

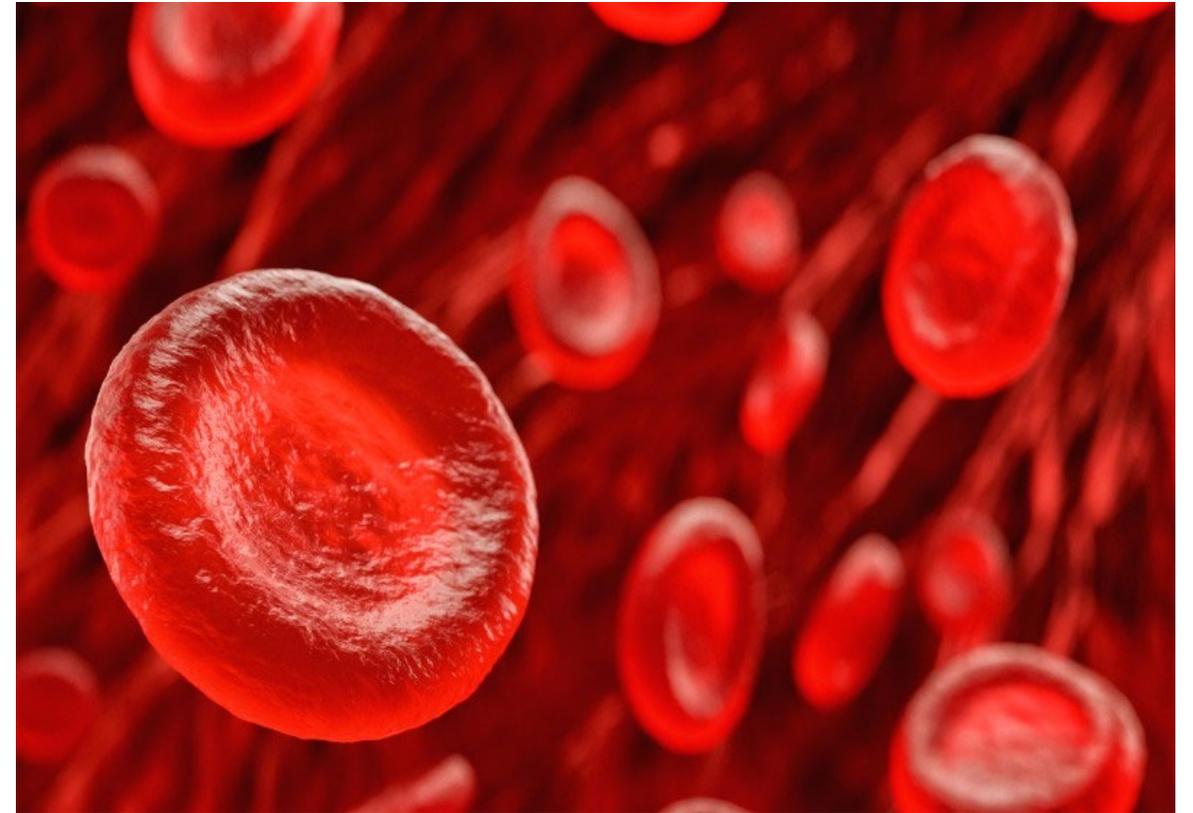
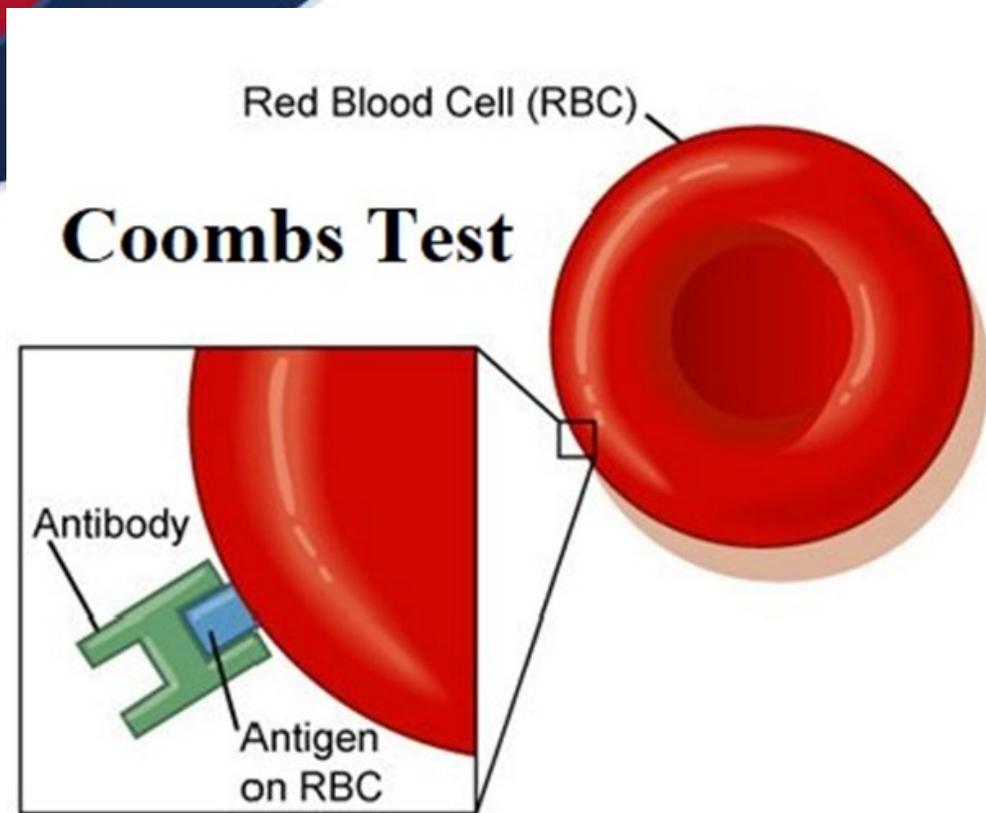


**13° CONGRESO COLOMBIANO &
19° CONGRESO IBEROAMERICANO DE
BANCOS DE SANGRE, MEDICINA
TRANSFUSIONAL Y TERAPIA CELULAR**

—  **CONECTADOS CON EL PACIENTE**  —

Octubre 31 a Noviembre 3 del 2024
Bogotá Colombia, Hotel Sheraton





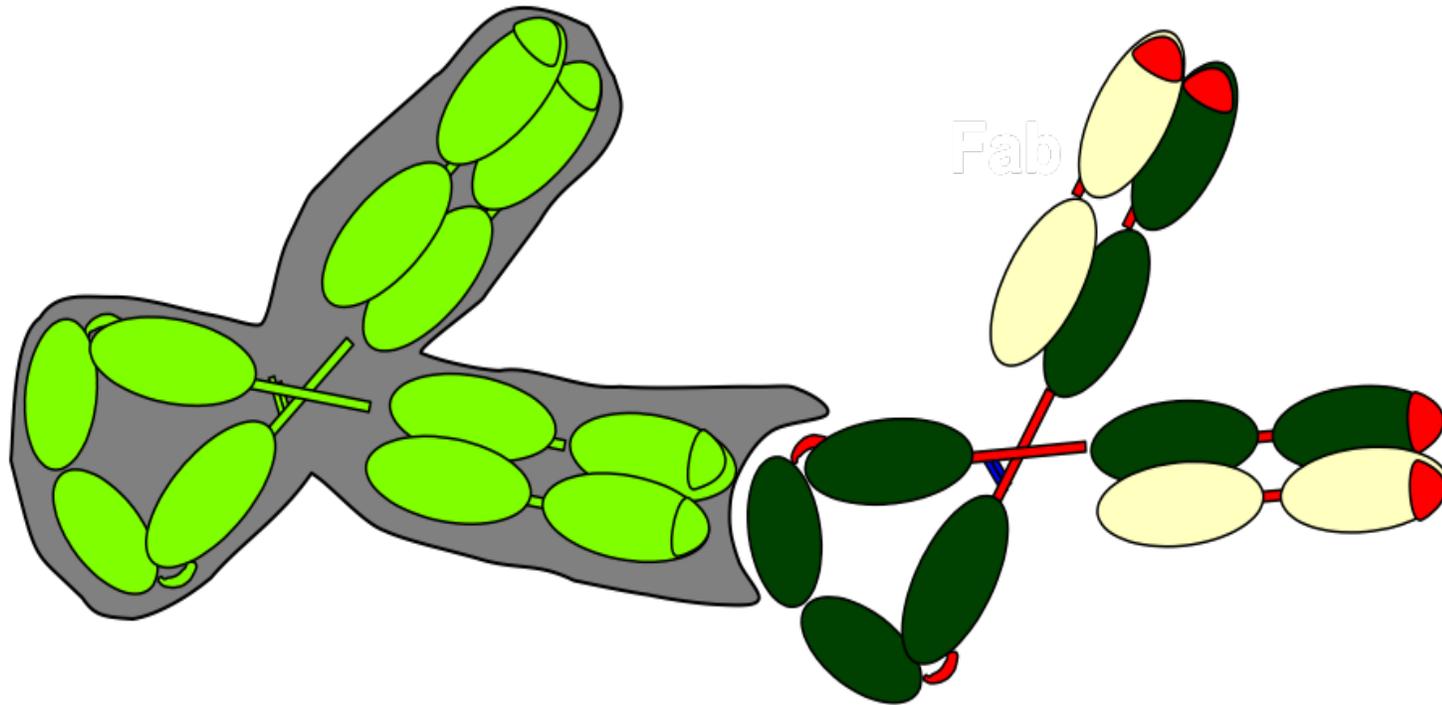
PRUEBA DE COOMBS. UTILIDAD Y LIMITACIONES

Dra. Virginia Callao Molina. Charla ACOBASMET. 2024



Suero de Coombs

(antiglobulina humana)

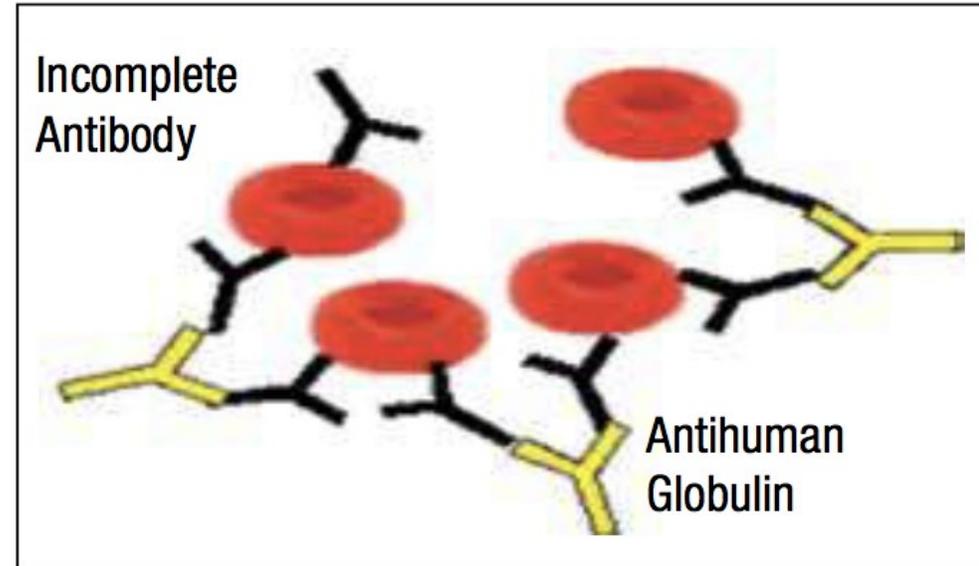
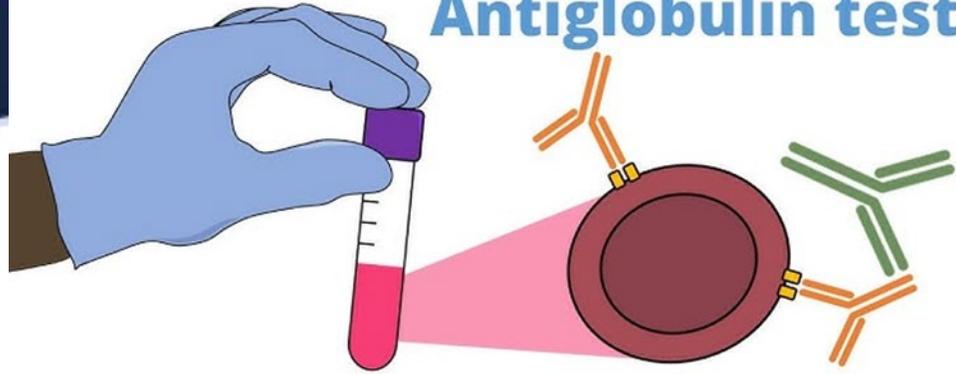


COOMBS, MOURANT Y RACE. 1945



Coombs test

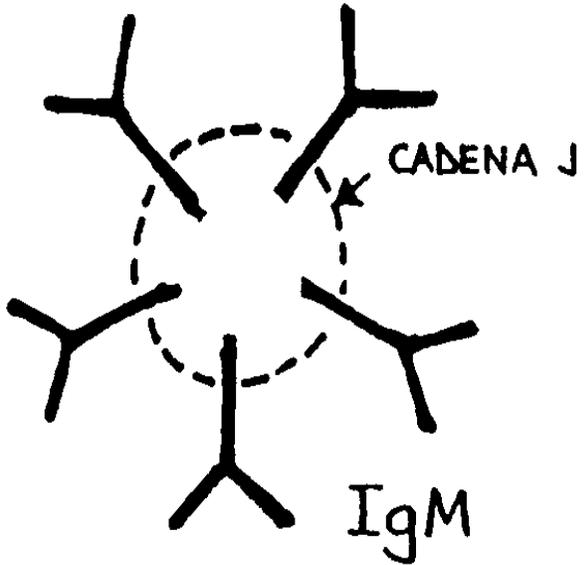
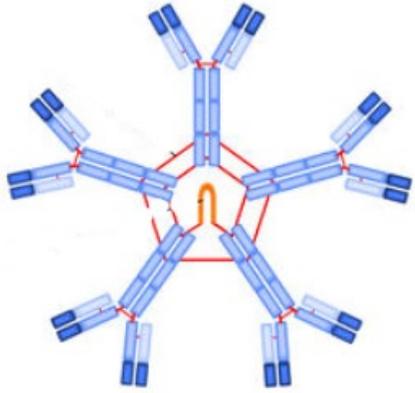
Antiglobulin test



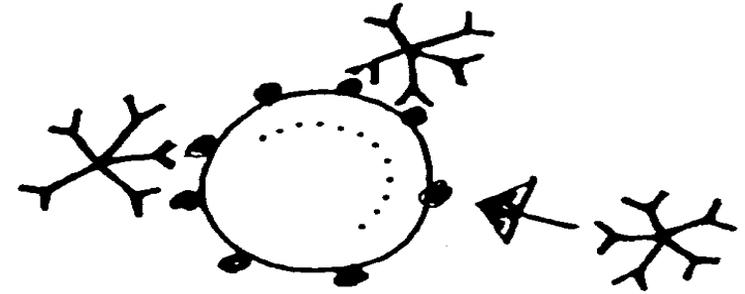
Permite el estudio de anticuerpos incompletos (IgG), incapaces de producir aglutinación eritrocitaria



