a la acción de las proteínas inhibitoras del complemento presentes en la membrana de estas células. Dentro de éstas se encuentran el factor acelerador de la degradación o DAF (CD55) que impide el ensamblaje de la C3 convertasa; la proteína de unión al C8 que interfiere en la interacción C8-C9 y en la polimerización de este último; y CD59 o inhibidor de la lisis reactiva (MIRL) que evita la incorporación del C9 en el complejo C5b-9. Por lo tanto, la activación del complemento culmina con la deposición en los hematíes del C3 que es reconocido por sus receptores en los macrófagos y se produce la fagocitosis o la lisis citotóxica de estas células (12,47).

No obstante, es difícil evaluar la patogenicidad de los autoanticuerpos IgM cuando estos concommitan con autoanticuerpos IgG e IgA. En el reducido número de casos en los que se han identificado únicamente autoanticuerpos IgM hay evidencias de hemólisis intravascular con una mortalidad significativa lo cual confirma su importancia clínica (12, 156, 157).

La mayoría de los pacientes con IgG e IgA en los hematíes fueron clasificados con hemólisis de alto grado. Los eritrocitos recubiertos con anticuerpos IgA son destruidos por un mecanismo similar al de la IgG aunque en ocasiones pueden activar el complemento por la vía alternativa, probablemente vía lectina, y provocar hemólisis intravascular (158,159).

Capítulo V. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que existe un efecto sinérgico de los autoanticuerpos IgA con los IgG, especialmente con los IgG1, en la aparición de hemólisis severa (64). No obstante, el 34% de los pacientes estudiados con autoanticuerpos de estos isotipos fueron clasificados con hemólisis de bajo grado, por lo que otros factores pueden influir en la destrucción de los eritrocitos por los autoanticuerpos. Dentro de estos se señala la actividad del sistema mononuclear fagocítico de los pacientes y el balance de citocinas que regulan la expresión de los receptores Fe presentes en los macrófagos y de esta forma modulan la destrucción inmune de los hematíes (85).

Recientemente se ha comunicado un caso de AHAI severa mediada por autoanticuerpos IgA que reconocen a antígenos localizados en el tercer lazo de la banda 3 eritrocitaria (160). Otros autores han encontrado que estos autoanticuerpos tienen especificidad para los antígenos del sistema Rh y en un caso no se realizó su identificación (161,162). Por lo que la especificidad de los autoanticuerpos IgA no ha sido apropiadamente evaluada como un factor que pudiera influir en su patogenicidad.

Generalmente la destrucción de los hematíes es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos a estas células (85). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el número de moléculas de IgG e IgA por hematíe en los pacientes de los grupos con hemólisis de alto y bajo grado. Hasta donde conocemos no se han realizado estudios previos de cuantificación de autoanticuerpos IgA y su relación con la intensidad de la hemólisis que permitan comparar estos resultados. Al parecer, la coexistencia de autoanticuerpos IgG e IgA por sí misma predispone a una mayor severidad de la hemólisis no influenciada por el número de moléculas de estas Igs que recubren a los eritrocitos *"in vivo"*.

En el estudio se demostró, además, un aumento significativo en el número de moléculas de IgG por hematíe en los pacientes con este patrón serológico pertenecientes al grupo con hemólisis de alto grado en comparación con los del grupo con hemólisis de bajo grado.

Otros autores han obtenido evidencias a favor de que la cantidad de IgG unida a los eritrocitos puede predecir la gravedad de la hemólisis en los pacientes con AHAI (99,163). En contraste, Garratty y Nance (164) no pudieron confirmar este hallazgo en un estudio posterior. Las divergencias entre estos resultados pudieran estar relacionadas con diferencias en los reactivos antiglobulínicos utilizados, la selección de los pacientes estudiados y los criterios usados para la clasificación de la hemólisis (165).

Nuestros resultados, sin embargo, coinciden con los de Garratty y Nance (164) en cuanto a que no fue posible determinar un umbral que pueda predecir la ocurrencia o no de hemólisis de alto grado, ya que se encontró un gran solapamiento de los valores de cuantificación de IgG por

Capítulo V. DISCUSIÓN

hematíe entre los pacientes de ambos grupos de hemólisis. Como se expuso anteriormente, otros factores modulan la destrucción inmune de los hematíes que pueden influenciar en los resultados, dentro de estos el menos estudiado es el de la afinidad de los autoanticuerpos. Los escasos estudios realizados sobre el tema sugieren que existe una relación directa entre la afinidad y la patogenicidad de los autoanticuerpos y los aloanticuerpos por lo que es un factor que pudiera influir en nuestros resultados y deberá ser estudiado en futuras investigaciones (2, 166)

La presencia de IgG3 y de múltiples subclases de autoanticuerpos se asocia con signos de hemólisis manifiesta (12,127,167). La IgG3 es más eficiente que la IgG1 en su interacción con los macrófagos debido a su gran afinidad por los receptores Fc presentes en estas células (9,52).

En nuestro estudio no se obtuvieron diferencias significativas en la distribución de los autoanticuerpos IgG3 e IgG1 entre los pacientes de los grupos con hemólisis de alto y bajo grados. Otros autores encontraron resultados similares y han demostrado la presencia de estas subclases en los eritrocitos de donantes con prueba de antiglobulina positiva sin manifestaciones de anemia (82,83).

Por otra parte, aunque la presencia de múltiples subclases en los hematíes fue más frecuente en los pacientes con hemólisis de alto grado, no se obtuvieron diferencias significativas en la distribución de este patrón entre los grupos estudiados. No obstante, aunque es conocido que el patrón de subclases depende de factores como la presentación antigénica, el microambiente de citocinas y de factores genéticos (26), consideramos que las diferencias con otros estudios pudieran atribuirse también a que la caracterización de las subclases de los autoanticuerpos se realizó en una muestra reducida de los casos.

Los hallazgos de este estudio permiten plantear que la severidad de la hemólisis en los pacientes con AHAI se relaciona con la coexistencia de múltiples inmunoglobulinas en los hematíes y en especial de la IgM. En los pacientes con presencia únicamente de IgG el número de moléculas de autoanticuerpos por hematíe es el factor determinante en la hemólisis, aunque este parámetro por sí sólo no pueda explicar las discrepancias observadas en muchos casos.

Más allá de estas consideraciones, la cuantificación de autoanticuerpos en los hematíes es una herramienta que podría emplearse para la evaluación del tratamiento inmunosupresor y en la decisión de la conducta terapéutica en los pacientes con AHAI (168). Con este ensayo es posible determinar la concentración de autoanticuerpos en los hematíes en estudios

longitudinales en relación con el tratamiento y de esta forma podría evaluarse en cada paciente la respuesta al fármaco administrado.

5.5 Autoanticuerpos eritrocitarios en pacientes hematológicos tratados con interferón alfa.

El IFN α provoca alteraciones del sistema inmune que se han relacionado con la inducción de autoinmunidad. Dentro de éstas se destacan las modificaciones en la actividad supresora de los linfocitos, un incremento de la expresión de las moléculas de clase I del sistema principal de histocompatibilidad y modificaciones en las membranas celulares (26).

