



MANLAB®
Diagnóstico Bioquímico

Prueba de coombs indirecta: evaluación de muestras por método tradicional y método en gel

 8 min.



En este artículo se realiza una comparación de la prueba de coombs indirecta por el método LISS/COOMBS DiaMed-ID (kit comercial) y método LISS en tubo. Las propiedades intrínsecas del método semiautomatizado lo hacen superior en cuanto a sensibilidad.



Maricel A. Lugo*, Ana Laura Bertone Uña*, Leonardo Donlo**

* Residentes de 2º año, ** Jefe del Área Hematología de Génesis-MANLAB
Dto. de Docencia e Investigación



E-mail: docencia@genesis-manlab.com.ar



Introducción

La enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) es una anemia hemolítica del feto y el recién nacido que ocurre cuando a los anticuerpos maternos

frente antígenos fetales cruzan la placenta y causan hemólisis o supresión de los progenitores de los eritrocitos fetales. Esto último ocurre con anticuerpos frente al sistema Kell.

Como la IgG es la única inmunoglobulina que atraviesa la placenta, sólo los anticuerpos antieritrocitarios de esta clase son una causa potencial de enfermedad hemolítica del recién nacido. Los anti-D causan la forma más grave de EHRN, pero el éxito de la profilaxis post natal con inmunoglobulinas anti-D ha reducido el número de casos y la rutinaria profilaxis anti-D prenatal lo reducirá aún más. Aunque la forma más grave de EHRN es causada por los anticuerpos anti-D, los anti-c pueden ocasionar una significativa hemólisis intrauterina, suficiente para causar la muerte intrauterina y para justificar su detección en el embarazo.

Los anti-K tienen un modo diferente de acción, pero también pueden conducir a una grave afectación del feto.

Otros anticuerpos IgG (por ej: anti-E, anti-Ce, anti-Fy^a y anti-Jk^a), aunque de manera poco frecuente, ocasionan una hemólisis fetal de suficiente gravedad para merecer intervención prenatal.

La EHRN debida a anticuerpos ABO también es posible. Debido a que la frecuencia de expresión de los diferentes antígenos eritrocitarios y el grado de afectación fetal que causan, es muy variable, la detección de forma sensible de los anticuerpos dirigidos contra dichos antígenos es un aspecto sumamente relevante en el diagnóstico de la enfermedad.

Las características intrínsecas del método de Liss en tubo, hacen a la determinación de anticuerpos anti eritrocitarios poco sensible. Debido a esto se ha desarrollado un kit comercial con un pool de hematíes que expresan los antígenos con relevancia clínica en el desarrollo de la EHRN y con una mejora en la visualización de los inmunocomplejos.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de la correlación entre los métodos de Liss en tubo y Liss/Coombs DIAMED-ID para la detección de anticuerpos antieritrocitarios.

- Método LISS/COOMBS DiaMed-ID, kit comercial compuesto por un panel de dos poblaciones de glóbulos rojos, y por cassettes de policubetas con el antisuero



MEDICINA GENÓMICA

Contamos con un perfil integral que incluye los análisis referidos a los avances en genética:

Cánceres Hereditarios

- Cáncer hereditario de mama y/u ovario (Genes BRCA 1 y BRCA 2)
- Detección de p53 (exones 4-5-6-7-8-9)
- HER2/NEU
- K-Ras

Citogenética

- Cariotipo de Alta Resolución
- Cariotipo en material de aborto espontáneo
- Citogenética clásica
- Citogenético prenatal en Vellosidades Coriónicas - Cultivo
- Citogenético prenatal en Vellosidades Coriónicas - Directo
- Cr22Q11

Enfermedades Cardiovasculares

- Apo E (Estudio de alelos asociados a riesgo vascular)
- ECA (Enzima convertidora de angiotensina)
- Genotipo CYP2C9 (Hipersensibilidad a la Warfarina)