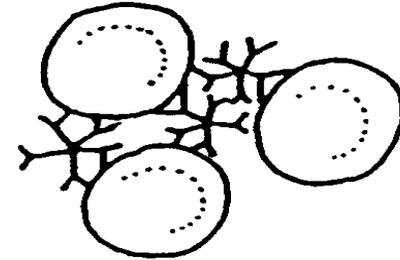
IgM

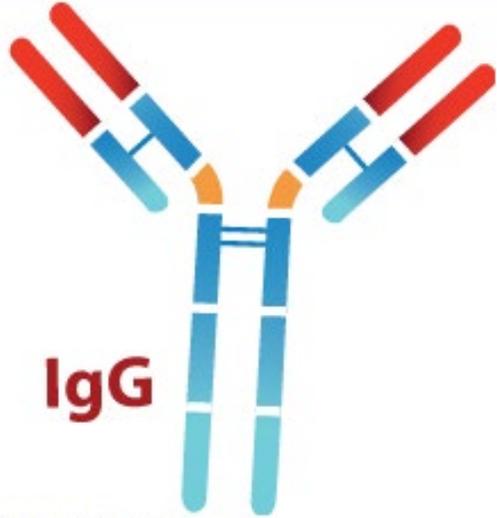


SENSIBILIZACION



AGLUTINACION





IgG

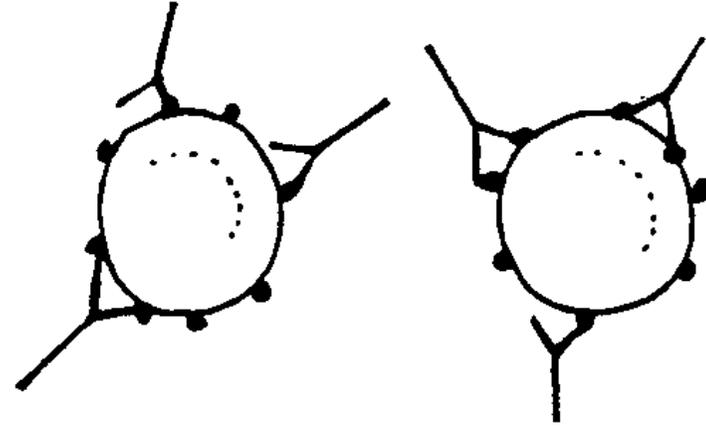
SANIDADANIMAL.INFO



IgG

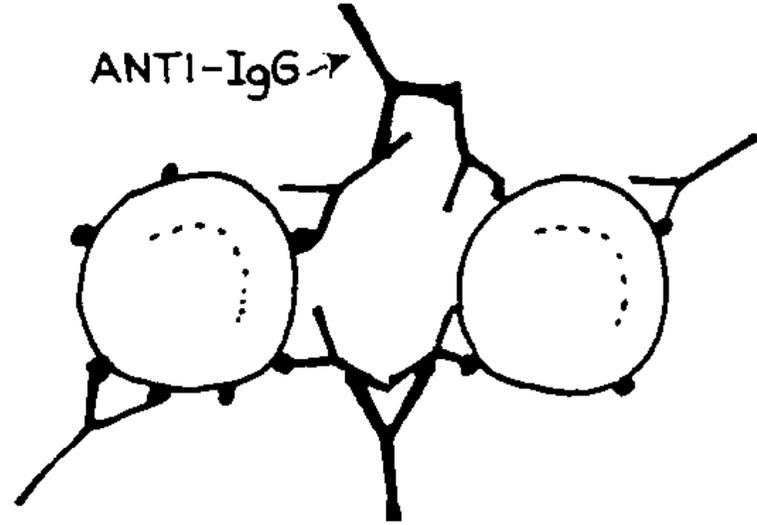
MONOMERO

HEMATIES SENSIBILIZADOS

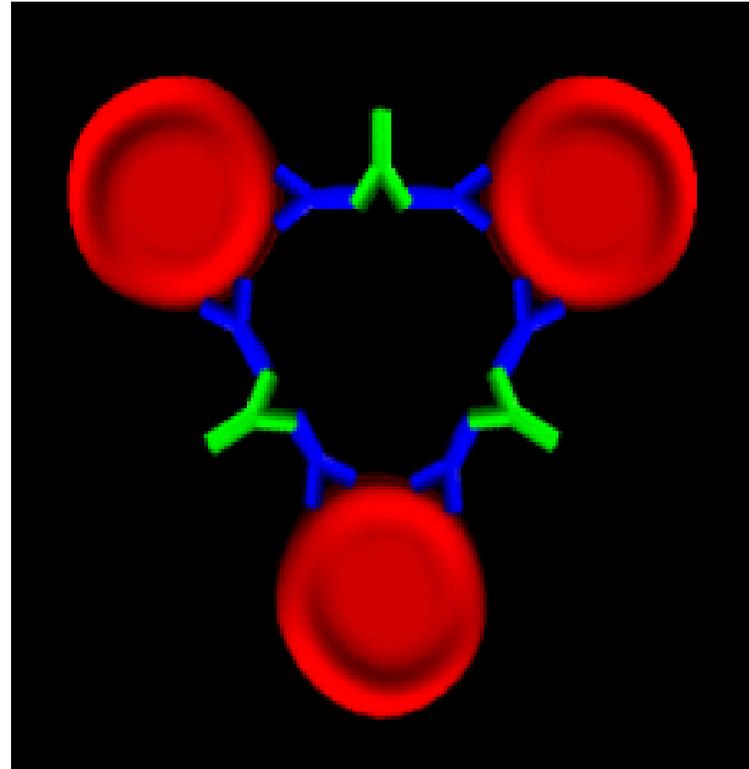
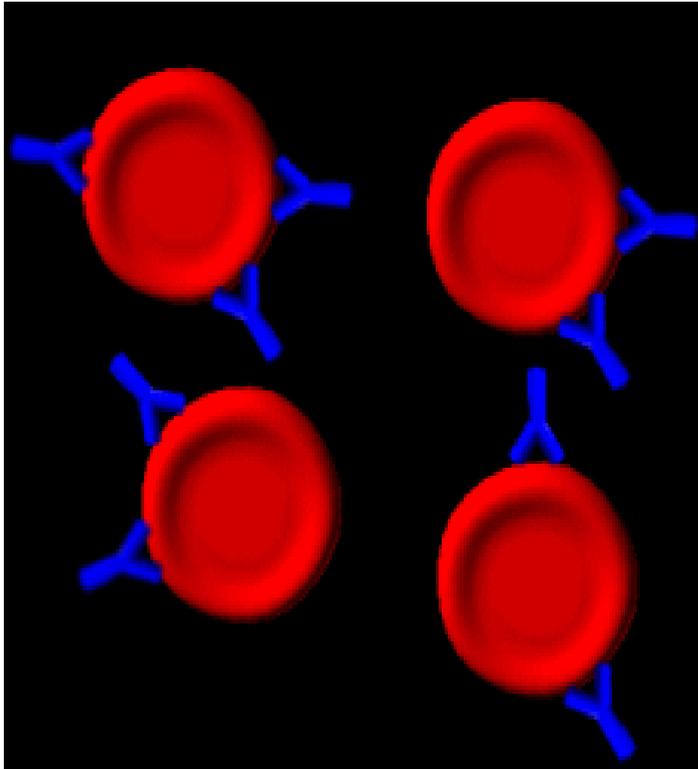


AGLUTINACION

ANTI-IgG →

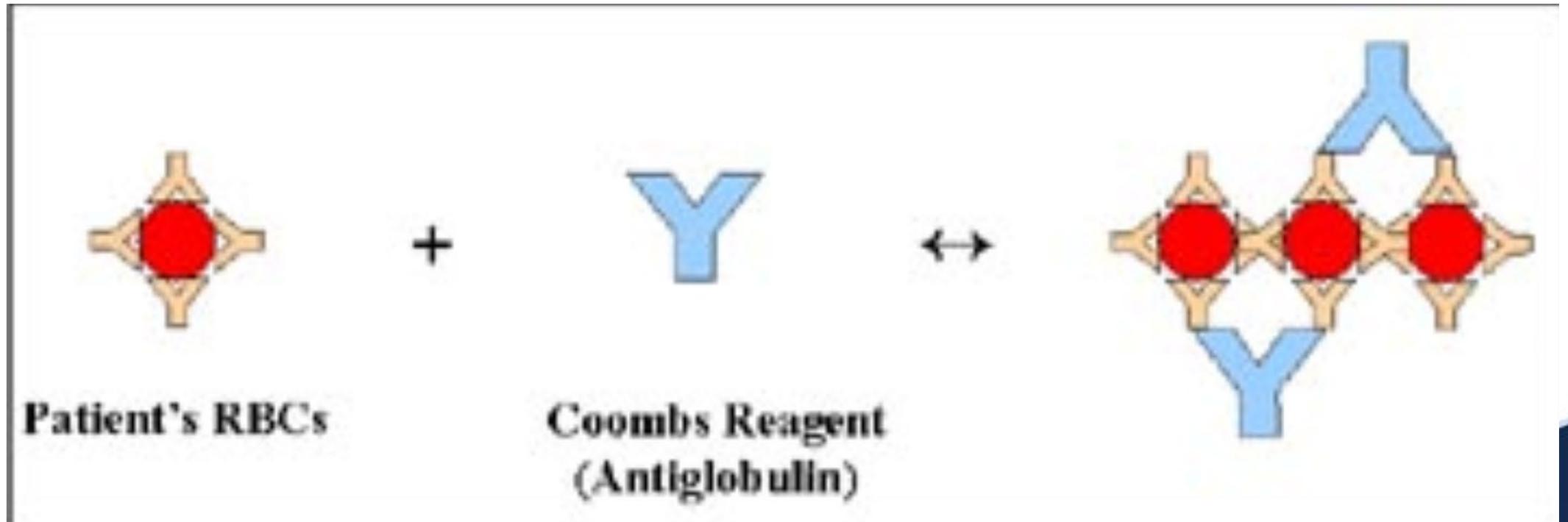


Aglutinación – IgG (anticuerpos incompletos)

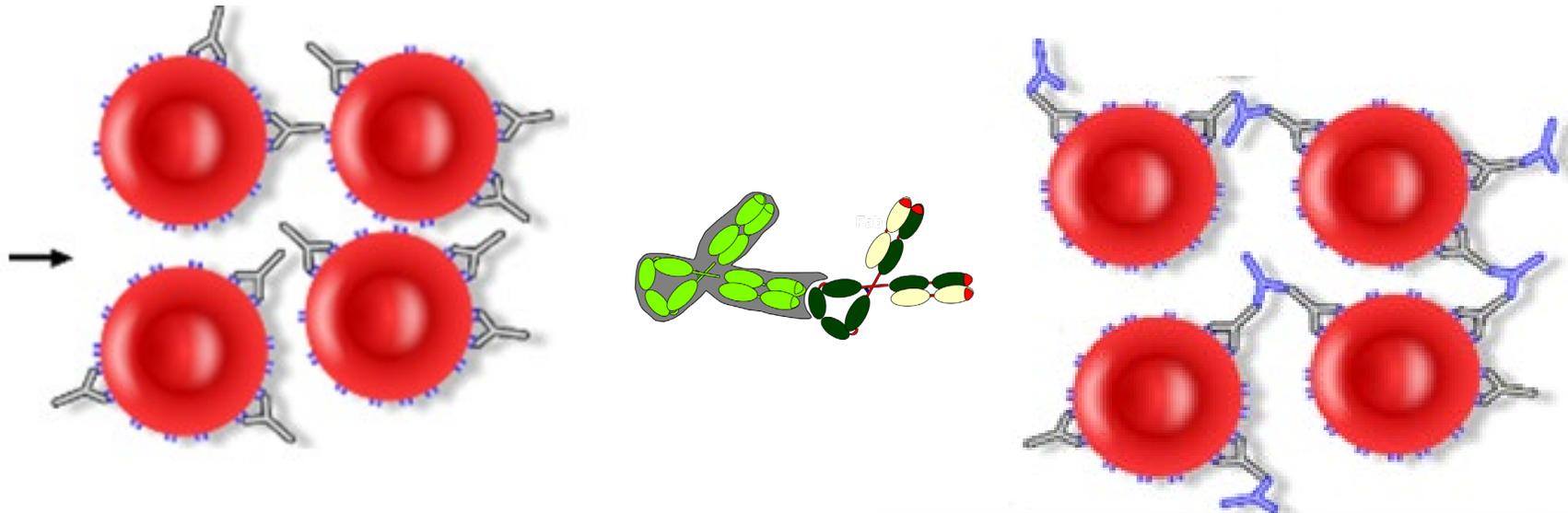


Antiglobulina humana o suero de Coombs

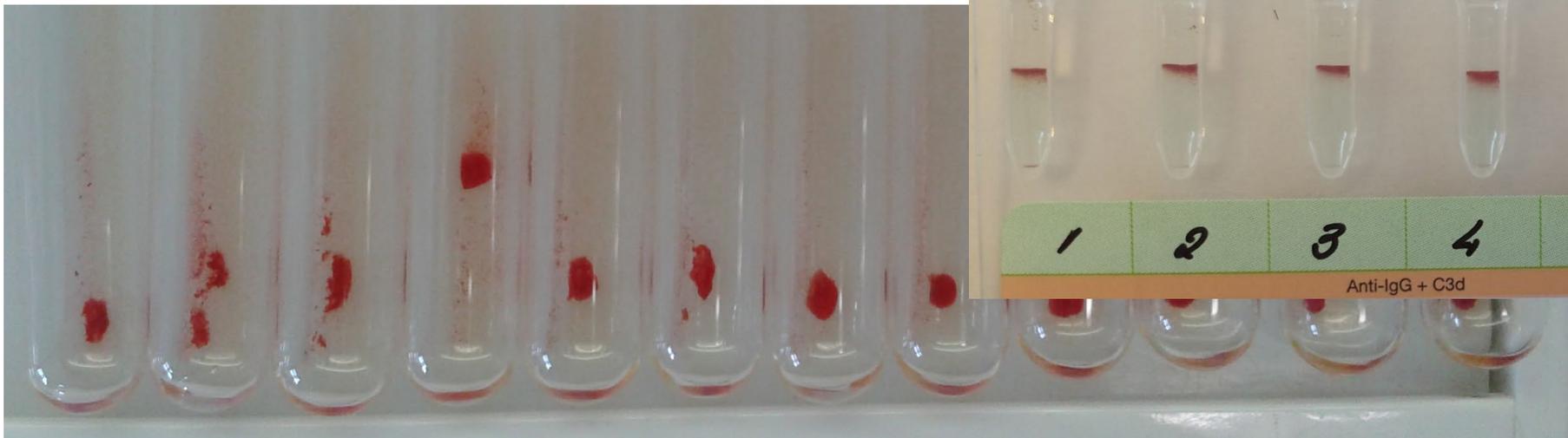
La AHG se une, a través de sus fragmentos Fab, a la porción Fc (cadenas pesadas) de los anticuerpos sensibilizantes (o a las fracciones del Complemento)



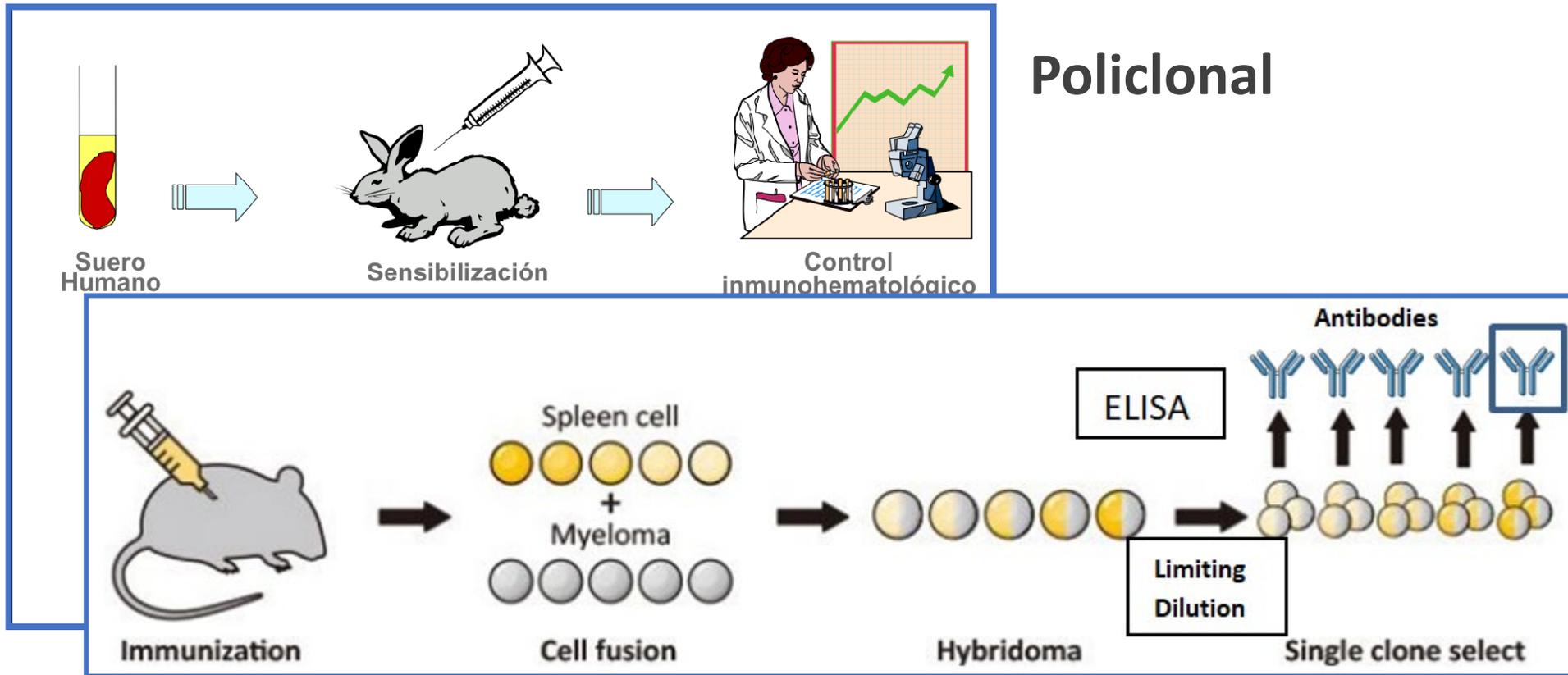
Suero de Coombs (antiglobulina humana)



RED CELL AGGLUTINATE



Antiglobulina humana o suero de Coombs

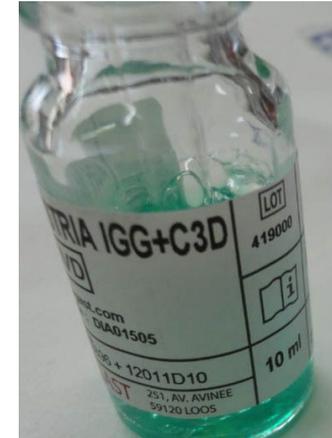


Actualmente: antiglobulina de origen **monoclonal** (hibridomas)

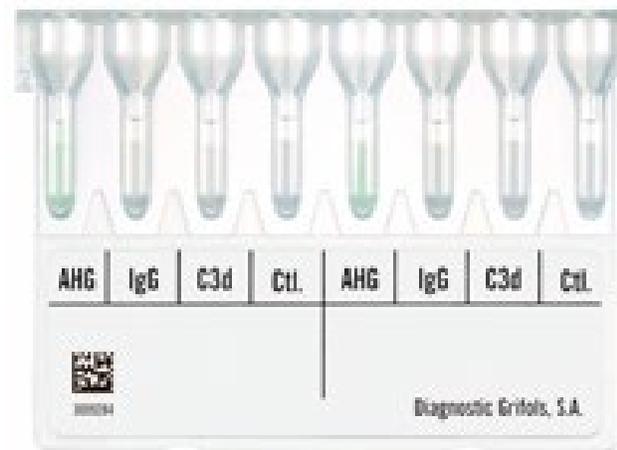


Tipos de reactivos antiglobulina

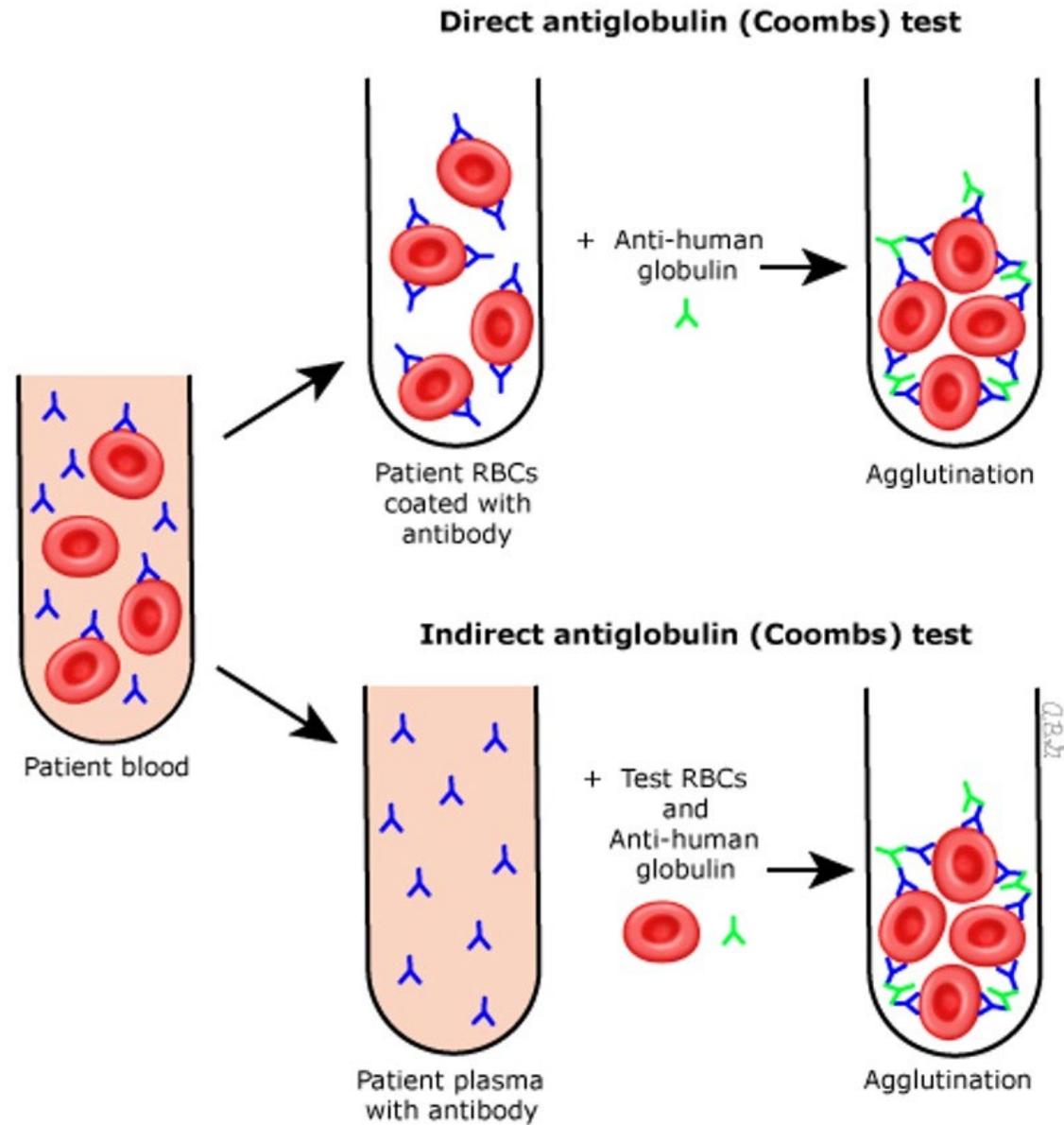
-- Poliespecífico:
Anti IgG + anti C3d



-- Monoespecífico:
Anti IgG
Anti C3d
Anti IgM, IgA



UTILIDAD DEL SUERO DE COOMBS



Prueba directa de la antiglobulina

Estudio de la unión AG-AC
producida "in vivo"