Asociado al tratamiento con este fármaco se ha detectado autoanticuerpos involucrados en diferentes enfermedades autoinmunes (169). Dentro de los mecanismos más invocados se encuentra la diferenciación Th1 de las células CD4 por un aumento en la expresión de los receptores para la IL-12 mediados por el IFN α (26). Por otra parte se ha demostrado que el IFN α promueve la diferenciación de los monocitos a células dendríticas las cuales son capaces de procesar antígenos de células senescentes y presentarlos a las células CD4 y de esta forma inducir la producción de autoanticuerpos (170).

La detección de autoanticuerpos eritrocitarios únicamente en el grupo de pacientes que se le administró el fármaco confirma la inducción de autoinmunidad inducida por el IFN α . En un gran número de ellos la prueba de Coombs directa reveló únicamente la presencia de fragmento C3d del complemento en los eritrocitos y los autoanticuerpos eritrocitarios se detectaron predominantemente en el suero, en el eluato de los hematíes o con el empleo de ensayos sensibles como el EIAD. Estos hallazgos no se asociaron con la duración del tratamiento con IFN al igual que lo comunicado en otros estudios (171).

La identificación de anticuerpos eritrocitarios séricos, no demostrables sobre los eritrocitos, se relacionan con la inducción de autoanticuerpos de baja afinidad o con una depresión marcada de los antígenos eritrocitarios específicos (12). Aunque los autoanticuerpos eritrocitarios no mostraron en su gran mayoría especificidad definida para los antígenos de los grupos sanguíneos, se conoce que estos están dirigidos contra todo el sistema Rh y en los pacientes estudiados no se demostró depresión de los antígenos de este sistema (datos no mostrados) (13).

Los resultados obtenidos en el patrón de inmunoproteínas en los hematíes de los pacientes con autoanticuerpos eritrocitarios inducidos por el IFN α difieren de los observados comúnmente en la anemia hemolítica autoinmune. En esta última se observa un porcentaje menor de casos con C3 solo y con AHAI con PAD negativa (1).

Sin embargo, la presencia de autoanticuerpos eritrocitarios de la clase IgG reactivos a 37°C en la prueba de Coombs encontrados en el grupo de pacientes con tratamiento con IFNa son compatibles con los hallazgos de la anemia hemolítica autoinmune y las inducidas por alfa-metildopa (172).

Steezman et al (173) obtuvieron una PAD positiva por presencia de IgG y C3 en el 32% de los pacientes con LMC tratados con IFNa y en todos los casos la PAI fue negativa. En nuestra serie, la frecuencia de autoanticuerpos en los hematíes fue superior debido al empleo del EIAD, que es un proceder más sensible que la PAD. Por otra parte, la detección de anticuerpos séricos con el uso de hematíes tratados con proteasas explica la identificación de los mismos en la mayoría de los pacientes.

En los pacientes con LMC las cifras de hemoglobina antes y después del tratamiento no mostraron variaciones y, aunque se observó reticulocitosis después del tratamiento, no se relacionó con manifestaciones de anemia hemolítica. Esto se ha observado en otros estudios y se ha planteado que podría estar relacionado con las propiedades del IFNa como regulador de la hematopoyesis (171,173).

La ausencia de hemólisis inmune en presencia de autoanticuerpos eritrocitarios puede estar determinada por múltiples causas, dentro de las que se encuentran la actividad biológica de los anticuerpos, la concentración de anticuerpos unidos a los hematíes *"in vivo"*, las características de los antígenos específicos, la eficiencia del sistema mononuclear-fagocítico de los pacientes, así como las interacciones idiotipos anti-idiotipos como reguladoras de la acción de los autoanticuerpos eritrocitarios (33,85). Para poder dilucidar los factores que determinan la patogenicidad de los autoanticuerpos inducidos por el IFNa es necesario proyectar estudios que tengan en cuenta la influencia de los factores antes mencionados. Este es un aspecto importante ya que la aparición de la AHAI obliga a discontinuar el tratamiento con el fármaco y por lo tanto privar a los pacientes de sus efectos beneficiosos. Al respecto, algunos autores han encontrado relación entre la presencia de autoanticuerpos en la LMC y la remisión, ya que en el 70% de los pacientes con autoanticuerpos inducidos por el IFNa se ha logrado una respuesta citogenética favorable (174). Por otra parte, la presencia de estos autoanticuerpos eritrocitarios ocasiona resultados positivos en las pruebas de compatibilidad pretransfusional no relacionada con la aloinmunización por transfusiones. Estos hallazgos deben considerarse al transfundir a los pacientes que reciben tratamiento con IFNa para definir en cada caso la relevancia de los anticuerpos eritrocitarios identificados y decidir la transfusión (175).

5.6 Anemia hemolítica autoinmune inducida por el interferón alfa

La AHAI con frecuencia es secundaria a enfermedades oncohematológicas (176). En el caso descrito no se detectaron autoanticuerpos previos al tratamiento con IFNa mediante el empleo de métodos sensibles como el EIAD. La ausencia de antecedentes de AHAI en esta paciente sugiere la inducción de la autoinmunidad eritrocitaria por el IFNa, lo cual corrobora nuestros hallazgos en los pacientes con hemopatías malignas tratados con este fármaco.

El ensayo inmunoenzimático reveló la aparición de los anticuerpos cuando estos aún no eran detectables por los métodos habituales y no se habían manifestado los signos de anemia en la paciente, por lo que en este estudio este ensayo fue de gran valor para predecir la ocurrencia de hemólisis inmune.

Hasta donde conocemos, éste es el primer caso donde se ha empleado un ensayo inmunoenzimático para la detección de los autoanticuerpos eritrocitarios que provocan AHAI antes, durante y después el tratamiento con IFNa. Estos procedimientos son útiles para la detección de bajas concentraciones de autoanticuerpos asociados a los eritrocitos y se emplean para el diagnóstico de la AHAI con prueba de Coombs negativa (9). A pesar de que este estudio se realizó en un solo caso, el seguimiento evolutivo mostró la utilidad del ensayo empleado.

Otros estudios han encontrado un patrón dual de aparición de la hemólisis que esta en relación con la presencia de autoanticuerpos previos. Los pacientes con antecedentes de hemólisis inmune desarrollan la AHAI en las primeras tres semanas de tratamiento. Sin embargo, en los que no poseen autoanticuerpos antes de la administración del IFNa las manifestaciones de anemia se evidencian a partir de los tres meses de tratamiento (177). El curso clínico de esta paciente fue similar a lo señalado previamente.