Enfermedades Hereditarias

- Alzheimer (variantes alélicas de Apo E)
- Ataxia de Friedreich
- Ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA-1)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA-2)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA-3)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA-6)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA-7)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 8 (SCA-8)
- Atrofia espinal bulbar (Enfermedad de Kennedy)
- Atrofia muscular espinal tipo I (SMA I)
- Charcot Marie-Tooth IA
- Corea de Huntington
- Distonía de torsión temprana (DYT 1)
- Distrofia miotónica de Steiner
- Distrofia óculo faríngea
- Duchenne, distrofia muscular (9 deleciones)
- Fibrosis Quística (Mutación Delta F508)
- Fibrosis Quística (Otras Mutaciones)
- Fragilidad del cromosoma X
- Fragilidad del cromosoma X en Diag. Prenatal
- Neuropatía tomaculosa(HNPP)
- Poliquistosis renal (PKD I y/o PKD II).
- Estudio de ligamiento Fliar.
- Prader Willi(paciente-padre-madre) Microsatélites
- Prader Willi-metilación (presencia de la mutación)
- Síndrome de Angelman (paciente-padre-madre)Microsatélites
- Síndrome de Angelman-metilación (presencia de la mutación)
- Sordera hereditaria (Mutación 35delG en el gen de la conexina 26)

Enfermedades Metabólicas

- Galactosemias
- Enfermedad de Gaucher
- MELAS(secuenciación del transfer de leucina)
- Enfermedad de Canavan
- Enfermedad de Tay-Sachs
- MERRF (A834G en ARNt lisina)
- NARP (T8993G en ADN mitocondrial)
- Panel Askenazi (caso índice)
- Panel Askenazi (cada Fliar.)

Esterilidad

- AZF(Estudio de 9 microdeleciones en el cromosoma Yg11)
- SRY(Detección del gen SRY)
- Determinación de la variante 5AT en el gen de la fibrosis quística

Estudios de Filiación e Identidad

- Filiación (padre alegado-hijo)
- Filiación (padre alegado-hijo-madre)
- Tipificación de ADN (DNA Typing)

Infectología

- Adenovirus (genoma)
- Bordetella pertussis (genoma)
- Chlamydia trachomatis(genoma)
- Citomegalovirus (CMV) (genoma)
- Citomegalovirus (CMV) Carga Viral
- Coxsackie virus (genoma)
- Echovirus (genoma)
- Enterovirus (EV) (genoma)
- Epstein - Barr (EBV) (genoma)
- Epstein Barr Carga Viral
- Hepatitis B (HBV) (genoma)
- Hepatitis B (HBV) (carga viral)
- Hepatitis B(HBV) (genotipificación)
- Hepatitis C (HCV)(carga viral)
- Hepatitis C (HCV)(genoma)
- Hepatitis C (HCV)(genotipificación)
- Herpes 6 (genoma)
- Herpes simplex I y II (HSV I y II) (genoma)
- HIV (DNA Proviral)
- HIV (carga viral)
- HIV (genoma)
- HIV (Resistencia a antirretrovirales)
- HTLV I y II (genoma)
- Mycobacterium tuberculosis (genoma)
- Mycoplasma pneumoniae (genoma)

- Papilomavirus (HPV) (tipificación subtipos 16 y 18)
- Parvovirus (genoma)
- Pneumocystis carinii (genoma)
- Toxoplasma gondii (genoma)
- Trypanosoma cruzi (genoma)
- Varicela zoster (VZV)(genoma)
- Virus JC (genoma)

Inmunología y Transplante

- Cross Match contra donante
- Cross Match frente a panel
- HLA 29
- HLA ABC
- HLA B27
- HLA DQ
- HLA DR
- Quimerismo (estudio pre y post trasplante)

Neoplasias Hematológicas

- Beta Talasemia
- Citogenética clásica en leucemias
- Deleciones de Tal 1 (del gen Tal/SIL-TAL 1)
- Factor II de Protrombina (Mutación G20210)
- Factor V de Leiden
- Hemocromatosis (Mutación C282Y)
- Hemocromatosis (Mutación H 63 D)
- Inmunofenotipo en leucemias
- Inversión i(16)/CBFB-MYX II
- Jak 2
- MTHFR
- PAI (polimorfismo 4G/5G en PAI-1)
- Rearreglo del Gen del receptor de Células T/ TCR-y
- Traslocación Bcl-1/ t (11;14)
- Traslocación Bcl-2/IgH t (14;18)
- Traslocación BCR-ABL t (9;22) Cuantificación
- Traslocación BCR-ABL t (9;22) Detección de p190/p210
- Traslocación PML-RAR alfa t (15-17)
- Traslocación t (1,19)
- Traslocación t (8,14)
- Traslocación t (8,21), (M2)/AML1-ETO
- Traslocación t (12,21)/ TEL-AML1
- Traslocación t (2,5) ALK
- Traslocación t (4,11)

correspondiente provistos por el fabricante.