Detecta la adhesión de Igs y/o
complemento

Prueba diagnóstica: hemólisis
inmune

Prueba indirecta de la antiglobulina

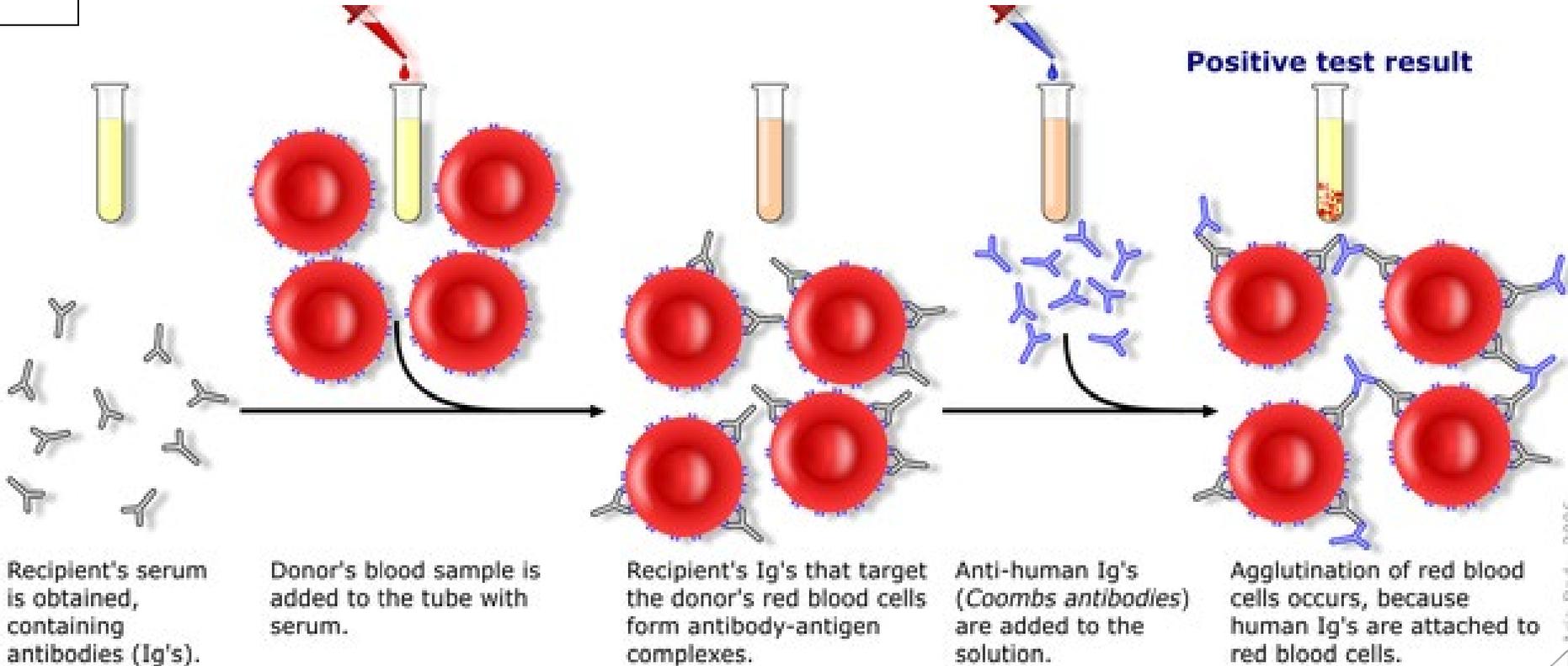
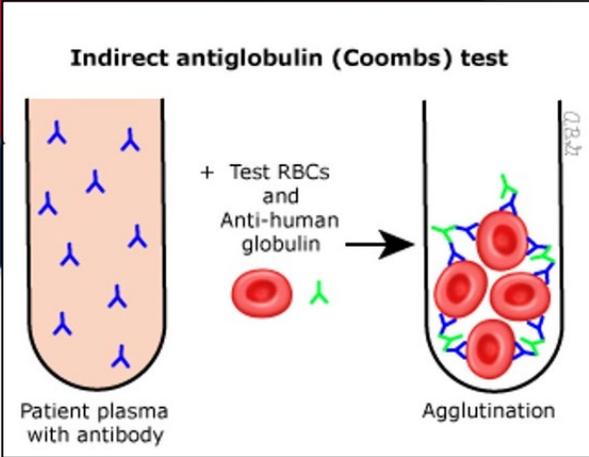
Estudio de la unión AG-AC
tras incubación "in vitro"

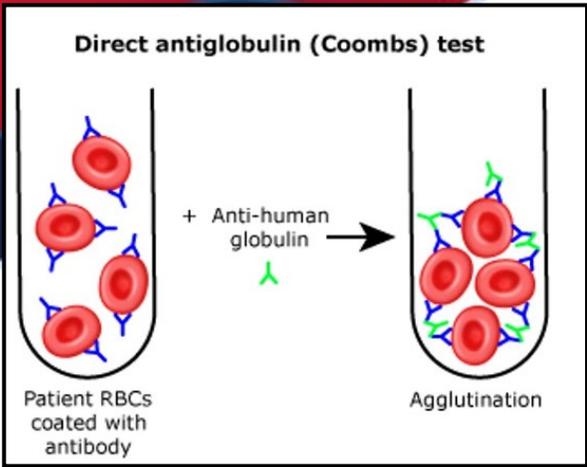
Técnica básica para el trabajo
en el Lab de IHM



Prueba indirecta de antiglobulina

Estudio de la unión Ag-Ac "in vitro"

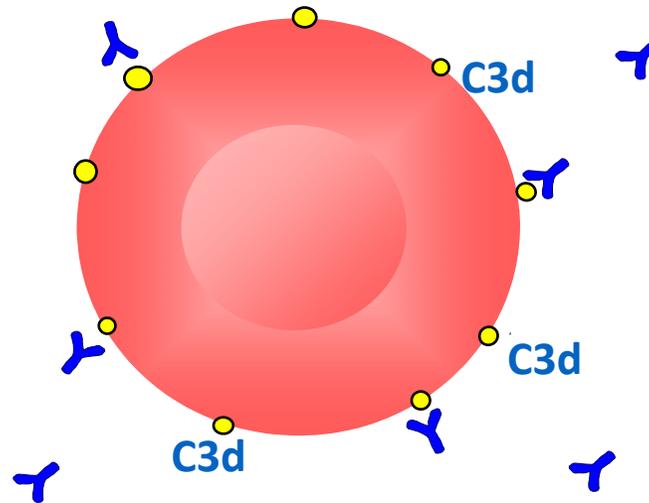




Prueba directa de antiglobulina Test directo de Coombs

Detecta la presencia de Inmunoglobulinas y/o complemento que se han adherido “in vivo” a la membrana de los hematíes

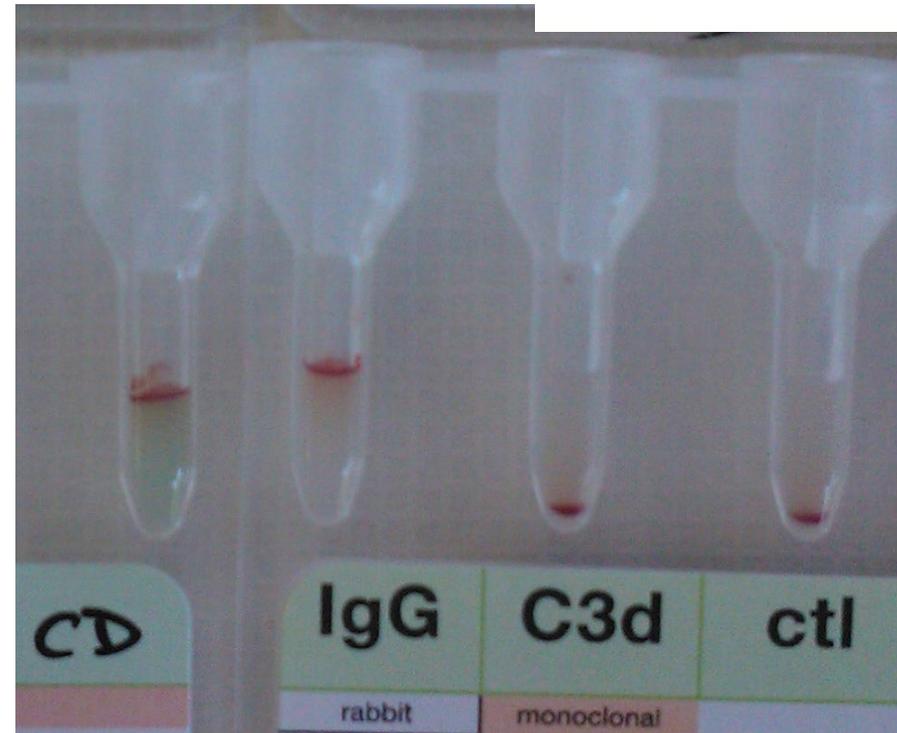
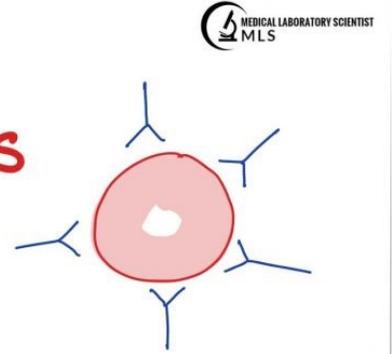
Prueba diagnóstica de hemólisis inmune



Prueba directa de antiglobulina

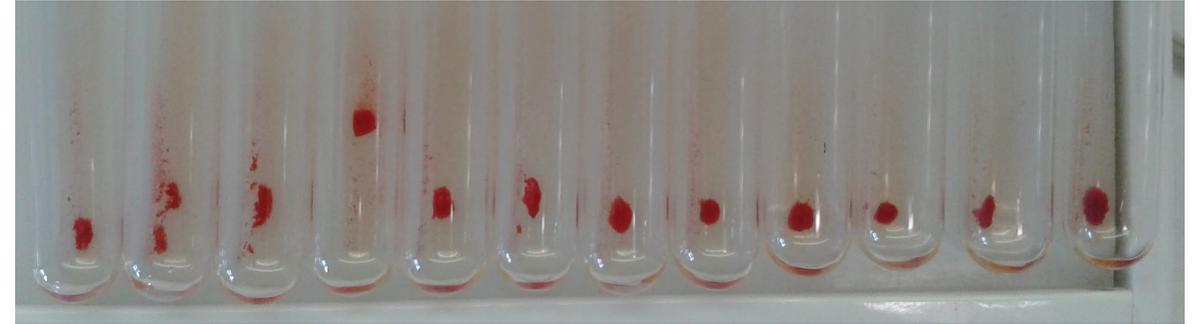
Se puede realizar en **técnica de tubo** o en **técnica de tarjeta**