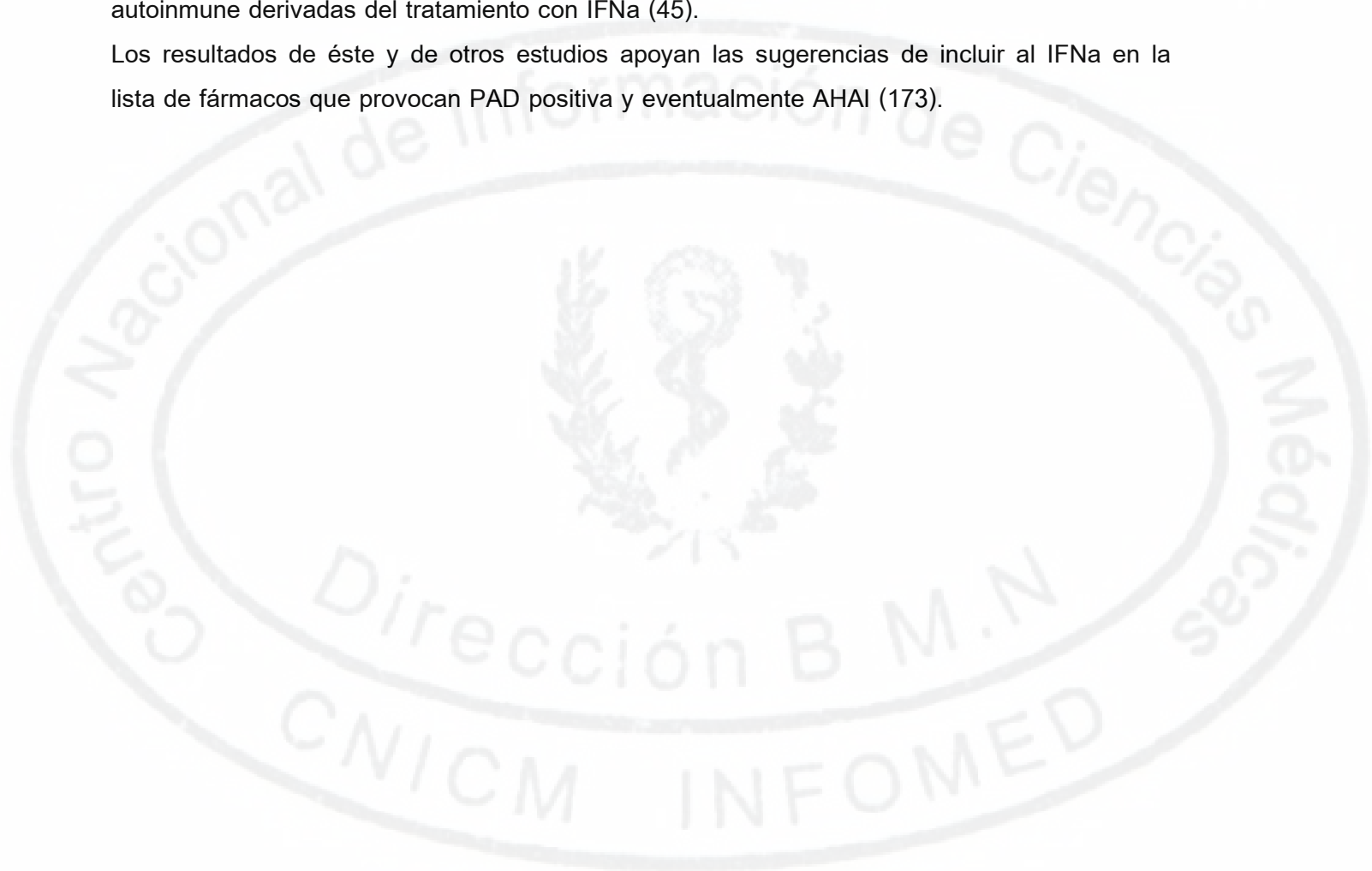
En los pacientes con AHAI inducida por el IFNa, se describe la detección en los eritrocitos de IgG, C3 o ambas, e incluso la PAD puede ser negativa (178,179) En los eritrocitos de este caso se evidenció la presencia de C3 y en el eluato se recuperaron los autoanticuerpos IgG de especificidad anti-e. Resultados similares se describen en un paciente con AHAI inducida por el IFNa en quien la PAD fue reactiva con anti-IgG (180). La especificidad anti-e es la que más frecuentemente se demuestra en los autoanticuerpos causantes de AHAI y las inducidas por alfa metildopa (13). Los hallazgos serológicos por lo tanto, son similares a los de las AHAI secundarias a IFNa.

Para explicar la autoinmunidad inducida por el IFNa se ha propuesto un mecanismo semejante al de la metildopa. Estas sugerencias se apoyan en que el IFNa modifica las membranas celulares y crea neoantígenos a partir de los propios antígenos de los grupos

Capítulo V. DISCUSIÓN

sanguíneos (180). Otros hallazgos sugieren la interacción de varios mecanismos, entre los que se destacan la expansión de células B autorreactivas y el desbalance de citocinas (181). La AHAI inducida por el IFN α es infrecuente, se diagnostica en alrededor del 1% de los casos con leucemia mieloide crónica (14). Sin embargo, los pacientes con enfermedades linfoproliferativas presentan una gran predisposición a desarrollar AHAI, por lo que se sugiere realizar un monitoreo periódico para prevenir las complicaciones relacionadas con la hemólisis autoinmune derivadas del tratamiento con IFN α (45).

Los resultados de éste y de otros estudios apoyan las sugerencias de incluir al IFN α en la lista de fármacos que provocan PAD positiva y eventualmente AHAI (173).



Capítulo VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

1. El desarrollo de un ensayo inmunoenzimático con parámetros adecuados de validación permitió su aplicación para definir el número de moléculas de IgG, IgA e IgM por hematíe en los individuos normales y en pacientes con AHAI, y resultó más sensible que las técnicas de aglutinación PAD y Mp empleadas en la detección de autoanticuerpos en los hematíes de los pacientes con AHAI.
2. Este trabajo constituye la primera comunicación en la literatura de un método inmunoenzimático para la cuantificación, en una única muestra de eluato, de todos los isotipos de las inmunoglobulinas asociadas a los hematíes. Se demostró por primera vez que los autoanticuerpos IgA están presentes en un porcentaje importante (35%) de los pacientes con AHAI.
3. La cuantificación de autoanticuerpos en los hematíes corroboró el diagnóstico clínico de la AHAI Coombs negativa por lo que constituye un método útil para el diagnóstico inmunohematológico de esta identidad.
4. En el estudio de los 135 pacientes con AHAI se determinó que los factores asociados a una mayor severidad de la hemólisis son: (1) la presencia en los hematíes de IgM coexistiendo con IgG, IgA o ambas, (2) la presencia de IgG e IgA y (3) el número de moléculas de IgG por hematíe. No se observó asociación entre la hemólisis y la presencia de en los eritrocitos de IgG3, IgG1 o de dos o más subclases de IgG.
5. Con el empleo de técnicas de aglutinación y ELISA se detectaron autoanticuerpos eritrocitarios en el 80% de los pacientes con hemopatías malignas tratados con IFN α . Este porcentaje es mayor que lo informado en la literatura en pacientes con autoanticuerpos inducidos por este fármaco. No obstante, la AHAI inducida por IFN α en pacientes con hemopatías malignas es infrecuente.