- Método LISS en tubo, pool de glóbulos rojos Rh +, en una dilución 0.5 g/dL de hemoglobina, solución de Liss, antisuero de Coombs.

- Sueros de 200 pacientes remitidos entre julio y diciembre de 2008 a nuestro laboratorio.



Tabla 1: Anticuerpos anti eritrocitarios con relevancia clínica en la enfermedad hemolítica del recién nacido

GRUPO	ANTI CUERPO	IMPLICAN- CIA EN EHRN	FRECUENCIA ANTIGÉ- NICA (%)
ABO	A	Leve	40
	B	Leve	11
	A1	NO	30
	H	-	>99.9
RH	D	Severa	85
	C	Severa	70
	E	Severa	30
	c	Severa	80
	e	Leve / Severa	98
	f(cc)	Severa	64
	C ^W	Severa	1
V	Severa	<1	
li	I, i	No/Leve	>99.9
P (GLOB)	P ₁ , P PP ₁ P ^K	No/ Leve Leve/ Severa	79 >99.9
MNSs	M, N	Raro	78
	S	Leve	55
	s	Leve / Severa	89
	U	Leve/ Moderada	100
Kell	K	Leve/ Severa	9
	k	Leve/ Severa	99.9
	Kp ^a	Leve/ Moderada	2.3
	Kp ^b	Leve/ Moderada	>99.9
	Js ^a	Leve/ Severa	-
	Js ^b	Leve/ Severa	>99.9
Duffy	Fy ^a , Fy ^b	Leve/ Severa	60-80
Kidd	Jk ^a , Jk ^b	Leve/ Moderada	70-80
Lutheran	Lu ^a	No/ Leve	7.7
	Lu ^b	Leve	99.9



Tabla 2: Contenido antigénico de los hematíes utilizados en el kit comercial evaluado

	Rh-hr	D	C	E	c	e	C ^W
CCD.ee	+	+	0	0	+	+	0

CcD.EE + 0 + + 0 0

Kell
K k Kp^a Kp^b Js^a Js^b
CCD.ee + + 0 + 0 +
CcD.EE 0 + 0 + 0 +

Duffy Kidd Lewis
Fy^a Fy^b Jk^a Jk^b Le^a Le^b
CCD.ee + + + + + 0
CcD.EE + 0 + + 0 +

P MNS
P₁ M N S s
CCD.ee + + + 0 +
CcD.EE + + + + +

Luth Xg
Lu^a Lu^b Xg^a
CCD.ee 0 + +
CcD.EE 0 + 0

Resultados



MÉTODO DE LISS EN TUBO	MÉTODO DE LISS EN TUBO		
	POS.	NEG.	TOTAL
LISS/COOMBS POS.	30	77	107
DIAMED-ID NEG.	0	93	93
TOTAL	30	170	200



Índice kappa: 0.27

Valoración del Índice Kappa

Valor de k	Fuerza de la concordancia
<0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Discusión

Debido a la relevancia clínica de la EHRN, la detección de los anticuerpos antieritrocitarios es fundamental para instaurar el tratamiento profiláctico a tiempo.

Las propiedades intrínsecas que hacen al método semiautomatizado superior en cuanto a su sensibilidad están relacionadas por un lado al contenido

antigénico del panel de hematíes utilizado, el cual contiene la gran mayoría, sino todos, de los antígenos con relevancia clínica en la EHRN descriptos hasta el momento. El otro factor a considerar, es la visualización del resultado, ya que al generarse una interacción de la muestra previamente incubada con el antisuero, con una resina que dificulta la sedimentación de los inmunocomplejos, la sensibilidad en la visualización es mucho mayor.

El análisis estadístico no pone de manifiesto la especificidad del método utilizado, pero la presencia de falsos positivos, si los hubiera, no genera una actitud clínica que ocasione un perjuicio a la salud del paciente.

Conclusión

Del análisis estadístico, con un índice de concordancia kappa de 0.27, podemos concluir que, en nuestra población en estudio la prueba de Coombs indirecta por el método semiautomatizado tiene baja concordancia con el método de Liss en tubo para la detección de anticuerpos antieritrocitarios.



Bibliografía

- S. M. Lewis, B. J. Bain, I. Bates. Dacey y Lewis, Hematología Práctica, 10^o edición, Elsevier, 2008.
- E. Beutler, M. A. Lichtman, B. S. Coller, T. J. Kipps, U. Seligsohn. Williams, Hematología. 6^o ed, Marban, 2005.