Direct
Coomb's
test

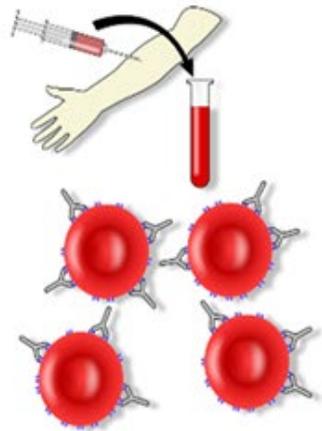


Prueba directa de antiglobulina

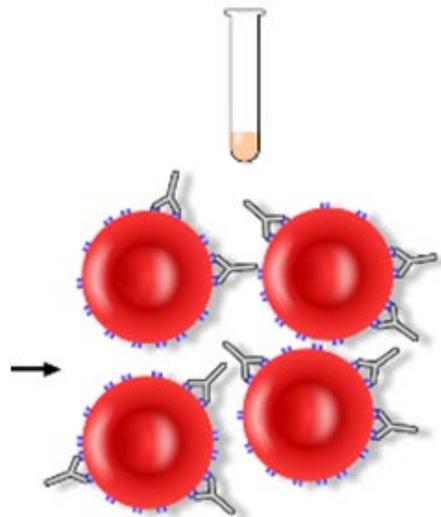
Técnica de tubo



Sample
Antibodies bound in vivo

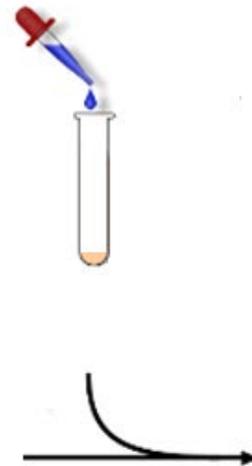


Washing



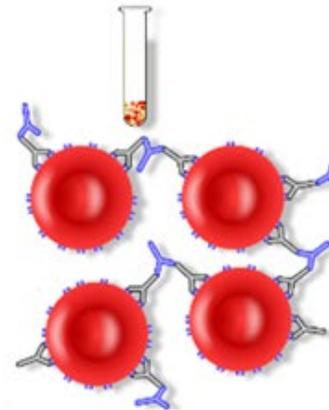
Antihuman globulin

Centrifugation

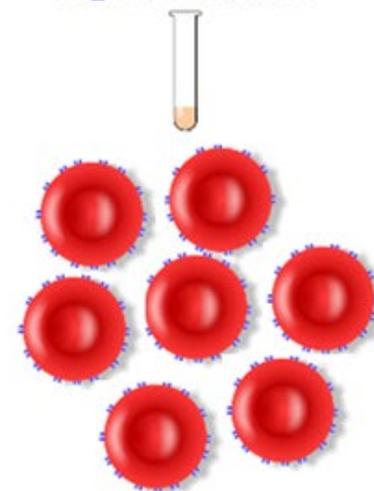


Interpretation

Positive Reaction



Negative Reaction

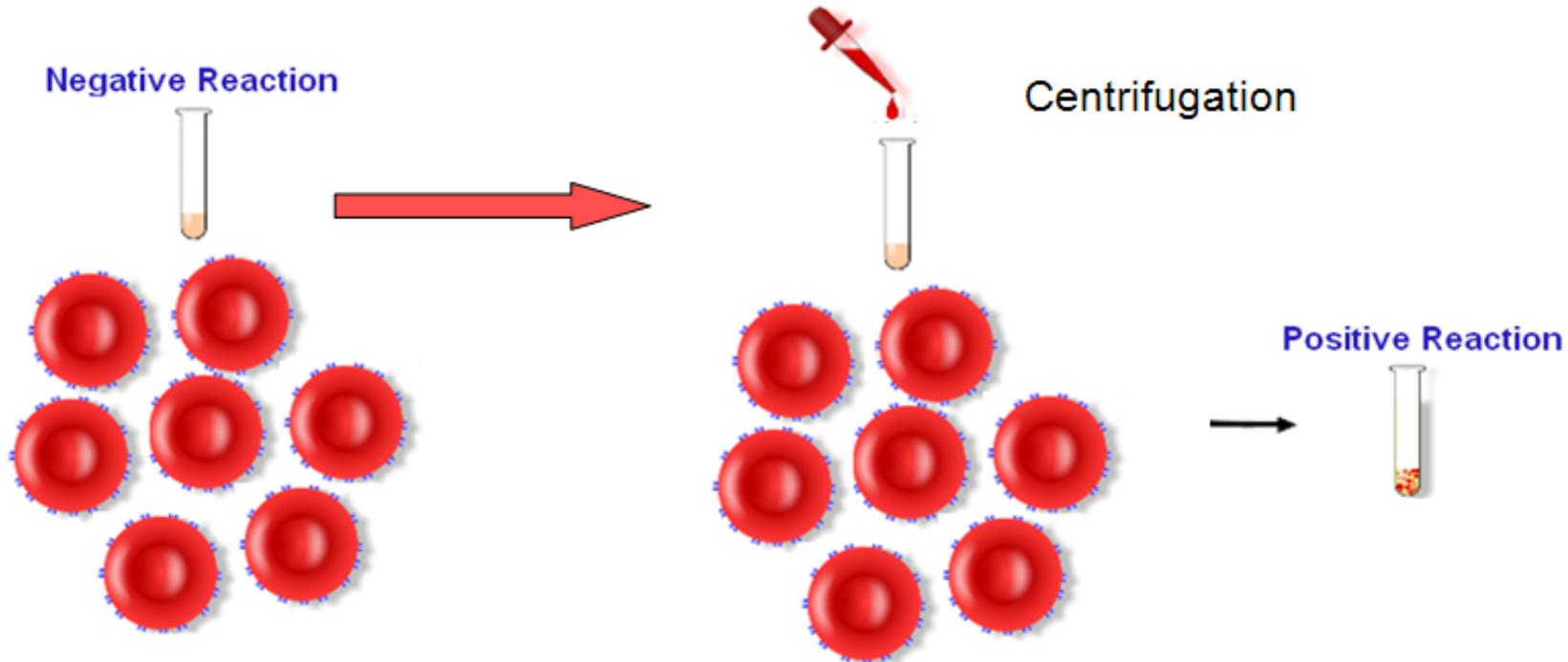


Prueba directa de antiglobulina

Técnica de tubo

Coombs Control

Interpretation



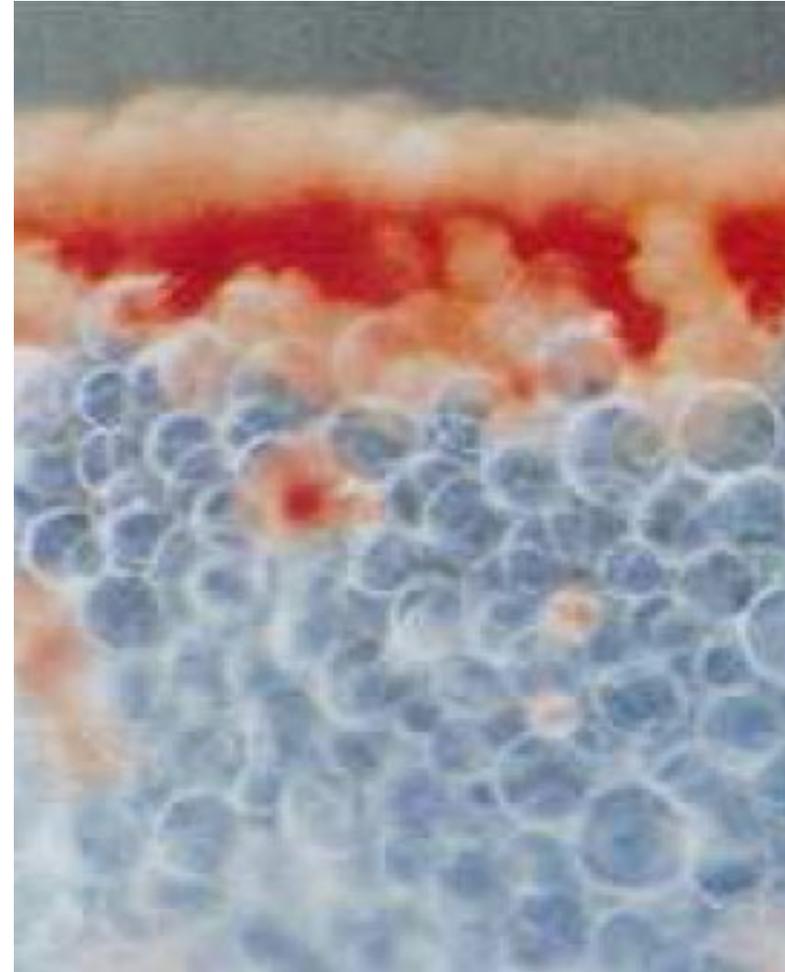
Prueba directa de antiglobulina

Técnica de microcolumna

No control, no lavado

- Mas sensibilidad
- Menor especificidad

Correlacionar
con el contexto
clínico-analítico !!!



Prueba directa de antiglobulina negativa



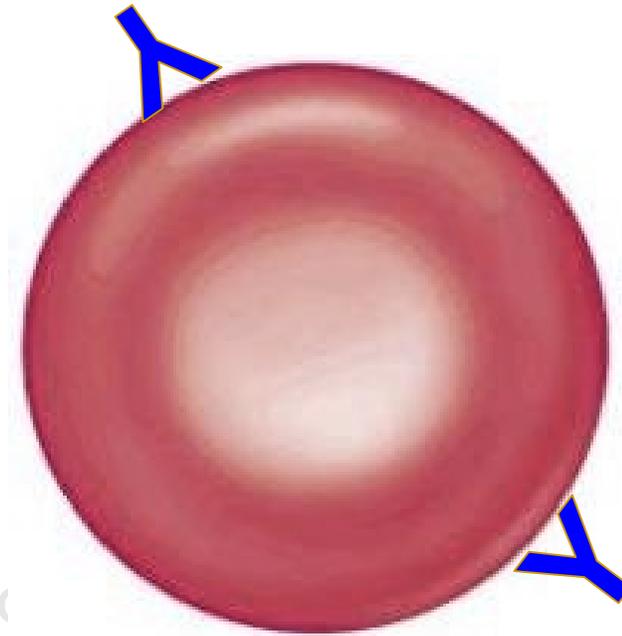
Hematíes no sensibilizados



Prueba directa de antiglobulina negativa

Hematíes poco sensibilizados

< 100 moléculas/hematíe

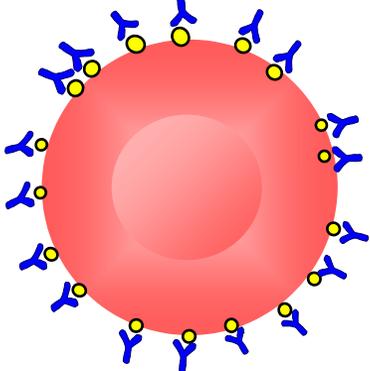
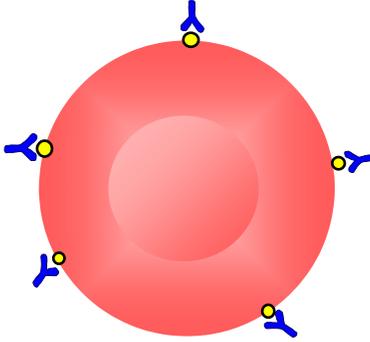
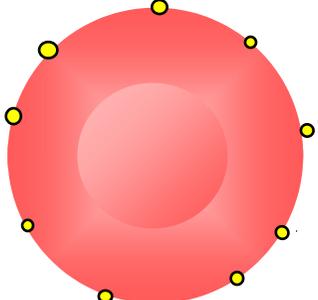


Sensibilidad del método

Umbral de
detección

IgG = 100 - 500 mol/GR

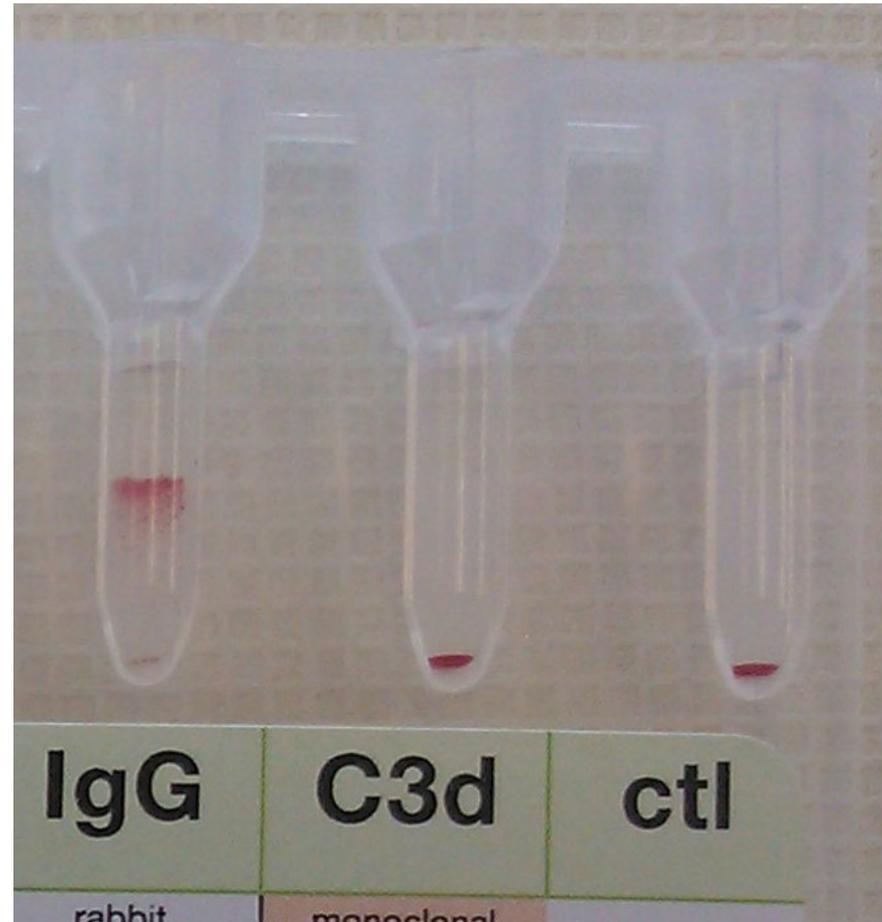
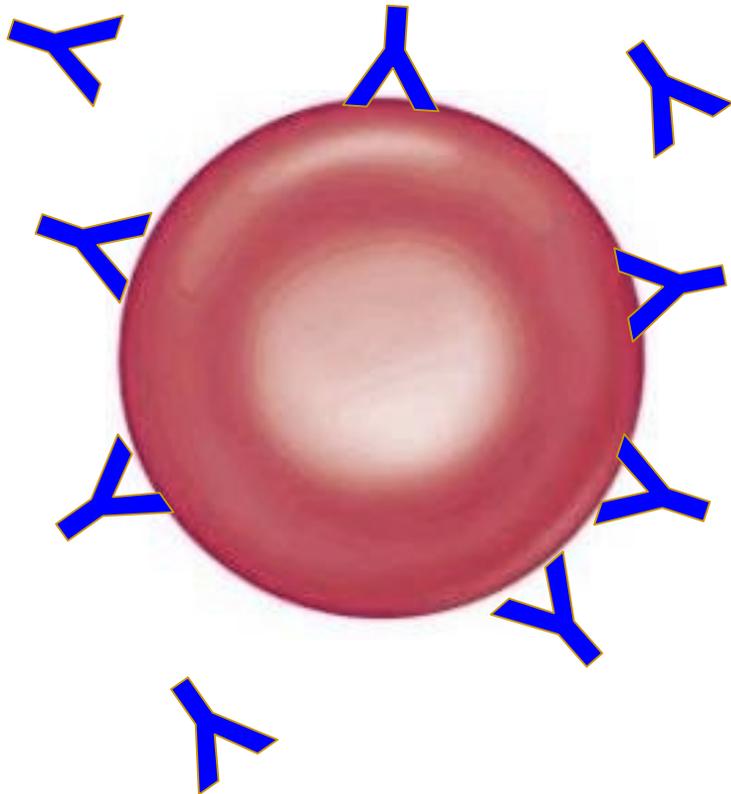
C3d= 400 - 1000 mol/GR

	Método A	Método B
	+	+
	+	-
	-	-



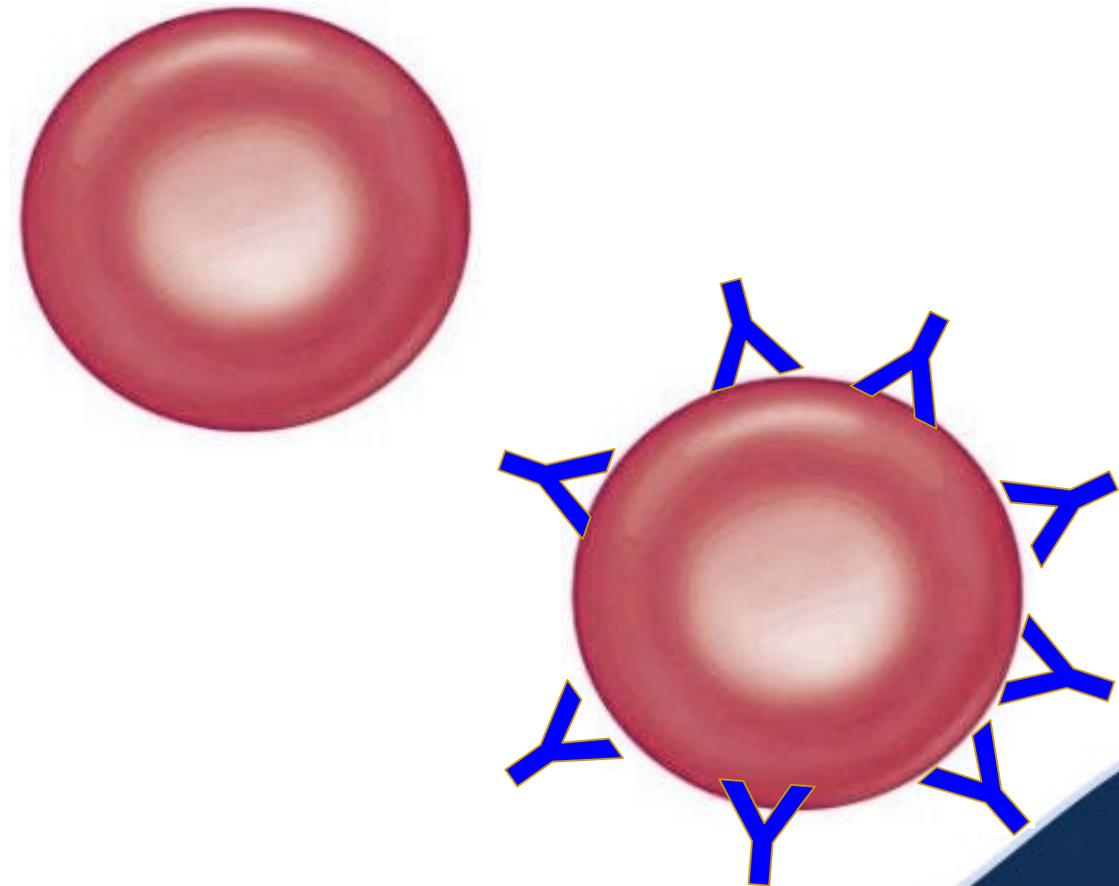
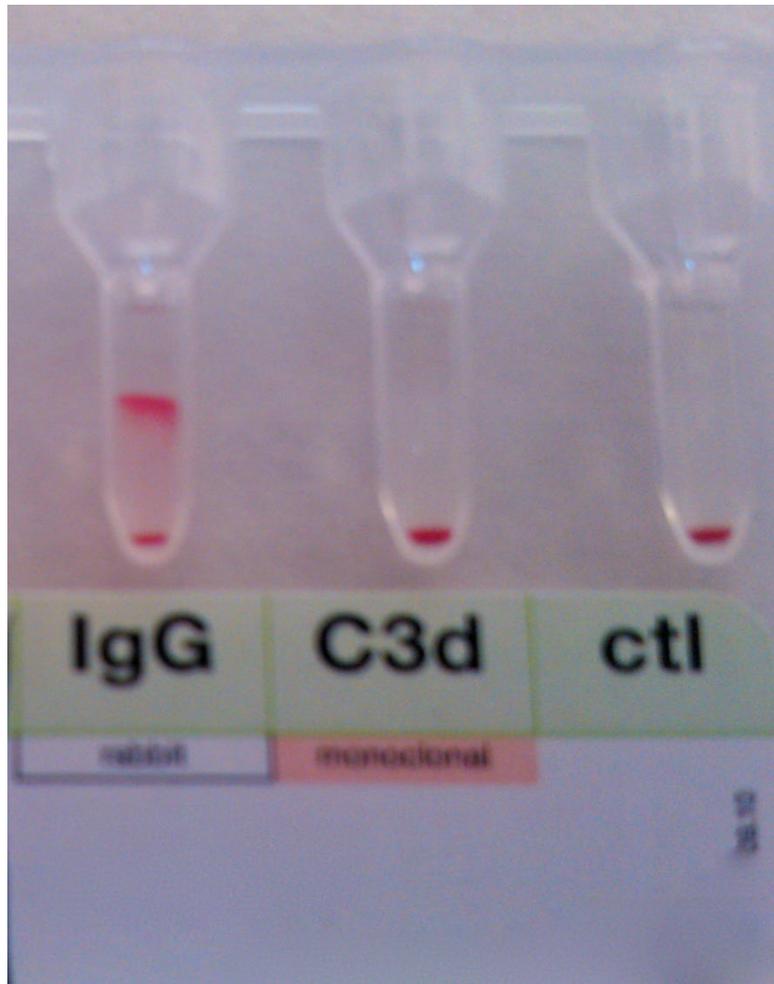
Prueba directa antiglobulina positiva por IgG

Hematíes sensibilizados con IgG



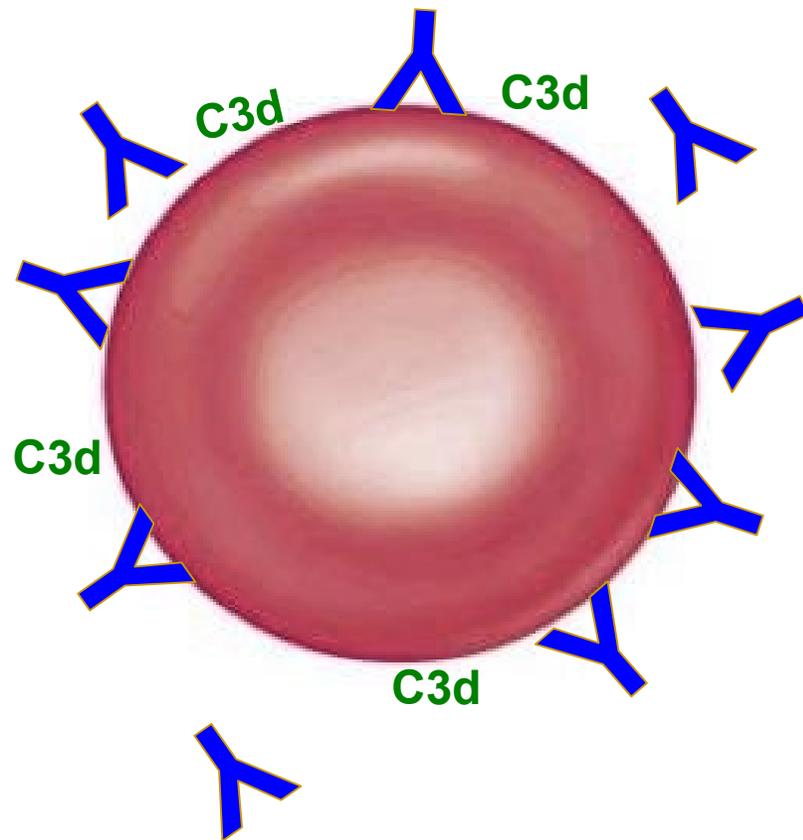
Prueba directa antiglobulina positiva. Doble población