6.2 Recomendaciones

1. Introducir el ELISA cuantitativo con el uso de eluatos obtenidos por el método del éter, en los servicios provinciales de Hematología, para el diagnóstico inmunohematológico de la AHAI con prueba de Coombs negativa y para definir el patrón de inmunoproteínas en los pacientes con AHAI.
2. Profundizar en el estudio de la especificidad de grupos sanguíneos de los autoanticuerpos IgA y su relación con la hemólisis en pacientes con AHAI.
3. Evaluar la influencia de otros factores relacionados con la actividad de los autoanticuerpos en su relación con la intensidad de la hemólisis en los pacientes con AHAI
4. Diseñar un estudio longitudinal prospectivo en pacientes con AHAI para relacionar la respuesta al tratamiento con la presencia y cuantificación de los autoanticuerpos en los hematíes.
5. Proyectar estudios destinados a identificar los factores que determinan la significación clínica de los autoanticuerpos eritrocitarios inducidos por el IFN α .

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gehrs BC, Friedberg EC. Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* 2002; 69: 258-71.
2. Petz LD, Garraty G. Immune hemolytic anemias. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004
3. Brecher ME, ed Technical manual. 14th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2002.
4. Kumpel BM, Austin EB, Lee D, Jackson DJ, Judson PA, Chapman GE. Comparison of flow cytometric assays with isotopic assays of ⁵¹chromium-labeled cells for estimation of red cell clearance or survival in vivo. *Transfusión* 2000; 70: 228-239.
5. Garraty G, Arndt PA. Applications of flow cytofluorometry to red blood cell immunology. *Cytometry* 1999; 38: 259-267.
6. Lambin P, Debbia M, Beolet M, Brossard Y, Le Penec PY, Rouger P. Quantitative estimation by ELISA of IgG anti-D (RH1) antibodies in immunoglobulin preparations and in the sera of immunized donors. *Transfus Clin Biol* 2001; 8; 17-22.
7. Pruss A, Salama A, Ahrens N, Hansen A, Kiesewetter H, Koscielny J, Dórner T Immune hemolysis-serological and clinical aspects. *Clin Exp Med* 2003;3: 55-64.
- 8 Moleszewski CR, Marel CJ, Schoenborn MA. Expression cloning of a human Fc receptor for IgA. *J Exp Med* 1990; 172: 1665-1672.
9. Garraty G. Factor affecting the pathogenicity of red cell auto and alloantibodies. En: Nance S. ed. Immune destrucción of red cell. Arlington, VA: American Association of Blood Banks; 1989. p. 109-169.
10. Allison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusión in clinical medicine. 10th ed. Oxford: Blackwell Science; 1997.
11. Sokol RJ, Hudson G: Quantitation of red cell bound immunoprotein. *Transfusión* 1998; 38: 782-795.
12. Engelfriet CP, Overbecke MAM, von dem Borne AEGKr. Autoimmune hemolytic anemia. *Sem Hematol* 1992; 29: 3-12.
13. Issitt P, Anstee D. Applied blood group serology. 4 th ed. Miami: Montgomery Scientific Publications; 1998.
14. Sacchi S, Kantarjian H, O'Brien S, Cohén PR, Pierce S, Talpaz M. Immune-mediated and unusual complications during interferón alpha therapy in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1995; 13: 401-407.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 15 Donath J, Landsteiner K. Uber paroxysmale Hámoglobinurie. Munchen Med Wochenschr 1904; 51: 1590-1503.
- 16 Dacie JV, Mollison PL. Survival of normal erythrocytes after transfusión to patients with familial haemolytic anemia (acholuric jaundice). Lancet 1943; 1: 550-552.
- 17 Young LE, Miller G, Christian RM. Clinical and laboratory observations on autoimmune hemolytic disease. Am J Int Med 1951; 35: 507-517.
- 18 Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Lancet 1945; 2: 15-16.
- 19 Dacie JV. Differences in the behavior of sensitized red cells to agglutination by antiglobulin sera. Lancet 1951; 261; 954-955.
- 20 Harboe M, Müller-Eberhard HI, Fudenberg HH, Polley MJ, Mollison PL. Identification of the components of complement participating in the anti-globulin reaction. Immunology 1963; 6: 412-420.
- 21 Case J, Ford DS, Chung A, Collins R, Kochman S, Mazda T et al. International reference reagents: antihuman globulin. Vox Sang 1999; 77: 121-127.
- 22 Gilliland BC. Blood cells: autoimmune hemolytic anemia. En: Rose NR, Mackay IR, editors. The autoimmune diseases: Academic Press; 1998. p. 245-268.
- 23 Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. The pathology of autoimmune haemolytic anemia. J Clin Pathol 1992; 45: 1047-1052.
- 24 Ehrlich P, Morgenroth J. On hemolysins. En: Himmelweit F, editors. The collected papers of Paul Ehrlich: Oxford: Pergamon Press; 1900. p. 205-255.
- 25 Schwarz HP, Dorner F. Karl Landsteiner and his major contributions to haematology. Br J Haematol 2003; 121: 556-565.
- 26 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Saunders Editions; 2000.
- 27 Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. New Eng J Med 2001; 345: 340-350.
- 28 Bachmann MF, Manfred K. On the role of the innate immunity in autoimmune disease. J Exp Med 2001; 193: 47-50.
- 29 Mack P, Freedman J. Autoimmune hemolytic anemia: a history. Transf Med Rev 2000; 14: 223-233.
- 30 Dighiero G, Rose NR. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. Immunol Today 1999; 20: 423-428.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 31 Spalter SH, Kaveri SV, Bonnin E, Mani JC, Cartron JP, Kazatchkine MD. Normal human serum contains natural antibodies reactive with autologous ABO blood group antigens. *Blood* 1999; 93: 4418-4424.
- 32 Stahl D, Lacroix-Desmazes S, Heudes D, Mouthon L, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Altered control of self-reactive IgG by autologous IgM in patients with warm autoimmune hemolytic anemia *Blood* 2000; 95: 328-335.
- 33 Mausoredis SP, Branks MJ, Victoria EJ. Antiidiotypic IgG crossreactive with Rh alloantibodies in red cell autoimmunity. *Blood* 1987; 70: 710-715.
34. Stahl D, Sibrowski W. Regulation of the immune response by natural IgM: lessons from warm autoimmune hemolytic anemia. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1871-1880.
- 35 Fabiolo E, Toriani-Terenzi C. Th1 and Th2 cytokine modulation by IL-10/IL-12 imbalance in autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). *Autoimmunity* 2002; 35: 39-44.
36. Barcellini W, Clerici G, Montesano R, Taioli E, Morelatti F, Rebulli P, et al. In vitro quantification of anti-red antibodies and cytokines in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2002; 71: 177-183.
37. Toriani-Terenzi C, Pozzetto U, Bianchi M, Fagiolo E. Cytokine network in autoimmune haemolytic anaemia: new probable targets for therapy. *Cancer Detect Prevent* 2002; 26: 292-298.
- 38 Barker RN. Controlling autoimmunity. Lesson from responses to red blood cells. *Comp Clin Path* 2002; 11:8-13
- 39 Karakantza M, Mouzaki A, Theodoropoulou M, Bussel JB, Maniatis A. Th1 and Th2 cytokines in patients with Evans syndrome and profound lymphopenia. *Brit J Haematol* 2000; 110: 968-970
40. Dacie JV. The immune haemolytic anaemias: a century of exciting progress in understanding. *Brit J Haematol* 2001; 114: 770-785.
41. Dacie JV. The haemolytic anaemia. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999.
- 42 Barker RN. Anemias associated with immune responses. En: Feldman BF, Zinhl JG, Jain NC, editors. *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2000. p. 169-177.
43. Genty I, Michel M, Hermine O, Schaeffer A, Godeau B, Rochant H. Characteristics of autoimmune hemolytic anemia in adults: retrospective analysis of 83 cases. *Rev Med Intern* 2002; 23: 901-909.
- 44 Rochant H Autoimmune hemolytic anemia. *Rev Prat* 2001; 51: 1534-1541.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

45. Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000; 95: 2786-2792.
46. Barcellini W, Montesano R, Clerici G, Zaninoni A, Imperiali FG, Calori R, et al. In vitro production of anti-rbc antibodies and cytokines in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2002; 71: 177-183.
47. Telen MJ. Blood group antigens on complement receptor/regulatory proteins. *Transfus Med Rev* 1999; 9: 20-28.
48. Cartron JP, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 163-169.
49. Daniels G. Functional aspects of red cell antigens. *Blood Rev* 1999; 13: 14-35.
50. Garraty G. Pathophysiology of autoimmune hemolytic anemia. *AABB: Annual Meeting*; 2001: 505-511.
51. Dijstelbloem HD, van de Winkel JGJ, Kallenberg GM. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol* 2001; 22: 510-515.
52. Kumpel BM. Clearance of red cells by monoclonal IgG3 anti-D in vivo is influenced by the Fc-gamma-RIIIA-V/F158 polymorphism. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 25s.
53. Douglas R, Rowthome NV, Scheider JV. Some quantitative aspects of human monocyte erythrophagocytosis and rosette assays. *Transfusión* 1985; 25: 535-539.
54. Garraty G. Autoimmune hemolytic anemia. En: Garraty G, editor. *Immunobiology of Transfusión Medicine*. New York: Marcel Dekker; 1994.
55. Engelfriet CP. The immune destruction of red cells. *Transfus Med* 1992; 2:1.
56. Kumpel BM, van de Winkel JGJ, Westerdal NAC. Antigen topography is critical for interaction of IgG2 anti-red-cell antibodies with Fcγ receptors. *Br J Haematol* 1996; 94: 175- 183.
57. Garraty G. Effect of cell-bound proteins on the in vivo survival of circulating blood cells. *Gerontol* 1991; 37: 68-94.
58. van Egmond M, Damen CA, van Sriel AB, Vidarsson G, van Garderen E. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 2001; 22: 205-211.
59. van Zandbergen G, Westerhuis F, Mohamad NK, Jan GJ, van de Winkel JGJ, Odaha MR, van Kooten C. Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcαRI/CD89) triggers FcRγ-chain-dependent shedding of soluble CD89. *J Immunol* 1999; 163:5806-12.
60. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R, Booth JR. Autoimmune hemolytic anemia due to IgA class autoantibodies. *Immunohematology* 1996; 12: 14-19.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

61. Clark DA, Dessypris EN, Jenkins DE Jr, Krantz SB. Acquired immune hemolytic anemia associated with IgA erythrocyte coating: investigation of hemolytic mechanisms. *Blood* 1984; 64: 1000-1005.
62. Shen L. Receptors for IgA on Phagocytic cells. *Immunol Res* 1992; 11: 273-282.
63. Susuki S, Amano T, Mitsunaga M. Autoimmune hemolytic anemia associated with IgA autoantibody. *Clin Immunol Immunopathol* 1981; 21: 247-256.
64. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R, Booth JR, Hook V. IgA red cell autoantibodies and autoimmune hemolysis. *Transfusión* 1997; 37: 175-181.
65. Pfaffenbach G, Lamm ME, Gigli I. Activation of the guinea pig alternative complement pathway by mouse IgA immune complexes. *J Exp Med* 1982; 155: 231-247.
66. Nikolova EB, Tomana M, Russell MW. The role of the carbohydrate chains in complement (C3) fixation by solid-phase bound human IgA. *Immunology* 1994; 82: 321-327.
67. Atkinson JP, Frank MM. Studies on the in vivo effects of antibody. Interaction of IgM antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes in man. *J Clin Invest* 1974; 54: 339-348.
68. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. Evidence that warm IgM erythrocyte autoantibodies can cause haemolysis independently of complement *Transfus Med* 1992; 2: 79.
69. Salama A, Mueller-Eckhard C. Autoimmune haemolytic anaemia in childhood associated with no complement binding IgM autoantibodies. *Br J Haematol* 1987; 65: 67-71.
70. Araguas C, Martin-Vega C, Massagué I, de la Torre FG. Complete warm hemolysins producing an autoimmune hemolytic anemia. *Vox Sang* 1990; 58: 125-126.
71. Oldenborg PD, Gresham HD, Chen Y, Izui S, Lindberg PI. Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood* 2002; 99: 3500-3504.
72. Oldenborg PD, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg PI. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000; 288: 2051-2054.
73. Stahl LD, Kaveri K. Anti-rbc IgG autoantibodies of patients with warm autoimmune haemolytic anaemia and natural anti-rbc IgG autoantibodies of healthy individuals. *Scand J Immunol* 2000; 52: 190-199.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 74 Kay MM: Generation of senescent cell antigen on old cells initiates IgG binding to a neoantigen. *Cell Mol Biol Review*, 1999; 46: 131-53
75. Homing R, Lutz HU. Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-band 3 and anti-spectrin antibodies. *Exp Gerontol* 2000; 35: 1025- 1044
76. Kiefer CR, Zinder LM. Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 113-116.
- 77 Manny N, Zelig O. Laboratory diagnosis of autoimmune cytopenias. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 414-419.
78. Issitt PD, Combs MR, Bumgamer DJ, Alien J, KirWand A, Melroy-Carawan H. Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies. *Transfusión* 1996; 36: 481-486.
79. Stoeber Z, Stoeber D, Green L, Geltner D. The role of anticardiolipin autoantibodies in the pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1993; 20: 2058-2061.
80. Gilliland BC, Baxter E, Evans RS. Red-cell antibodies in acquired hemolytic anemia with negative antiglobulin serum test. *N Engl J Med* 1971; 285: 252-256.
81. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R, Jalihal S, Paul B. Direct Coombs test-negative autoimmune hemolytic anemia and low-affinity IgG class antibodies. *Immunohematology* 1997; 13: 115-118.
82. Hundric Z. Positive direct antiglobulin test in blood donors. *Transfus Clin Biol* 2000; 8: 182s.
83. Bellia M, Georgopoulos J, Tsevrenis V, Nomikou E, Vgontza N, Kontopoulou-Griva I. The investigation of the significance of a positive direct antiglobulin test in blood donors. *Immunohematology* 2002; 18: 78-81.
84. Saif MW. HIV-associated autoimmune haemolytic anemia: an update. *AIDS Patient Care STDs* 2000; 15: 217-219.
85. Siegel DL. Factors which influence the pathogenicity of rbc antibodies. Theory and reality. *AABB: Annual Meeting*; 2001: 9-11.
86. Rubino M, Kavitsky DM, Nance S: Serologic testing in autoimmune haemolytic anemia (AIHA) with negative direct antiglobulin test (DAT). *Transfusión* 2002, 42: 104S.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