Mezcla de hematíes



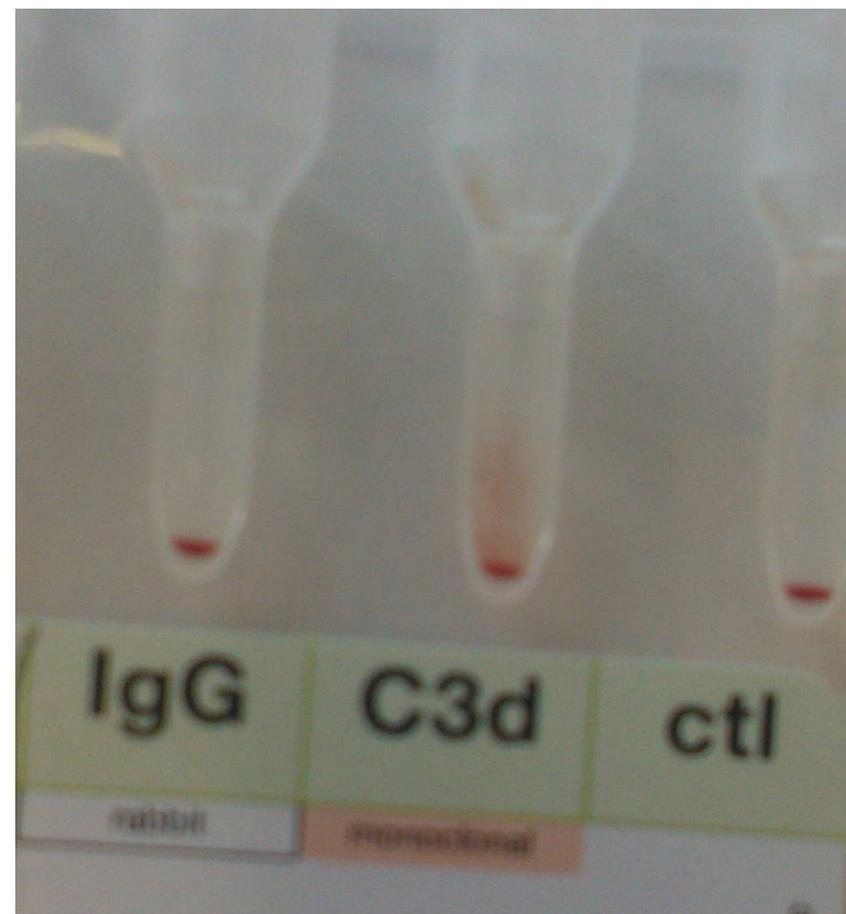
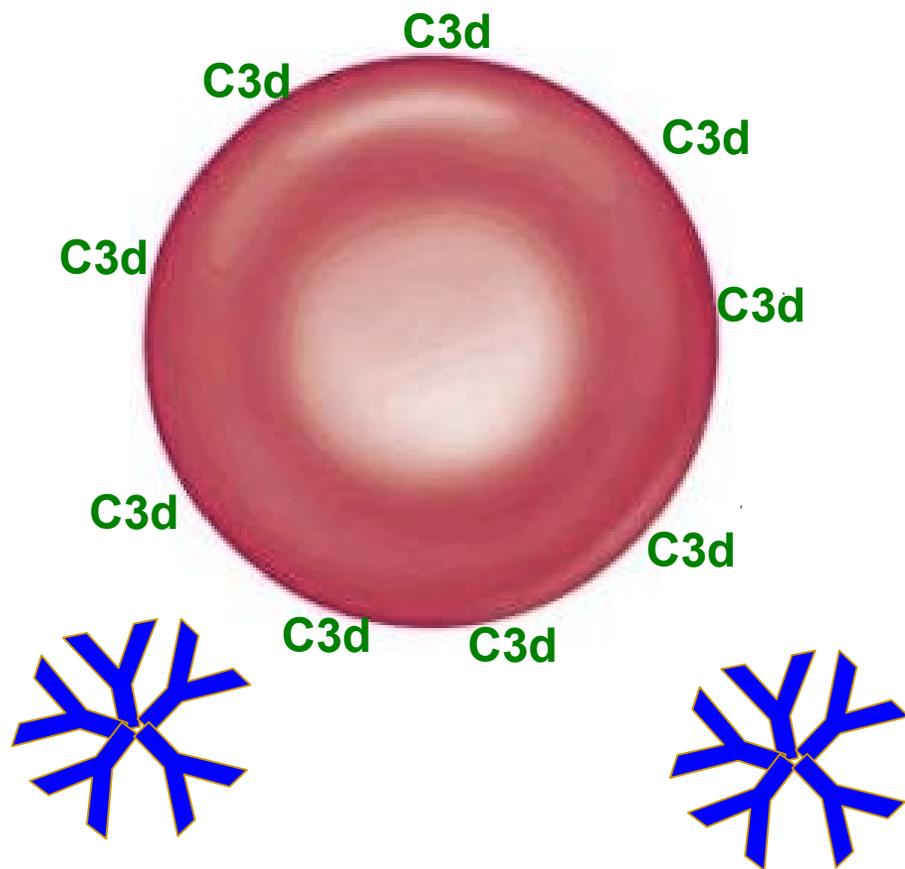
Prueba directa antiglobulina positiva por IgG + C3d

Hematíes sensibilizados con C3d+IgG

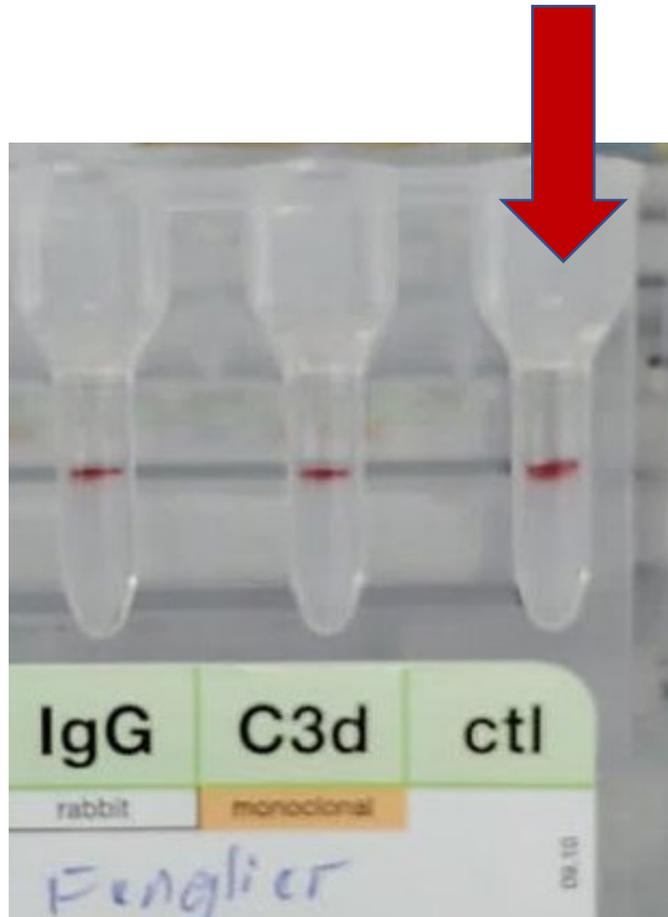


Prueba directa de antiglobulina positiva por C3d

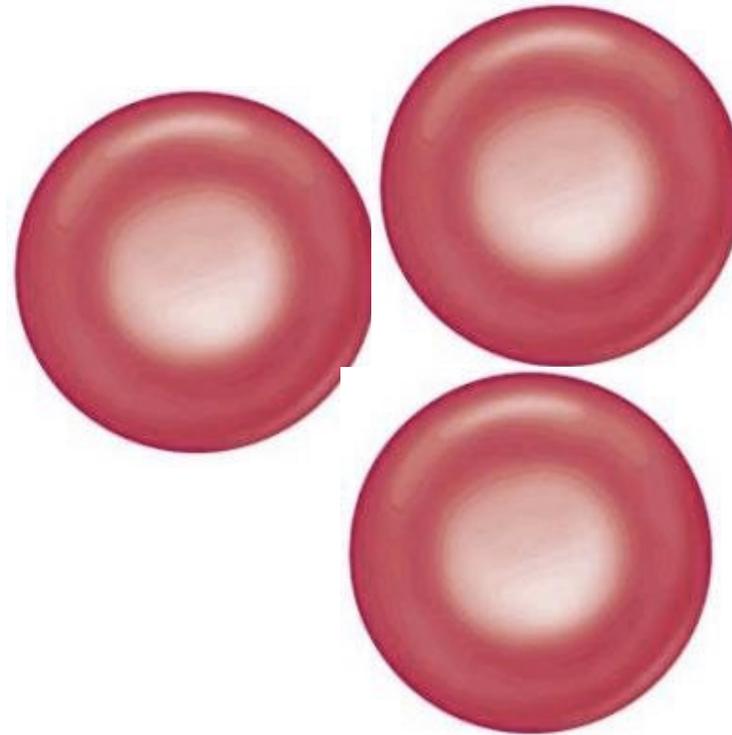
Hematíes sensibilizados con C3d



Prueba directa de antiglobulina positiva no valorable



Hematíes aglutinados



Causas de error en el resultado de la prueba de antiglobulina

FALSOS NEGATIVOS	FALSOS POSITIVOS
Neutralización del reactivo antiglobulina <ul style="list-style-type: none">- <u>Fallo del lavado</u>- Contaminación del reactivo- Paraproteína IgG	Aglutinación celular previa al lavado <ul style="list-style-type: none">- <u>Aglutininas potentes</u>
Interrupción del test	Existencia de partículas o contaminantes <ul style="list-style-type: none">- Suciedad, fibrina
Conservación incorrecta de los reactivos	Procedimiento incorrecto <ul style="list-style-type: none">- <u>Sobrecentrifugación</u>
Procedimientos incorrectos: <ul style="list-style-type: none">- <u>Centrifugación</u>- No adición de reactivos- Proporción s-h inadecuada	Células con un test directo de antiglobulina positivo



Prueba directa de antiglobulina Test directo de Coombs



DIRECT ANTIGLOBULIN (COOMBS) TESTING

What Does
It Show?

No siempre tiene
significación clínica !!

<15% pacientes

<0.1% donantes





**Una PDAG positiva no
significa hemólisis**

**Si hay hemólisis, una PDAG
positiva orienta hacia el origen
inmune**



Causas de PDAG positiva

Con significado clínico

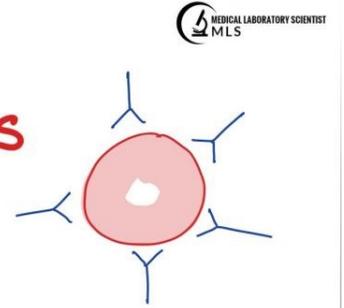
- AHAI
- AHAI-fármacos
- R. hemolíticas transfusionales
- EHFRN
- Sdr. Linfocito pasajero

- Enfermedades autoinmunes
- Neoplasias
- Infecciones

Sin significado clínico

- Adsorción inespecífica **in vivo**
 - Hipergammaglobulinemia
 - Autoanticuerpo fisiológico

Direct
Coomb's
test





Información importante para interpretar una PDAG positiva

- Edad del paciente
- Diagnóstico de base
- Evidencia de hemólisis (clínica, analítica)
- Antecedente transfusional reciente (3m)
- Toma algún medicamento
- Antecedente de trasplante
- Recibe tratamiento con Igev...?



El paciente con una PDAG positiva

Hallazgo casual

RN (EHFRN)

Aloanticuerpos
Reacción post-transfusional

Autoanticuerpos. AHAI



PDAG positiva

El paciente con aloanticuerpos



REACCIÓN HEMOLÍTICA
POST-TRANSFUSIÓN



Reacción hemolítica post-transfusional

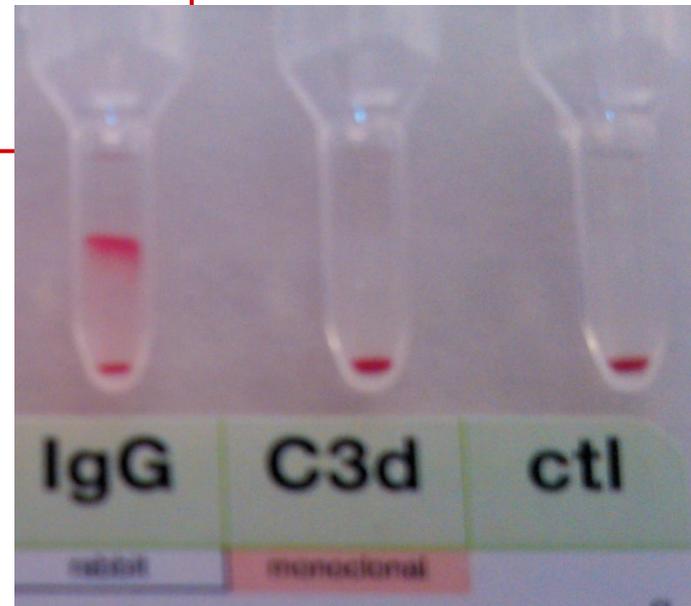
El paciente recibe hematíes frente a los cuales tiene **aloanticuerpos**

Según el tipo de aloanticuerpo, la hemólisis puede ser:

- **Intravascular** aguda (ABO)
- **Extravascular** retardada o aguda

PDAG POS únicamente en muestra **post-transfusión**

Característica la **doble población**



Reacción post-transfusional retardada

Paciente previamente inmunizado, con nivel de AC no detectable

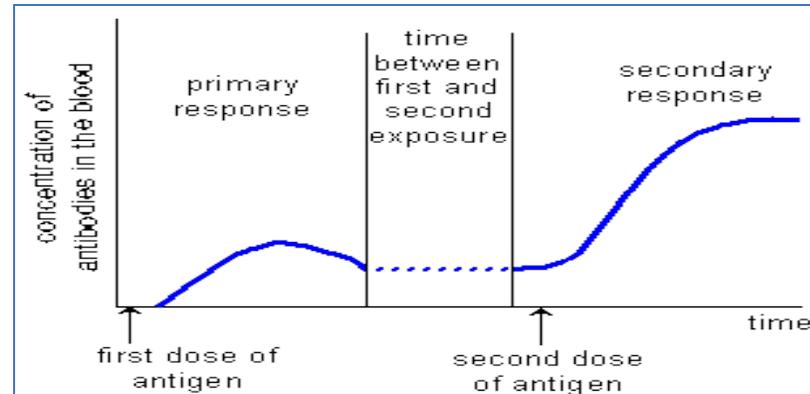
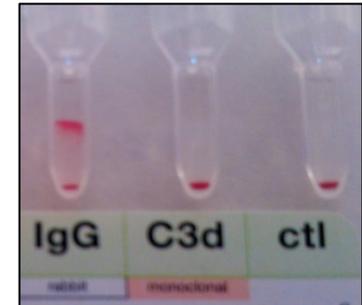
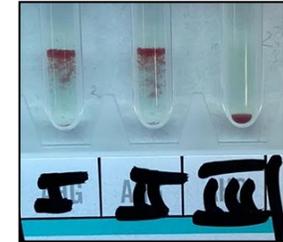


Recibe una transfusión de hematíes con el antígeno diana



Se produce una respuesta inmune anamnésica, tras 5-7 días

Muestra post-transfusión: SCR positivo + PDAG pos (hematíes incompatibles)



Reacción post-transfusional retardada

Paciente previamente inmunizado, con nivel de AC no detectable

Recibe una transfusión de hematíes con el antígeno diana

Se produce una respuesta inmune anamnésica, tras 5-7 días

Muestra post-transfusión: SCR positivo + PDAG pos (hematíes incompatibles)

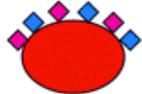
Importancia del estudio del plasma y del eluido

Reacción retardada Serológica

Sin síntomas
Estudio serológico compatible

Reacción retardada Hemolítica

Cuadro hemolítico
Fiebre
Ictericia

Antibody	RBCs
Anti-Jk ^a	Jk(a+b-) 
Anti-Jk ^a	Jk(a+b+) 

Sistemas implicados:
Rh, **Kidd**, Duffy, Kell



Reacción hemolítica post-transfusional

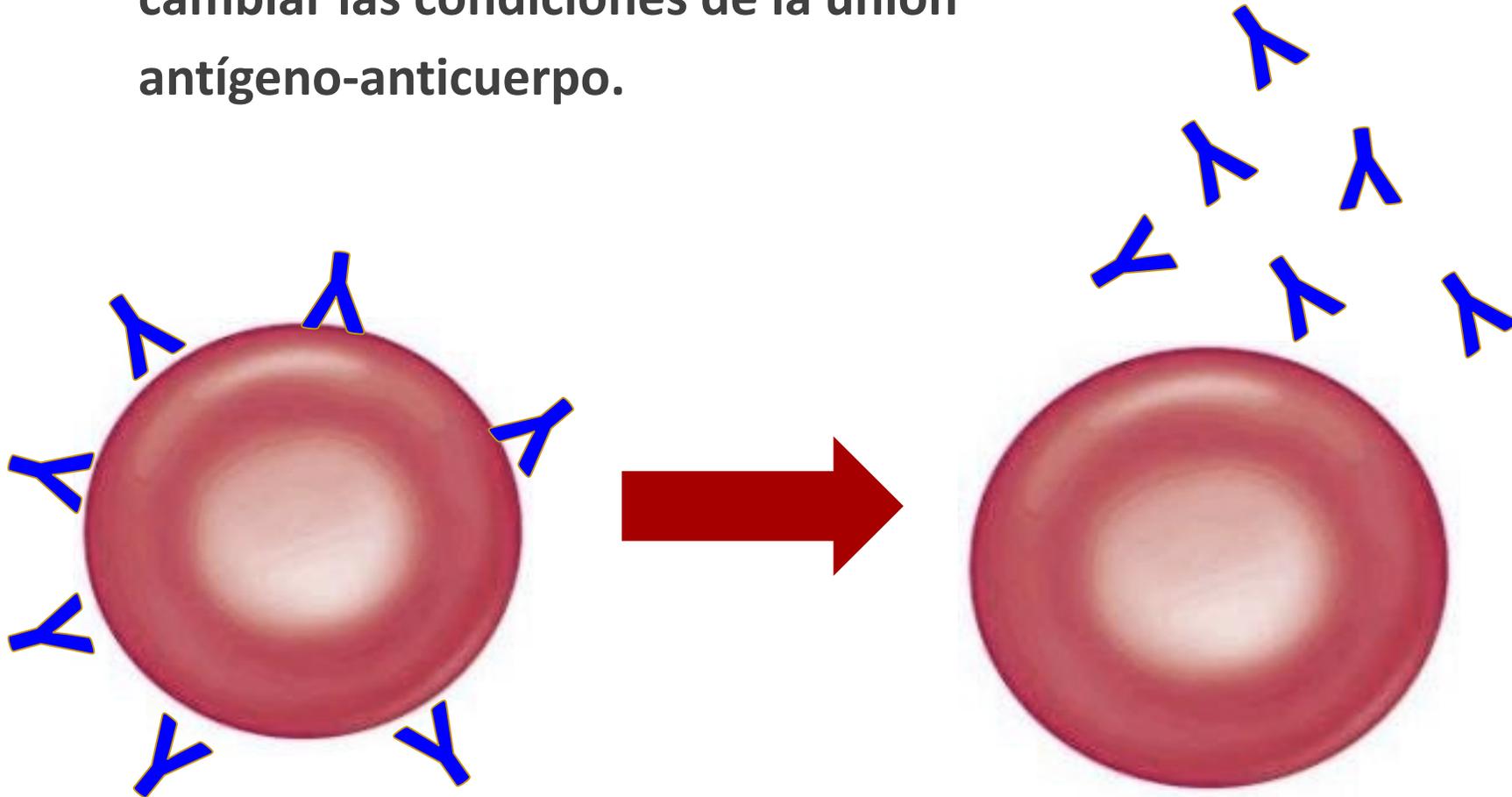
Importancia del estudio del eluido

La elución consiste en liberar las moléculas de anticuerpo de la membrana eritrocitaria, de un modo en que el anticuerpo pueda ser posteriormente estudiado.



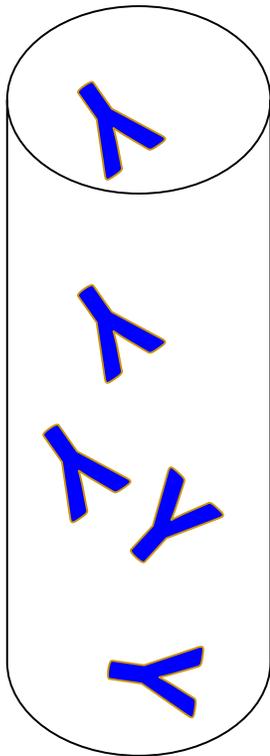
Elución

Los anticuerpos fijados pueden liberarse al **cambiar las condiciones de la unión antígeno-anticuerpo.**

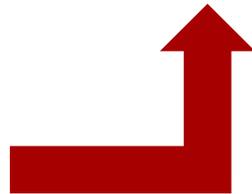


Elución

ELUIDO



Identificación
de anticuerpos



Hematías A,B,O

Hematías de panel



Mati

Paciente quirúrgica. 2 hijos
Transfusión reciente (SCR neg previo)

Actual: SCR positivo

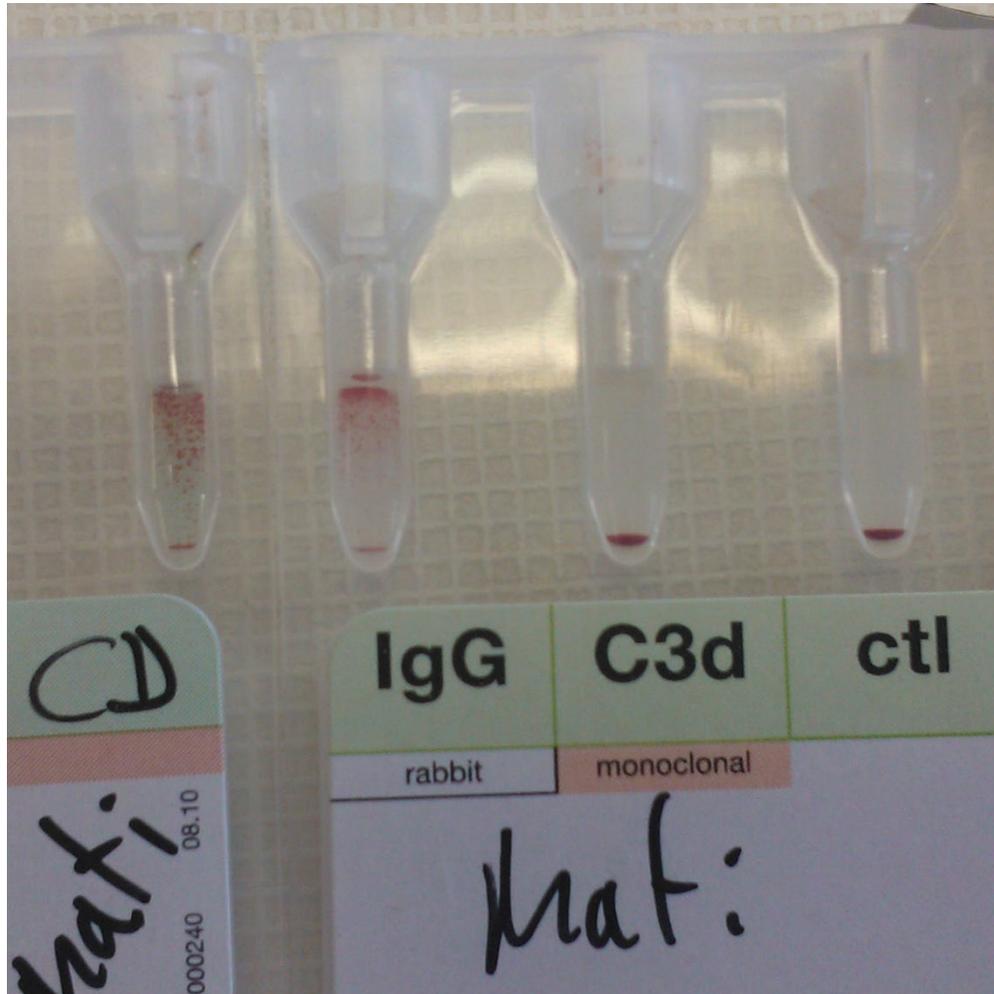
Panel: patrón heterogéneo. **Anti Kell + c.**

Fenotipo: Kell y c negativo

**Autocontrol
positivo**



Mati



PDAG positiva por IgG



Mati

Eluido: Anti Kell



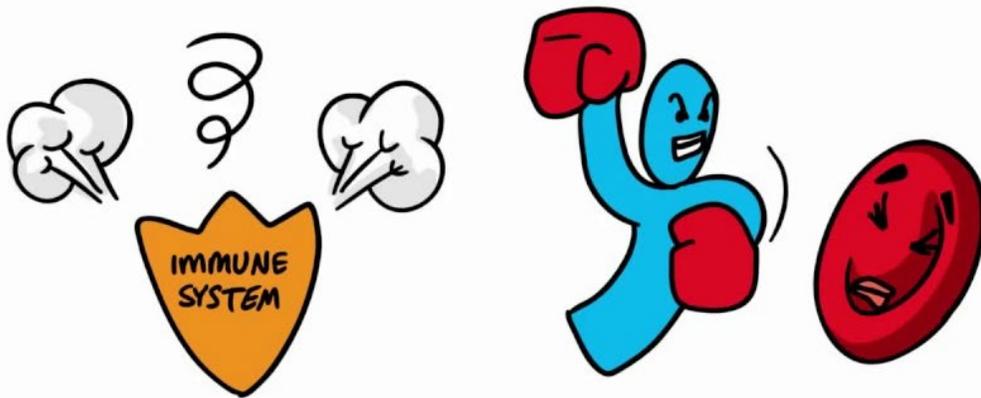
Reacción serológica retardada por anti-Kell



PDAG positiva

El paciente con autoanticuerpos

AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA (AIHA)



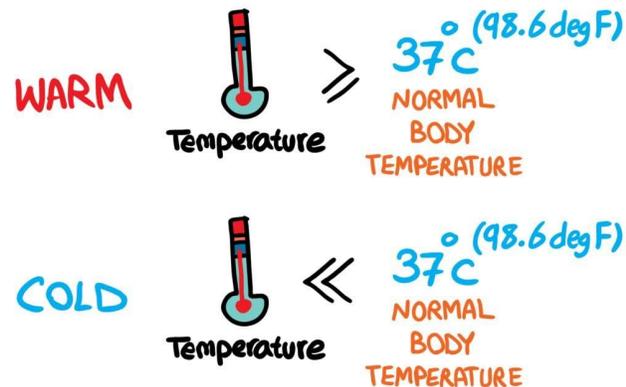
Anemia hemolítica autoinmune

Grupo de enfermedades caracterizadas por hemólisis debida a **autoanticuerpos** dirigidos contra antígenos eritrocitarios.

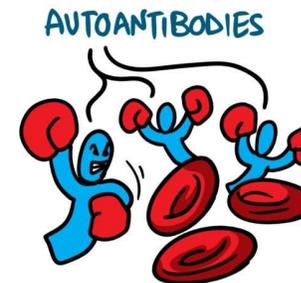
-Pueden ser **idiopáticas** o **secundarias** a otras enfermedades

-Según el tipo de anticuerpos pueden ser **de tipo caliente** o **frío**

TYPES:



BASED ON TEMP



Anemia hemolítica autoinmune

Table 1. Categories of Autoimmune Hemolytic Anemias.

70%

Warm-antibody autoimmune hemolytic anemia (wAIHA)

Cold-antibody autoimmune hemolytic anemia

Cold agglutinin syndrome (CAS)

Cold agglutinin disease (CAD)

Mixed autoimmune hemolytic anemia (mixed AIHA)

Paroxysmal cold hemoglobinuria (PCH)

Direct antiglobulin test-negative autoimmune hemolytic anemia (DAT-neg AIHA)

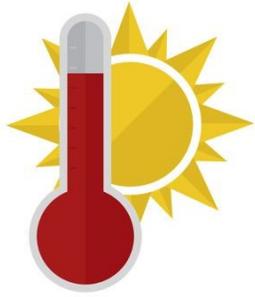
Drug-induced autoimmune hemolytic anemia (DIAIHA)

Passenger lymphocyte syndrome (PLS)



Anemia hemolítica autoinmune

Table 2. Serological Diagnosis of Autoimmune Hemolytic Anemias.



Category	DAT #	Eluate	Serum Antibody
wAIHA	IgG * 67% IgG + C3d 20% C3d only 13%	Pos (IgG)	IgG panagglutinin
CAS	C3d only	Neg	Polyclonal agglutinating IgM
CAD	C3d only	Neg	Monoclonal agglutinating IgM +
Mixed AIHA	IgG + C3d	Pos (IgG)	IgG panagglutinin + agglutinating IgM with low titer but high therm amplitude ($\leq 37^\circ\text{C}$)
PCH	C3d only	Neg	Cold-reactive IgG biphasic hemolysin **
DAT-Neg AIHA	Neg ***	Neg	Neg
Drug-induced AIHA	IgG only	Pos (IgG) ^	Pos (IgG)
Passenger lymphocyte Syndrome	IgG only	Pos (IgG)	IgG &



Anemia hemolítica autoinmune

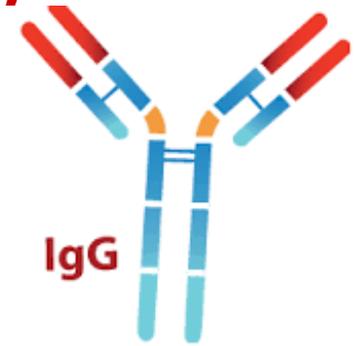
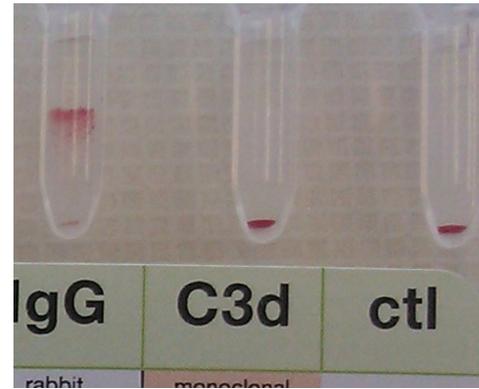
Table 3. Summary of Pathophysiology and Treatments.

Category	Pathophysiology	Primary Target Antigen	DAT as Biomarker	First-Line Treatments & #
wAIHA	Extravascular hemolysis *	Band 3	IgG ± C3d	Glucocorticoids, steroid-sparing agents #
CAS	Intravascular hemolysis **	I/i antigens	C3d only	Keep warm
CAD	Intravascular hemolysis **	I/i antigens	C3d only	Anti-C1q/-C5
Mixed AIHA	Intra- and extravascular hemolysis	Band3; I/i antigens	IgG + C3d	wAIHA, CAS, CAD options
PCH	Intravascular hemolysis	GLOB (formally P antigen)	C3d	Anti-C1q/-C5, Rituximab
DAT-neg AIHA	Extravascular hemolysis	Unk	negative	wAIHA options
DIAIHA	Intra- and extravascular hemolysis	Unk ^	IgG and/or C3d	Discontinue drug
PLS	Extravascular hemolysis	ABO/Rh	IgG	antigen-negative transfusion support; may adjust anti-rejection regimen

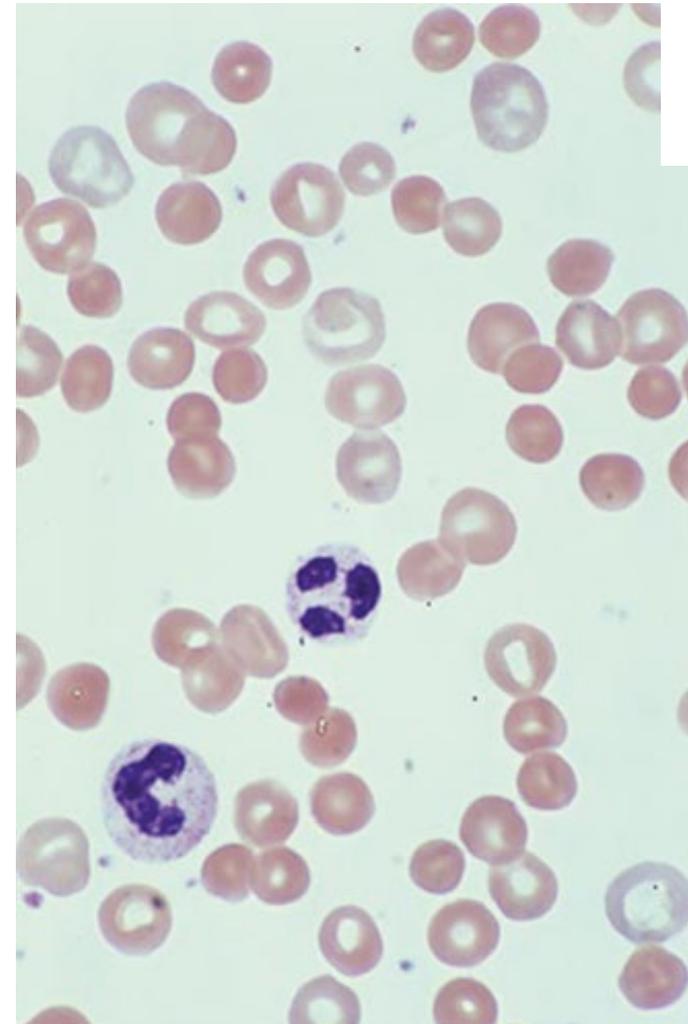


AHAI por anticuerpos calientes (70%)

- IgG (68%)
- IgG+C3d (14%)
- C3d (7%)



Hemólisis extravascular. Esferocitos



AHAI por anticuerpos calientes

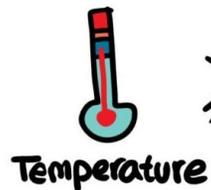
Suero y eluido

Panaglutinación
AHG y Enz

El autoac reconoce epítomos públicos y reacciona con todos los hematíes

	D	C	c	E	e	K	k	S	s	AHG	ENZ
1	+	+	0	0	+	+	+	0	+	3+	4+
2	+	+	0	0	+	0	+	0	+	3+	4+
3	+	0	+	+	0	+	+	+	0	3+	4+
4	+	0	+	+	0	0	+	+	+	3+	4+
5	0	0	+	0	+	0	+	0	+	3+	4+
6	0	0	+	0	+	+	+	0	+	3+	4+
7	0	0	+	0	+	0	+	+	0	3+	4+
	auto									3+	4+