87. Gilliland BC, Leddy JP, Vaughan JH. The detection of cell-bound antibody on the complement coated-human red cell. *J Clin Invest* 1970; 49: 898-906.
88. Rosse W F. Quantitative immunology of immune hemolytic anemia. I. The fixation of C1 by autoimmune antibody and heterologous anti-IgG antibody. *J Clin Invest* 1971; 50: 727-733.
89. van de Winkei JGJ, Tax WJM, Groeneveld A. A new radiometric assay for the quantitation of surface-bound IgG on sensitized erythrocytes. *J Immunol Methods* 1998; 108: 95-103.
90. Kiruba R, Han P. Quantitation of red cell-bound immunoglobulin and complement using enzyme-linked antiglobulin consumption assay. *Transfusión* 1988; 28: 519-524.
91. Atrah HI, Templeton JG, Crawford RJ. Passive haemagglutination inhibition for quantitation of red cell associated IgG. *J Clin Pathol* 1987; 40: 494-499.
92. Szymanski IO, Araszklewicz P. Quantitative studies on the D antigen of red cells with the D^u phenotype. *Transfusión* 1989; 29: 103-105.
93. Merry AH, Thompson EE, Rawlinson VI, Stratton F. A quantitative antiglobulin test for IgG for use in blood transfusion serology. *Clin Lab Haematol* 1982; 4: 393-402.
94. Wang Z, Shi J, Zhou Y, Ruan C. Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 2001;73:188-93.
95. Hadley AG, Zupanska B, Kumpel BM. The glycosylation of red cell autoantibodies affects their functional activity *in vitro*. *Br J Haematol* 1995; 91: 587-594.
96. Lynen R, Neuhaus R, Schwarz DWM. Flow cytometric analyses of the subclasses of red cell IgG antibodies. *Vox Sang* 1995; 69: 126-130.
97. Bruner KW, Kissling CW. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting IgG sensitized erythrocytes. *Transfusión* 1979; 19: 773-777.
98. Achargui S, Benchemsi N. A quantitative determination of IgG anti-D subclasses by Elisa in hemolytic disease of the newborn. *Transfus Clin Biol*. 2003; 10: 284-91.
99. Dubarry M, Charron C, Habibi B. Quantitation of immunoglobulin classes and subclasses of autoantibodies bound to red cells in patients with and without hemolysis. *Transfusión* 1993; 33: 466-471.
100. Normansell DE. Antibody-based and molecular methods. En: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, editors. *Manual of Clinical laboratory Immunology*. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 14-23
101. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, et al. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor* 2000; 9: 13-18

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

102. Lynne C. Immunodiagnosis and monitoring disease. En: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, editors. Manual of Clinical laboratory Immunology. Washington DC: ASM Press; 2002. p 1065-1081.
103. Borrow R, Richmond P, Kaczmarek EB, Iverson A, Martín SL, Findlow J, et al. Meningococcal serogroup C-specific IgG antibody responses and serum bactericidal titres in children following vaccination with a meningococcal A/C polysaccharide vaccine. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2000; 28: 79-85.
104. Harlow E, Lañe D, editors. Immunoassays. En: Antibodies. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998. p. 553-612.
105. Smalley D, Aller R. Automated immunoassay analyzers. *CAP Today* 2001: 53-84.
106. Carolyn S, Fedkam P, Carey JL. Standardization of immunoassay methodologies. En: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, editors. Manual of Clinical laboratory Immunology. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 1215-1226.
107. Ochoa R. A new format ELISA for the detection of HBsAg. *Biología Aplicada* 1998; 15: 250-253.
108. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, et al. Sensitización de placas para ensayos inmunoenzimáticos con antígenos vacunales. *VacciMonitor* 2001 ;3: 14-17
109. Sockoll LJ, Chan DW. Clinical analyzers. *Immunoassays. Anal Chem* 1999; 71: 356-362.
110. Labsystems Research Centre. Studies on immobilization of biological materials. enhanced adsorption to modified polystyrene. Finland: Labsystems; 1998.
111. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, et al. Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor* 1999; 10: 2-6.
112. Hamilton RG. Laboratory management. En: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, editors. Manual of Clinical laboratory Immunology. Washington DC: ASM Press, 2002. p. 1209-1214.
113. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Validation of analytical assays. Geneva: WHO; 1997. p. 65-95.
114. Garratty G, Amdt P, Prince HE, Shulman IA. The effect of methyl dopa and procainamide on suppressor cell activity in relation to red cell autoantibody production. *Br J Haematol* 1993; 81: 579-584.
115. Roth MS, Foon KA. Alpha interferon in the treatment of hematologic malignancies. *Ann J Med* 1986, 81: 871-879.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

116. Ulvestad E, Berentsen S, Mollnes TE. Acute phase hemolysis in chronic cold agglutinin disease *Scand J Immunol* 2001; 54: 239-242.
117. Docket No 84-S-0182. Recommended methods for evaluating potency, specificity and reactivity of anti-human globulin. Center for Biological Evaluation and Research: Bethesda MD; 1992.
118. Delores M, editor. *Immunohematology: methods and procedures*. 1 st ed. American Red Cross; 1993.
119. Spindler JH, Kluter H, Kerowgan M. A novel microplate agglutination method for blood grouping without the need for centrifugation. *Transfusión* 2001;40:627-32.
120. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Single radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins. *Int Prot Biol Fluids*, 11 th Colloquium. Oxford: Pergamon Press; 1964. p. 370-373.
121. Sokol RJ, Hewitt S, Booker DJ, Stamps R, Bodth JR. An enzyme linked direct antiglobulin test for assessing erythrocyte bound immunoglobulin. *J Immunol Meth* 1988; 106: 117-119.
122. Hazlehurst DD, Hudson G, Sokol RJ. A quantitative ELISA for measuring red cell-bound immunoglobulins. *Acta Haematol* 1996;95:112-116.
123. Lambin P, Ahaded A, Debbia M, Lauroua P, Rouger P. An enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of IgG anti-D and IgG subclasses in the sera of alloimmunized patients. *Transfusión* 1999; 38: 252-261.
124. Jeje MO, Blajchman MA, Steeves K, Horsewood P, Kelton JG. Quantitation of red cell-associated IgG using an immunoradiometric assay. *Transfusión* 1984; 24: 473-476.
125. Timuragaoglu A, Duman A, Ongut G, Saka O, Karadogon I. The significance of autoantibodies in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000; 40: 1-2.
126. Garraty G, Postoway N, Nance S, Brunt D. The detection of IgG on the red cells of "Coombs negative" autoimmune hemolytic anemias. *Transfusion* 1982; 22: 430.
127. Sokol RJ, Hewitt S, Booker DJ, Bailey A. Erythrocyte autoantibodies, subclasses of IgG and autoimmune haemolysis. *Autoimmunity* 1990;6:99-104.
128. Dittmar K, Procter JL, Cipolone K, Njoroge JM, Miller J, Stroncek DF. Comparison of DATs using traditional tube agglutination to gel column and affinity column procedures. *Transfusión* 2001 ;41: 1258-1262.
129. Alvarez A, Rives S, Montoto S, Sanz C, Pereira A. Relative sensitivity of direct antiglobulin test, antibody elution and flow cytometry in the serologic diagnosis of immune hemolytic transfusion reactions. *Haematol* 2000; 85: 186-188.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