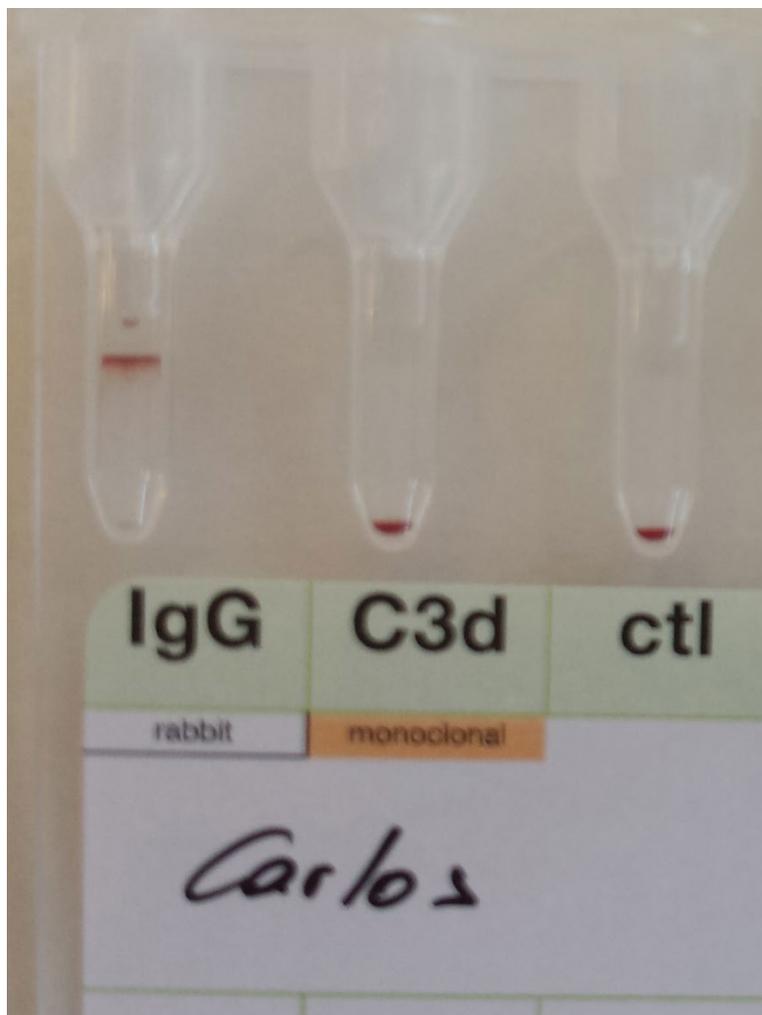
WARM



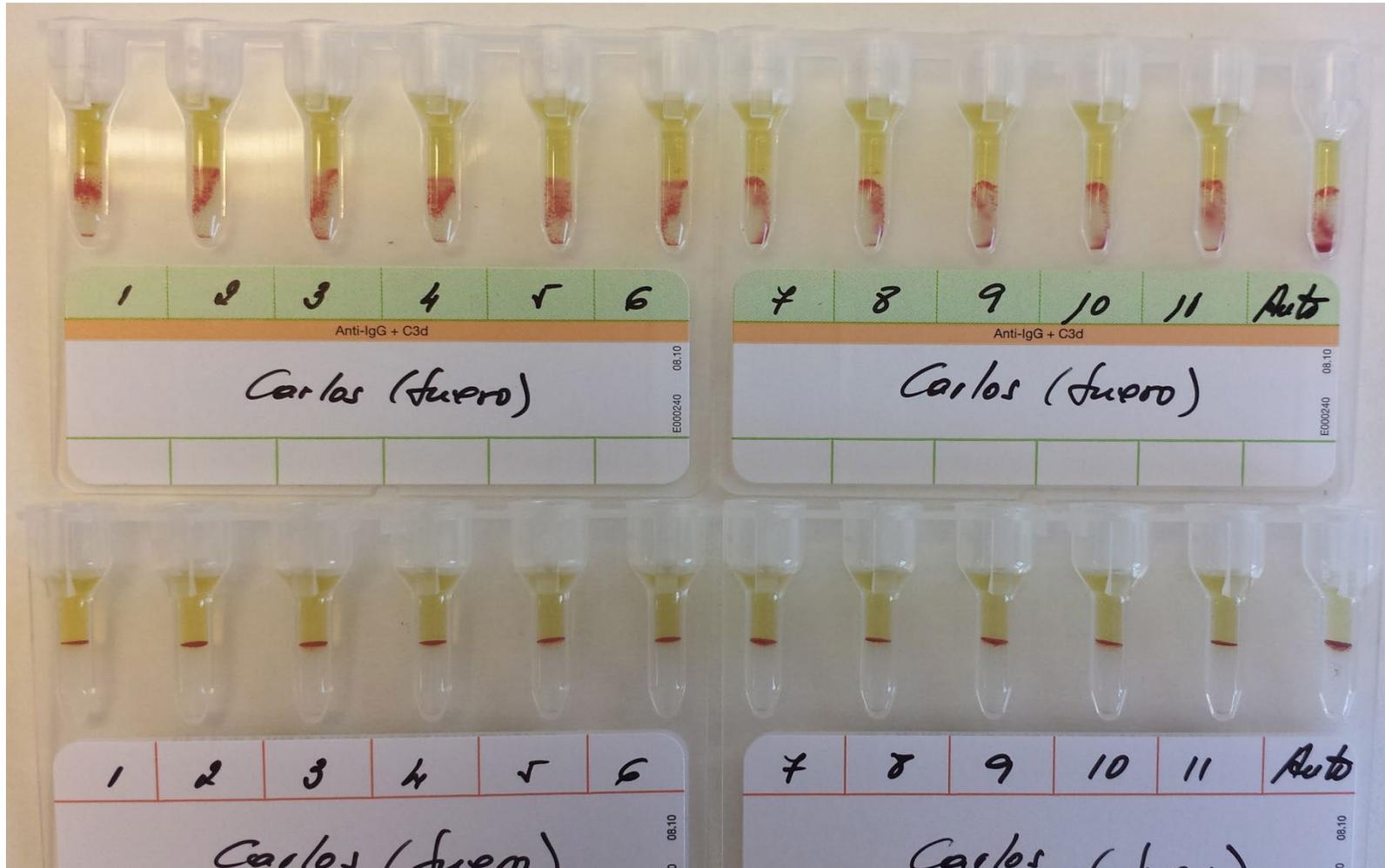
37°C (98.6 degF)
NORMAL
BODY
TEMPERATURE



Paciente con AHAI-Ac calientes



Paciente con AHAI-Ac calientes



Paciente con AHAI-Ac calientes



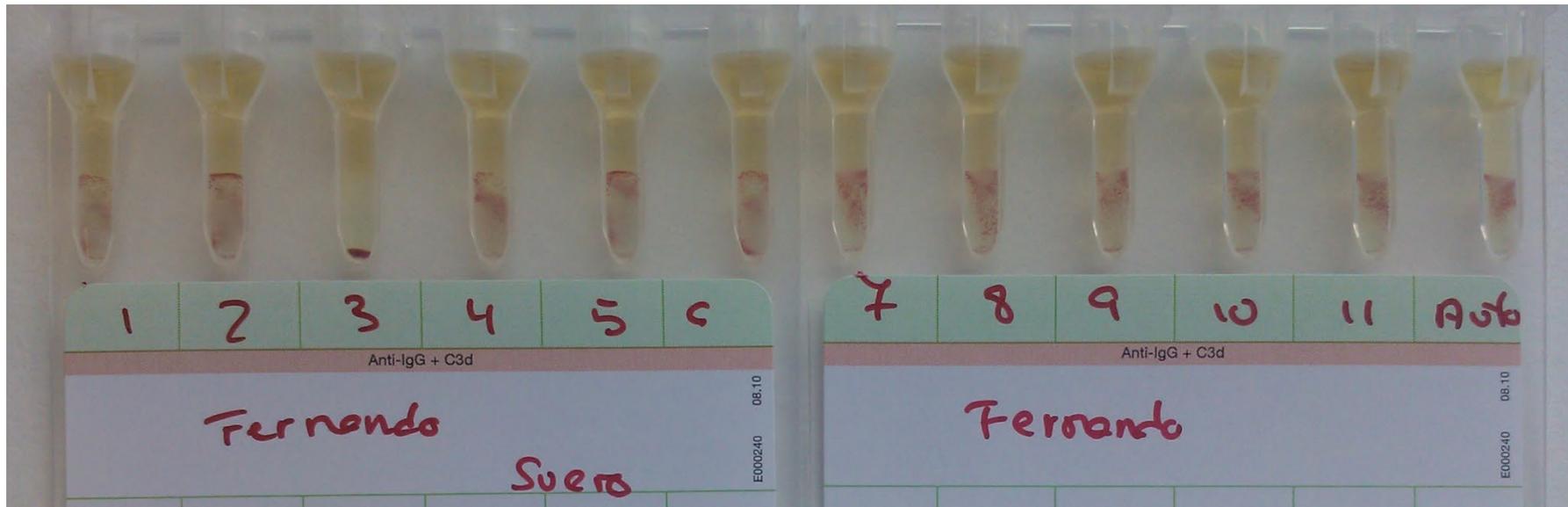
Fernando

Sospecha de AHAI.

Anemia severa

PDAG pos (IgG)

Suero: anti-e
Fenotipo e pos



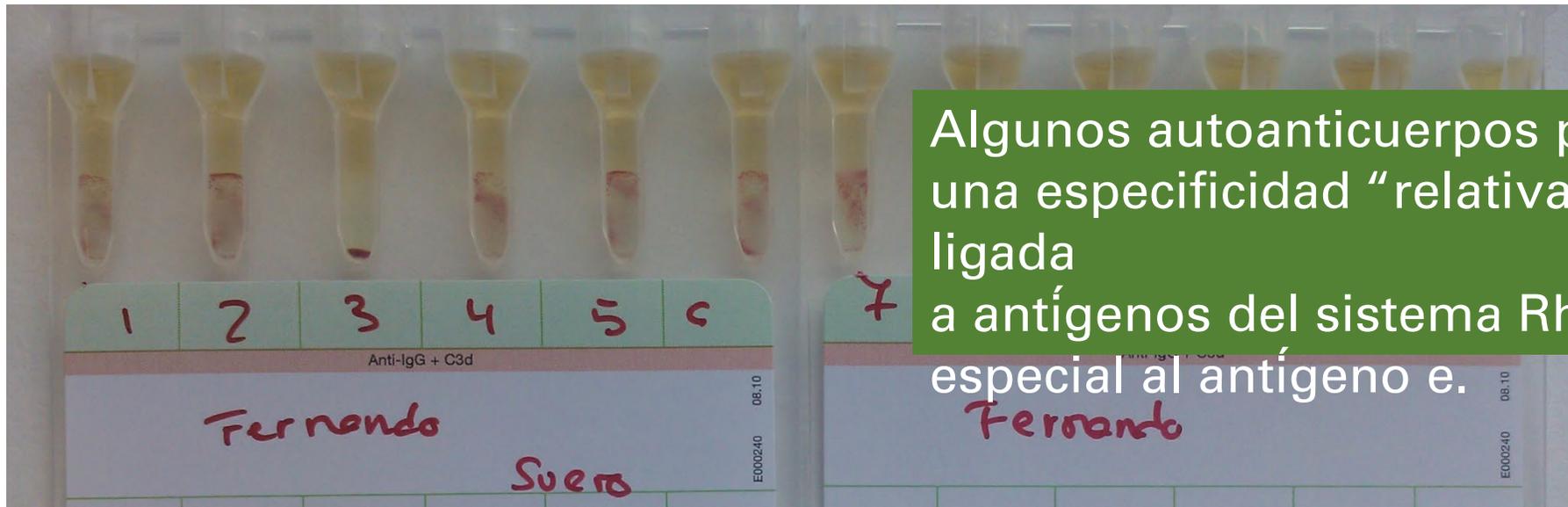
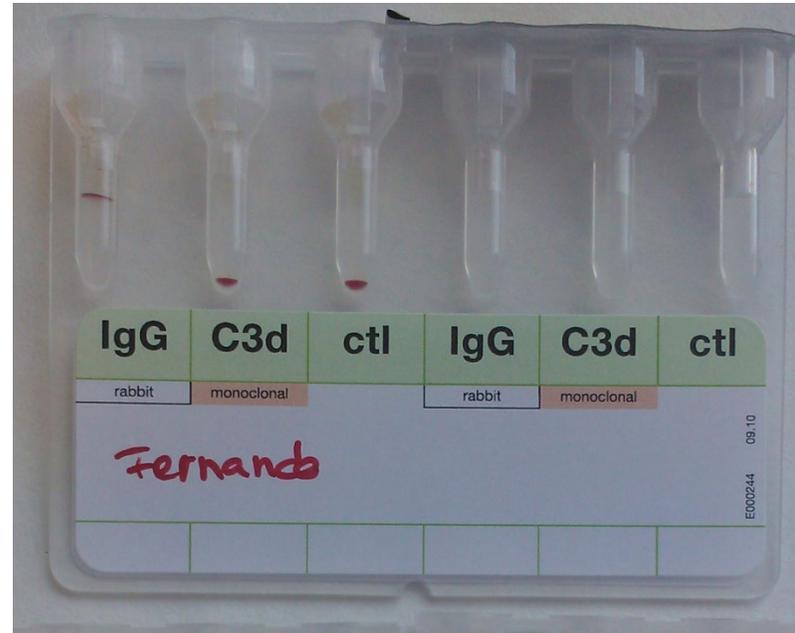
Fernando

Sospecha de AHAI.

Anemia severa

PDAG pos (IgG)

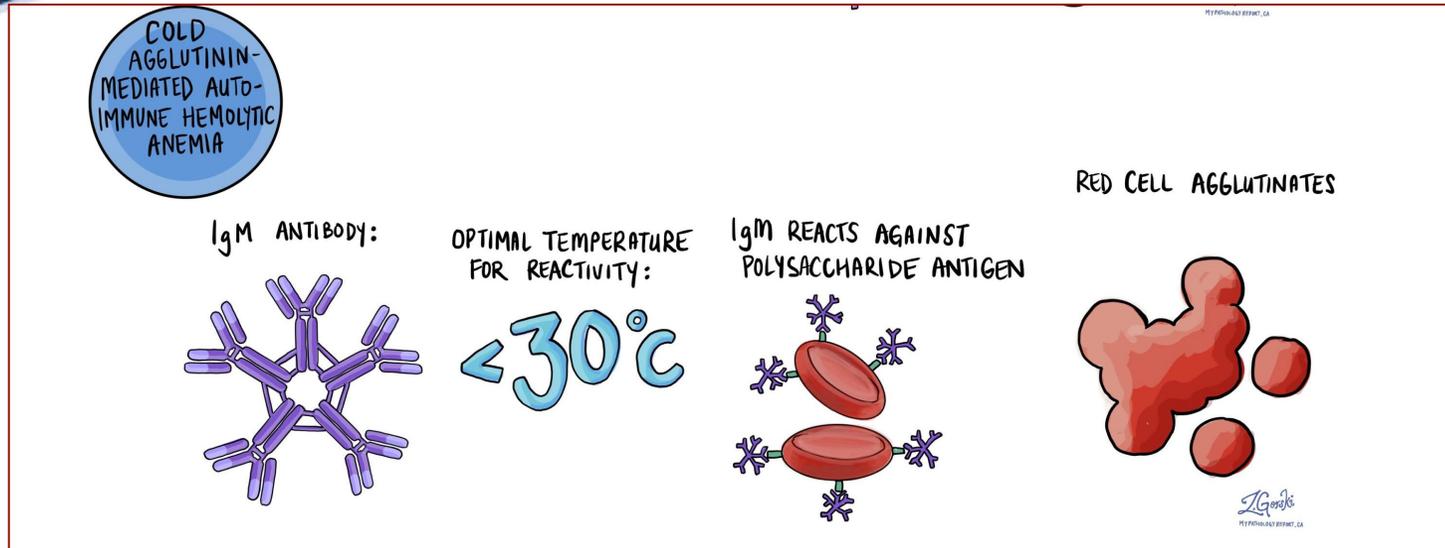
**Suero: anti-e
Fenotipo e pos**



Algunos autoanticuerpos presentan una especificidad "relativa", a menudo ligada a antígenos del sistema Rh y en especial al antígeno e.



Hemólisis por crioaglutininas (Dacie, 1957)



Hemólisis

- Extravascular
- Intravascular

- Crioaglutinina, con alto título (1/32, 1/512)
- Amplitud térmica
- Idiopático/secundario
- Policlonal o monoclonal
- Especificidad anti-I/i-Pr

Anticuerpos fríos

Enfermedad por aglutininas frías primaria crónica

Síndrome de aglutininas frías secundario

Asociada con enfermedad maligna

Asociada a infección

Hemoglobinuria paroxística *a frigore*

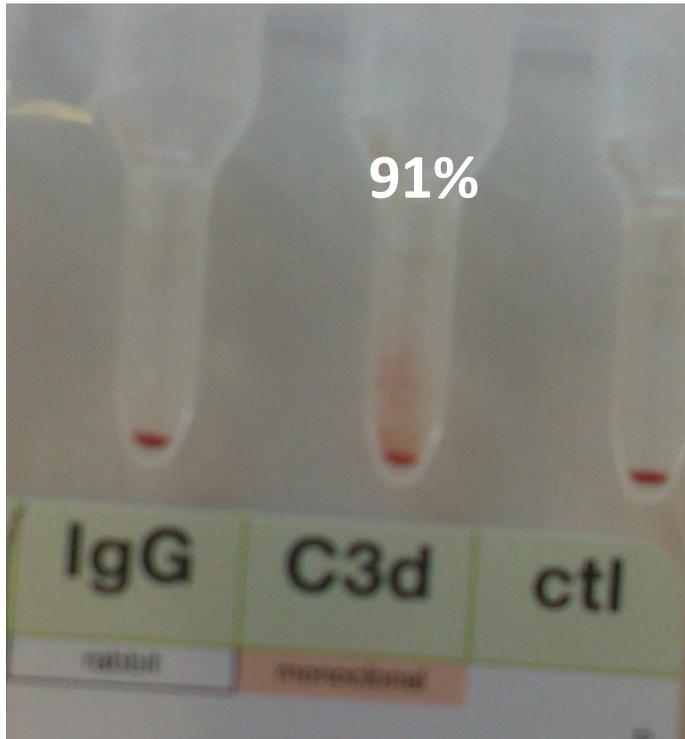


Síndrome de aglutininas frías (CAS)

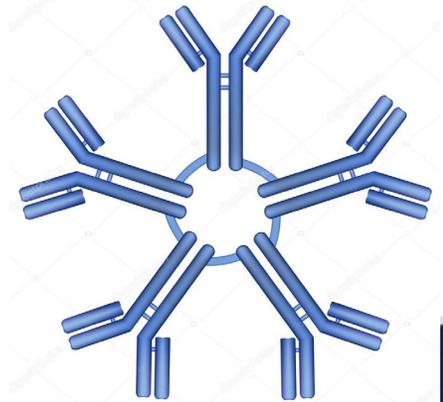
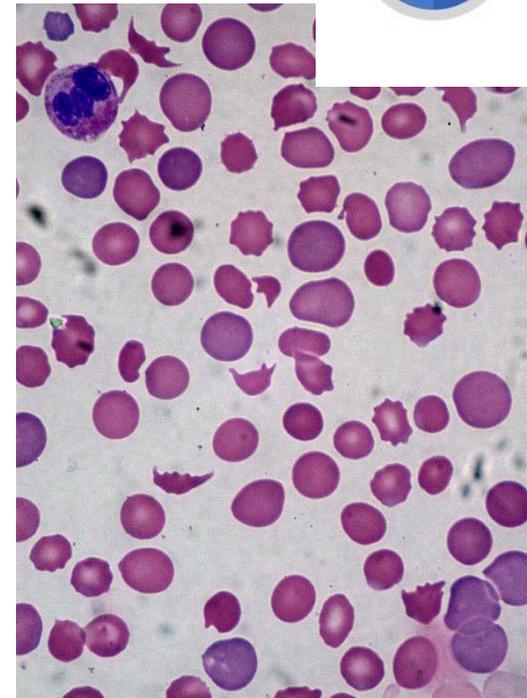
Anticuerpos fríos

Síndrome de aglutininas frías
secundario

Asociada con enfermedad maligna
Asociada a infección



ELUIDO
NO REACTIVO



Paciente con AHAI. Anemia severa. Mala tolerancia

PETICIÓN DE TRANSFUSIÓN!!!

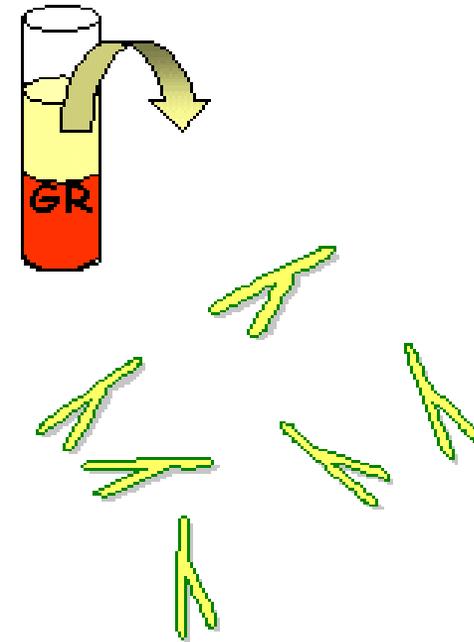


URGENTE



Paciente con autoanticuerpos

- Suele tener **anemia severa**: urgencia
- **Autoanticuerpo libre** en plasma en > 80% casos.
- A veces, autoanticuerpo “**frío**”
- Alta **incidencia de aloinmunización** (15-40%)
Es importante descartar posibles Alos
- Mayor **riesgo de aloinmunización**:
Transfundir lo mas isofenotipo posible



Paciente con autoanticuerpos

Pruebas pre-transfusionales

PROBLEMAS

Dificultad en el tipaje ABO y Rh (D)
(crioaglutininas)

SCR y panel positivo por el auto
“plasma SUCIO”.

Enmascara posibles alos

PC INCOMPATIBLES (No cruza ninguna bolsa)



Paciente con autoanticuerpos

Pruebas pre-transfusionales

PROBLEMAS

Dificultad

(crioag)

SCR y p

“plasm

Enma:



D)

PC positivas (No cruza ninguna bolsa)



Paciente con autoanticuerpos

Prueba de transfusión

PROBLEMAS

Dificultad

(crisis)

SCF

“plasma”

Enma:

PC positivas (No cruza ninguna bolsa)



Paciente con autoanticuerpos

Pruebas pre-transfusionales

CUÁL ES NUESTRO MIEDO??

Los posibles aloanticuerpos ocultos por el autoanticuerpo

QUÉ HEMOS DE HACER?

Eliminar el autoanticuerpo para ver si debajo hay aloanticuerpos clínicamente significativos



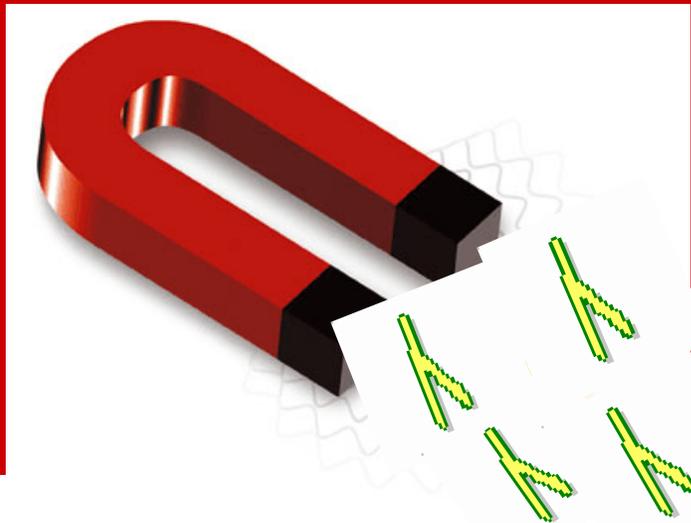
Para eliminar el autoanticuerpo: **Adsorción**

Objetivo:

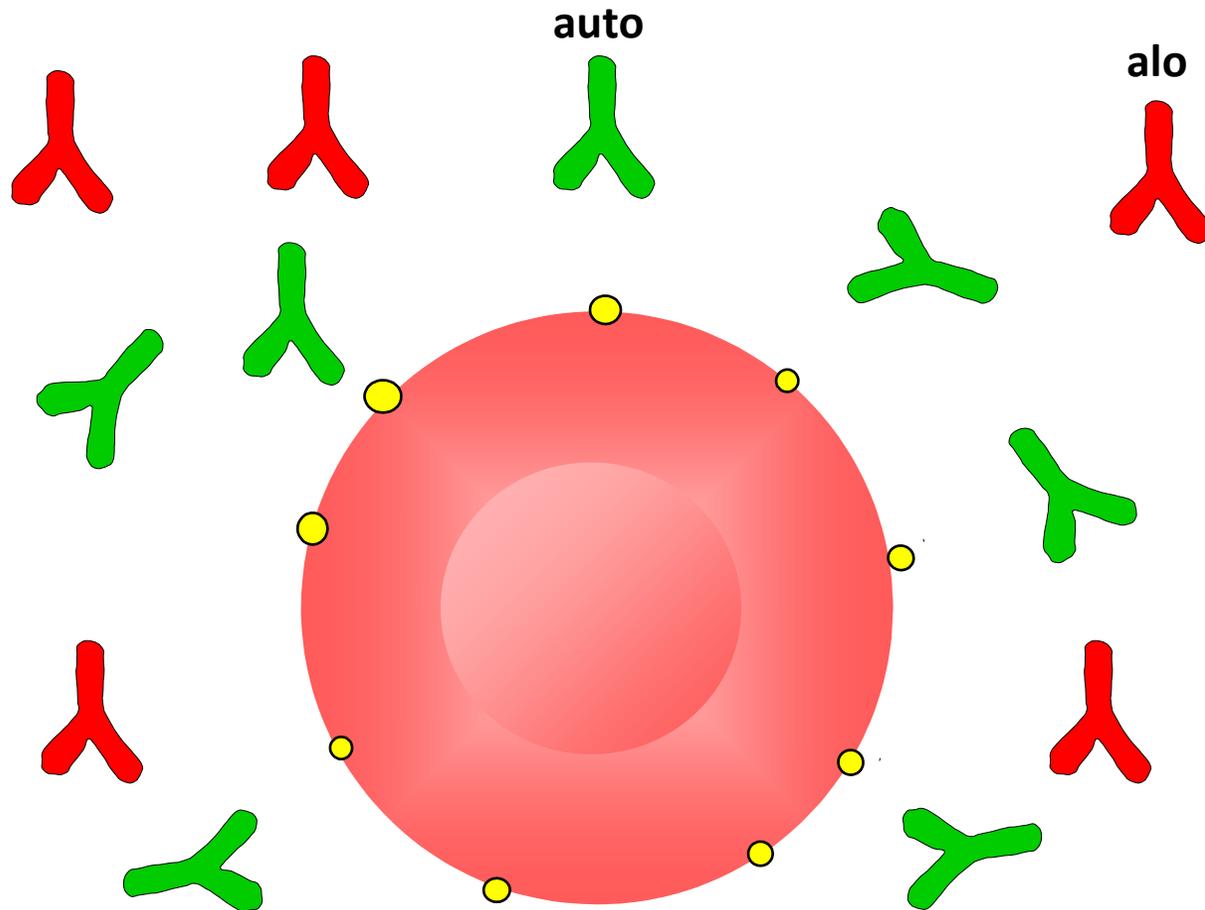
Obtener un **plasma libre de autoanticuerpo** para:

- Descartar posibles aloanticuerpos ocultos
- Poder obtener **pruebas cruzadas compatibles**

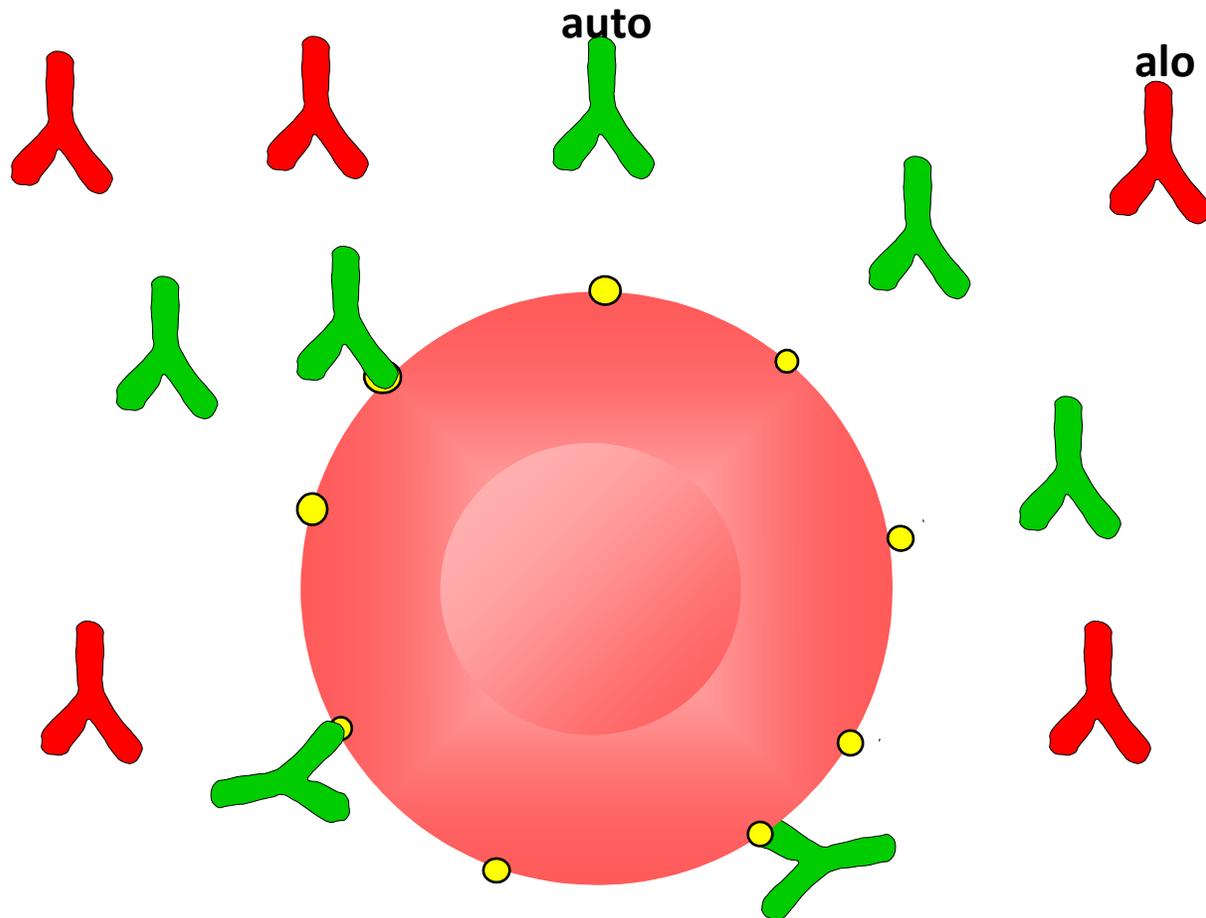
“Limpiar” el
plasma?



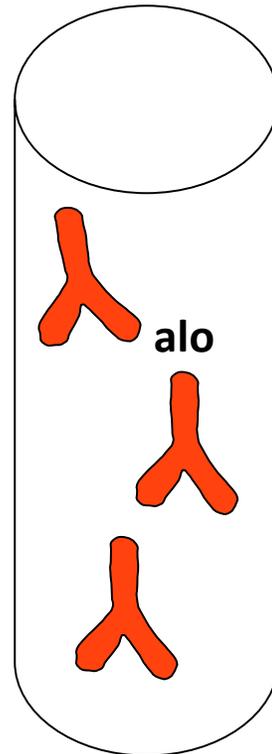
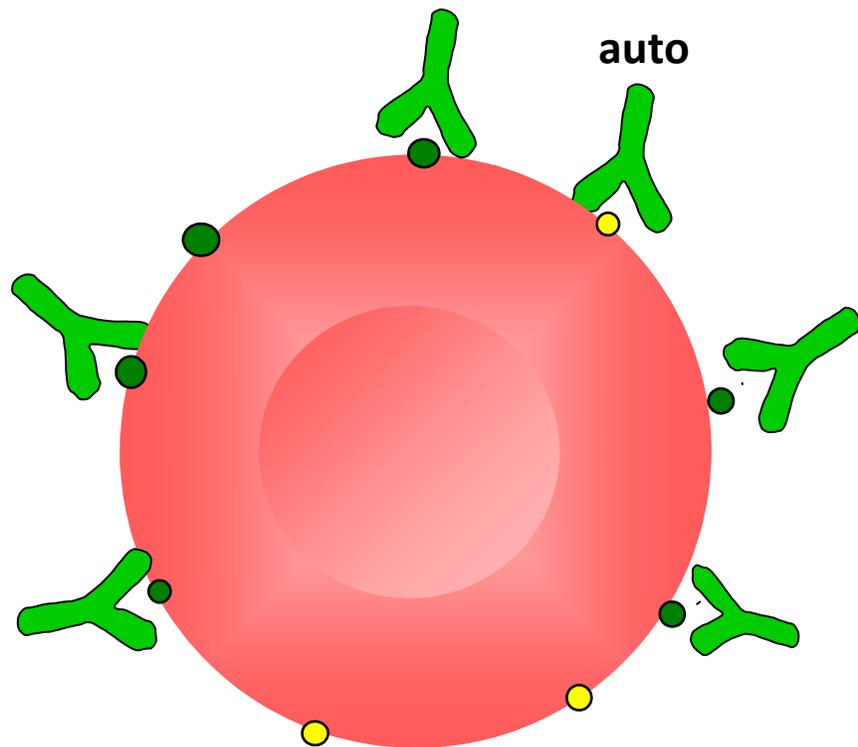
Adsorción



Adsorción



Adsorción



Estudio de AI

Pruebas cruzadas

PLASMA ADSORBIDO



Adsorción

Autoadsorción

Hematíes autólogos

Aloadsorción

Hematíes alogénicos

Técnicas

ZZAP

LISS

ENZIMAS

PEG



- ❖ Polímero lineal soluble en agua
- ❖ Mecanismo de acción: ocupación de espacio
- ❖ Autoadsorciones. *Transfusion* 1995;35:713.



Estrategia en las adsorciones

adsorción

1. ¿se ha transfundido el paciente en los últimos 3 meses?

SI

NO

ALOADSORCION

2. ¿hay suficiente muestra?

NO

SI

3. ¿se conoce el fenotipo?

SI

NO

Aloadsorción
con 1 célula
isofenotipo

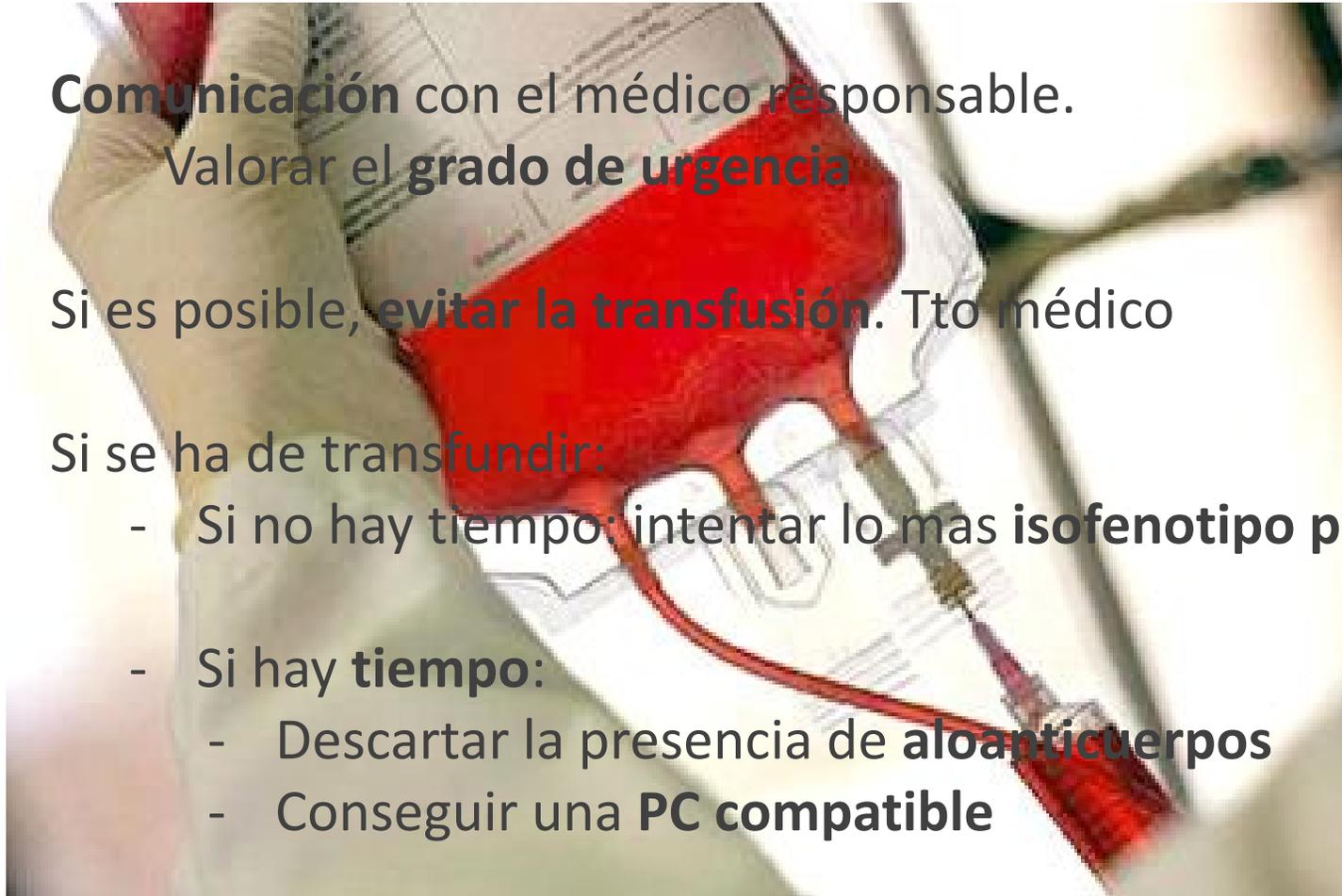
Aloadsorciones
diferenciales

AUTOADSORCION



Que hay que tener en cuenta para transfundir al paciente con autoanticuerpos?

- **Comunicación** con el médico responsable.
Valorar el **grado de urgencia**
- Si es posible, **evitar la transfusión**. Tto médico
- Si se ha de transfundir:
 - Si no hay tiempo: intentar lo mas **isofenotipo** posible
 - Si hay **tiempo**:
 - Descartar la presencia de **aloanticuerpos**
 - Conseguir una **PC compatible**



En casos muy graves y con poca tolerancia es mas importante transfundir, aunque el estudio no se haya completado, que dejar al paciente sin transfusion.



GRACIAS