130. Fabijanska-Mitek J, Lopienska H, Zupanska B. Gel test application for IgG subclass detection in auto-immune haemolytic anaemia. *Vox Sang* 1997; 72: 233-237.
131. Sokol RJ, Hewitt S, Booker DJ, Stamps R. Enzyme linked direct antiglobulin test in patients with autoimmune haemolysis. *J Clin Pathol* 1985; 38: 912-914.
132. Sokol RJ, Hewitt S, Booker DJ, Bailey A. Red cell autoantibodies, multiple immunoglobulin classes and autoimmune hemolysis. *Transfusión* 1990; 30: 714-717.
133. Szymanski IO, Walsh WV, Colvin GA, Rososhansky S. IgM antibodies in warm AIHA. *Blood* 2000, 96: 111b.
134. Ellis JP, Sokol RJ. Detection of IgM autoantibodies in eluates from red blood cells. *Clin Lab Haematol* 1990; 6: 99-104.
135. Wright MS, Smith LA. Laboratory investigation of autoimmune hemolytic anemias. *Clin Lab Sd* 1999; 12: 119-122.
136. Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusion. *Transfusión* 2002; 42: 37-43.
137. Kennedy JR. Modulation of sickle cell crisis by naturally occurring band 3 specific antibodies. *Med Sd Monit* 2002;8:10-13.
138. Lee GR. Anemia: a diagnostic strategy. En: Lee GR, Foerster J, Kukens J, Parasken F, Greer JP, Rodgers GM, editors. *Wintrobe's clinical hematology*. 10 ed. Baltimore: Williams & Williams; 1998. p. 908-940.
139. Tissot JD, Kiener C, Burnand B, Schneider P. The direct antiglobulin test: still a place for the tube technique? *Vox Sang* 1999; 77: 223-226.
140. Fabijanska-Mitek J, Namirska-Krzton H, Seyfried H. The value of gel test and ELAT in autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol* 1995; 17: 311-316.
141. Judd WJ. The clinical insignificance of a positive direct antiglobulin test. En: Shirey RS, ed. *Direct antiglobulin test in the new millennium*. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 1999.
142. Cid J, Ortin X, Beltran V, Escoda L, Contreras E, Elies E, et al. The direct antiglobulin test in a hospital setting. *Immunohematology* 2003; 19:16-18.
143. Garratty G. The clinical significance of a positive direct antiglobulin test. En: Shirey RS, editor. *Direct antiglobulin test in the new millennium*. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 1999.
144. Sokol RJ, Hewitt S, Booker DJ, Stamps R. Small quantities of erythrocyte bound immunoglobulins and autoimmune haemolysis. *J Clin Pathol* 1987; 40: 254-257.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

145. Braga GW, Bordin JO, Moreira JG, Kuroda A. Laboratory diagnosis of auto-immune hemolytic anemia: characteristics of the manual direct test of polybrene. *Rev Assoc Med Bras* 1998;44:16-20.
146. Harmening DM. *Clinical Hematology and Fundamentals of Homeostasis*. 4th ed. Philadelphia, PA: F.A. Davis Company; 2001.
147. Kondo H, Oyamada T, Morí A, Sumi H, Kurosu K, Kajii E. Direct-antiglobulin-test-negative immune haemolytic anaemia and thrombocytopenia in a patients with Hodgkin's disease. *Acta Haematol* 2001; 105: 233-236.
148. Kerr R, Rawlinson PS, Cachia PG. Direct antiglobulin test negative, non spherocytic autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol* 2000; 22: 265-367.
149. Lai M, Rumi C, D Onofrio G, Voso MT, Leone G. Clinically significant autoimmune hemolytic anemia with a negative direct antiglobulin test by routine tube test and positive by column agglutination method. *Immunohematology* 2002; 18:109-113.
150. Salama A, Mueller-Eckhardt C, Bhadi S. A two-stage immunoradiometric assay with ¹²⁵I-staphylococcal protein A for the detection of antibodies and complement on human blood cells. *Vox Sang* 1985;48:239-245.
151. Meyer F, Garin L, Smati C, Gaspard M, Giannoli C, Rigal D. Application du gel test utilisant une antiglobuline anti-IgA au diagnostic immunologique d'anémie hémolytique auto-immune á test de Coombs direct négatif. *Transfus Clin Biol* 1999;6:221-226.
152. Talano JAM, Johnson ST, Friedman KD, et al.: Serologic characteristics of three cases of IgA mediated autoimmune hemolytic anemia confirmed by flow cytometry. *Blood* 2002, 100:283a.
153. Garratty G. Autoimmune hemolytic anemia. En: Garratty G, editor. *Immunobiology of transfusion medicine*. New York: Marcel Dekker;1994: 493-521.
154. Sokol RJ, Stamps R, Booker DJ. IgG2 class red cell antibodies and autoimmune haemolysis. *Haematol* 2001; 31:1-6.
155. Freedman J. The significance of complement on the red cell surface. *Transfus Med Rev* 1987; 1: 58-70.
156. Garratty G, Amdt P, Domen R, Clarke A, Sutphen-Shaw D, Clear J et al. Severe autoimmune hemolytic anemia associated with IgM warm autoantibodies directed against determinants on or associated with glycophorin A. *Vox Sang* 1997; 72:124-130.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

157. Nowak-Wegrzyn A, King KE, Shirey RS, Chen AR, McDonough C, Lederman HM. Fatal warm autoimmune hemolytic anemia resulting from IgM autoagglutinins in an infant with severe combined immunodeficiency. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 2001 ;23: 250-252.
158. Becker EA, van Guldener C, Overbeeke MA, van Rhenen DJ. Intravascular hemolysis by IgA red cell autoantibodies. *Neth J Med* 2001; 58: 204-207.
159. Suankratay C, Zhang Y, Jones D, Lint TF, Gewurz H. Enhancement of lectin pathway haemolysis by immunoglobulins. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 435-441.
160. Janvier D, Sellami F, Missud F, Fenneteau O, Vilmer E, Cartron J, et al. Severe autoimmune hemolytic anemia caused by a warm IgA autoantibody directed against the third loop of band 3 (rbc anion-exchange protein 1). *Transfusión* 2002;42: 1547-1552.
161. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R, Murphy F, Booth JR. Severe autoimmune haemolytic anaemia due to strong IgA class autoantibodies showing Rh specificity. *Transfusión Medicine* 1994; 4 (suppl 1): 47.
162. Bardill B, Mengis C, Tschopp M, Willemin WA. Severe IgA-mediated auto-immune haemolytic anaemia in a 48-yr-old woman. *Eur J Haematol* 2003; 70:1-4 .
163. van der Meulen FW, de Bruin HG, Goosen PCM. Quantitative aspects of the destruction of red cells sensitized with IgG1 autoantibodies: an application of flow cytometry. *Br J Haematol* 1980; 46: 47-56.
164. Garratty G, Nance SJ. Correlation between in vivo hemolysis and the amount of red cell-bound IgG measured by flow cytometry. *Transfusión* 1990; 30: 617-621.
165. Chaplin H. Red cell bound immunoglobulin as a predictor of severity of hemolysis in patient with autoimmune hemolytic anemia. *Transfusión* 1990; 30: 576-578.
166. Debbia M, Lambin P. Measurement of anti-D intrinsic affinity with unlabeled antibodies. *Transfusión* 2004;44:399-406.
167. Li Z, Shao Z, Xu Y, Shen L, Chen G, Zhang Y, et al. Subclasses of warm autoantibody IgG in patients with autoimmune hemolytic anemia and their clinical implications. *Chin Med J* 1999; 112: 805-808.
168. Podberezin M, Levina A, Romanova L, Margolin O, Nasibov O, Pivnik AV. Quantitation of red cell-bound immunoglobulins and complement in lymphoma patients. *Immunohematology* 2000; 16: 147-153.
169. Raanani P, Ben-Bassat I. Immune-mediated complications during interferon therapy in hematological patients. *Acta Haematol* 2002; 107: 133-144.
170. Blanco P, Palucka AK, Gilí M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001; 294: 1540-1543.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

171. Toba E, Kafkova A, Stecova N, Fricova M, Guman T, Svorcova E. Immune-mediated complications utilizing interferón alpha therapy in chronic myelogenous leukemia. *Neoplasma* 2002; 49: 91-94.
172. Wautier JL, Rouger P. Drug-induced hemolytic anemia. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 377-380.
173. Steegman JL, Pinilla I, Requena MJ, de la Cámara R, Granados E, Fernández MJ, et al. The direct antiglobulin test is frequently positive in chronic myeloid leukemia patients treated with interferon- α . *Transfusión* 1997; 37: 446.
174. Labardini-Méndez JR, Cortés J, Talpaz M, Velázquez A. Leucemias crónicas. *Invest Clin* 1995; 47:94-102.
175. Buetens OW, Ness PM. Red blood cell transfusión in autoimmune hemolytic anemia. *Curr Opin Hematol* 2003; 10: 429-433.
176. Littlewood T, Mandelli F. The effects of anemia in hematological malignancies: more than a symptom. *Sem Oncol* 2002; 29: 40-44.
177. Andriani A, Bibas M, Callea V, De Rezo A, Chiurazzi F, Marceno R, et al. Autoimmune hemolytic anemia during alpha interferón treatment in nine patients with hematological disease. *Haematol* 1996; 81: 258-260.
178. Akard LP, Hoffman R, Elias L, Salets JH. Alpha interferón and immune hemolytic anemia. *Ann Intern Med* 1986, 105: 306.
179. Fomaciam G, Bassi C, Beltrami M, Castagineti E, Maccari S, Plancher AC. Hemolytic anemia secondary to interferón treatment for chronic B hepatitis. *J Gastroenterol* 1991; 13: 596-597.
180. Barbolla L, Paniagua C, Outeriño J, Prieto E, Sánchez-Fayos J. Haemolytic anemia due to the alpha interferón treatment: a proposal mechanism. *Vox Sang* 1993; 65: 156-157.
181. Caligaris-Cappio F, Bertero MT, Bergul L. Autoimmunity, autoimmune diseases and lymphoproliferative disorders. *Haematol* 1994; 79: 487-492.

ANEXO

CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION :

El que suscribe:

está de acuerdo en ser incluido en el estudio: DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ERITROCITARIOS EN LA ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE. Así mismo estoy de acuerdo que se me practiquen las investigaciones clínicas, de laboratorio y la toma de muestra para el estudio. Para dar este consentimiento he recibido por parte del investigador principal una explicación amplia de mi enfermedad, como sigue:

La anemia hemolítica autoinmune se caracteriza por un estado anormal del sistema de defensa del organismo conocido como sistema inmune donde el individuo por causas aun no bien determinadas produce anticuerpos contra sus propios glóbulos rojos, por lo que aparece anemia. Se me explicó que el diagnóstico de la enfermedad permite poner tratamiento para mejorar la anemia y que este trabajo profundiza en el estudio de la misma, lo cual pudiera determinar en nuevos avances para el diagnóstico y el tratamiento habitual.

Tengo además el derecho de conocer los resultados que se obtengan en la investigación, los que se manejarán con absoluta confidencialidad.

Mi consentimiento es absolutamente voluntario y el hecho de no aceptar no tendría consecuencia alguna en mis relaciones con el hospital o con el personal de atención, los que continuarán asistiéndome según las normas de conducta habitual de esta instalación hospitalaria y de nuestra sociedad. En cualquier momento puedo retirarme del estudio, sin que sea necesario explicar las causas y esto tampoco afectará mi relación con nuestra institución.

Y para que así conste y por mi libre voluntad, firmo el presente consentimiento a los ----- días del mes de _____ del _____

Nombre del paciente: _____

Firma: _____

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.

ADCC Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (Citotóxicidad celular dependiente de anticuerpos)

AHAI: Anemia hemolítica autoinmune

ASE: Antígeno de senescencia eritrocitaria

CV: Coeficiente de variación

C3bi: Fragmento del complemento C3 inactivado

DE: Desviación estándar

DO: Densidad óptica

D-L: Donath-Landsteiner

EIAD: Ensayo inmunoenzimático de antiglobulina directa

ELISA: Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (Ensayo inmunoenzimático en fase sólida)

E: Especificidad

HM: Hemopatías malignas

HPF: Hemoglobinuria paroxística a frigore Igs: Inmunoglobulinas

HLA: Human Leukocytes Antigens (Antígenos de los leucocitos humanos)

Ig: inmunoglobulina

Igsinmunoglobulinas

IFN α : Interferón alfa

IFN γ : Interferón gamma

IL: interleucina

K-S: Kolmogorov-Smirnov

LMC: Leucemia mieloide crónica

Mp: Técnica de microplacas

OPD: Orto-fenilendiamina

PAD. Prueba de antiglobulina directa (Coombs directo)

PAI: Prueba de antiglobulina indirecta (Coombs indirecto)

PEG: Polientilenglicol

PVP: Polivinil pirrolidona

RIA: Radioinmunoanálisis

RC: Receptor del complemento

RFca: Receptor para el fragmento Fe alfa (IgA)

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

RFcy: Receptor para el fragmento Fe gamma (IgG)

R²: Coeficiente de determinación

r; coeficiente de correlación

RC: Receptor del complemento

SAF: Síndrome de aglutininas frías

SSBF Solución salina balanceada de fosfato

SSBF-Tw-0.05: Solución salina balanceada con fosfato y Tween 20 al 0.05%

SSBF-Tw al 0.2%: Solución salina balanceada con fosfato y Tween 20 al 0.2%

SSBF-Tw-A: Solución salina balanceada con fosfato, Tween 20 al 0.05% y albúmina bovina al 0.4%

S: Sensibilidad

Suero antiglobulina humana: Suero de Coombs

Th: T helper (células T colaboradoras)

TPD: Técnica manual de polibreno directa

VPP Valores predictivos positivos

VPN Valores predictivos negativos

