

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

"Desarrollo y Evaluación de una Solución de Albúmina Humana a Baja Fuerza Iónica (ABFI) como Medio de Reacción para la Detección de Anticuerpos Antieritrocito"

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Martha Patricia Macías Pimentel

México, D. F.

1983

T
RB46
.5
M3
c.1



1080075087



UNIVERSIDAD MOTOLINIA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

"Desarrollo y Evaluación de una Solución de Albúmina Humana a Baja Fuerza Iónica (ABFI) como Medio de Reacción para la Detección de Anticuerpos Antieritrocito"

Martha Patricia Macías Pimentel

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Martha Patricia Macías Pimentel

México, D. F.

1983

Jurado asignado originalmente según el tema:

Presidente: M. en C. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta
Vocal: Q.F.B. Ignacio Díez de Urdanivia
Secretario: Q.F.B. J. Alejandro A. Meneses Castañón
1er. Vocal: Q.F.B. Olga L. Galicia Aguilar
2do. Vocal: Q.F.B. Arturo M. Meneses Castañón

Sitio donde se desarrolló el tema:

Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional, IMSS

Asesor del tema:

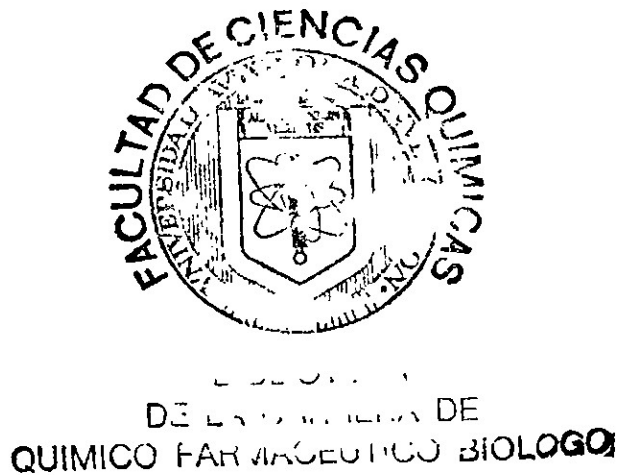
Q.F.B. J. Alejandro A. Meneses Castañón

Sustentante:

Martha Patricia Macías Pimentel



(75087)





DE LA CÁTEDRA DE
QUIMICO FARMACOLÓGICO BIOLÓGICO

¿Cómo puede un hombre sin fantasía
entender la realidad?

A. Kekulé

CONTENIDO

Introducción	1
I Reacción Antígeno-Anticuerpo	5
1.1 Generalidades de la primera fase	5
1.1.1 pH	8
1.1.2 Temperatura	12
1.1.3 Fuerza iónica	19
1.2 Reacción de hemaglutinación o segunda fase	23
1.2.1 Antígenos eritrocitarios; número, localización, características generales y efectos de carga	24
1.2.2 Anticuerpos anti-eritrocito; características generales	35
II Agentes físicos, químicos y físico-químicos que ayudan a la segunda fase de la reacción antígeno-anticuerpo	40
2.1 Baja Fuerza iónica	40
2.2 Polímeros y Polielectrolitos	40
2.2.1 Albúmina	44
2.3 Enzimas	49
2.4 Antiglobulina Humana	49
2.5 Centrifugación	52

III	Material y Métodos	53
3.1	Material	53
3.1.1	Material Biológico	53
3.1.2	Material de Vidrio	53
3.1.3	Aparatos	54
3.2	Métodos	54
3.2.1	Desarrollo de la solución de albúmina humana a baja fuerza iónica (ABFI)	54
3.2.2	Verificación de las propiedades físico-químicas y biológicas de la solución ABFI	55
3.2.3	Evaluación del reactivo frente a la metodología empleada habitualmente en un banco de sangre	57
IV	Resultados	60
4.1	Estabilidad	60
4.2	Concentración	60
4.3	Isotonicidad	60
4.4	Pureza	61
4.5	Determinación del tiempo óptimo de reacción, de la sensibilidad y del modo de empleo de la solución ABFI	61
4.6	Problemas	68
4.7	Análisis de resultados	109

V	Discusión	111
VI	Conclusiones	129
VII	Bibliografía	132

INTRODUCCION

Dentro del trabajo que se realiza en un banco de sangre, se encuentra la solución de problemas inmunohematológicos, en los cuales cae la búsqueda de anticueros antieritrocito fuera del sistema ABO como prueba de compatibilidad serológica - pretransfusional. La finalidad de esta prueba es dar la seguridad, de que tanto el plasma del receptor como del donador carecen de anticuerpos dirigidos contra los antígenos eritrocitarios que comunmente son responsables de la producción de anticueros, logrando así que la efectividad terapéutica de los eritrocitos transfundidos sea óptima.

Normalmente, tanto la prueba empleada para la detección de anticueros antieritrocito, como las pruebas de compatibilidad pretransfusional requieren de más de 60 minutos en promedio para llevarse a cabo, tiempo del que, en muchas ocasiones no se dispone debido a la gravedad del paciente. Considerando que el tiempo de incubación para los medios salinos y albuminosos es de 60 minutos, sería necesario - tener el tiempo suficiente para efectuar varias pruebas a diferentes temperaturas y medios simultáneamente, a reserva de usar además la prueba de la antiglobulina humana o suero de Coombs. Es, por consiguiente, importante efectuar dichas pruebas en el menor tiempo posible sin sacrificar la sensibilidad del trabajo.

Por otra parte, se sabe que en estas pruebas pretransfusionales deben incluirse varias técnicas a la vez para poder abarcar todas o por lo menos la mayoría de las posibilidades de conducta que presentan los anticuerpos antieritrocito. Para cubrir esta gama de posibilidades, se ha recomendado el empleo de medios salinos, coo

loidades o de alto contenido proteico, de baja fuerza iónica y enzimáticos, y de la antiglobulina humana o suero de Coombs; pero como no siempre se dispone de una cantidad suficiente de muestra ni de los reactivos necesarios para poder llevar a cabo estas técnicas, deben conocerse las ventajas y desventajas que presentan unas y otras, y así escoger las más adecuadas.

Los medios salinos sirven principalmente para la detección de anticuerpos de clase IgM, y sólo a veces si van seguidos de la prueba de la antiglobulina humana, para los IgG. El uso de sustancias coloidales como agentes suspensores de los eritrocitos, o como diluyentes de los anticuerpos es el método más simple para demostrar anticuerpos de clase IgG (XIX:41,55), existiendo algunos que sólo pueden ser demostrados mediante el tratamiento enzimático previo de los eritrocitos; sin embargo, se corre el riesgo de destruir otros sitios antigénicos pertenecientes a ciertos grupos sanguíneos (M, N, S, Fy, etc.), y más aún, el de romper o alterar la estructura molecular de los anticuerpos si el tiempo de incubación no es el adecuado (XII:431). Los medios de baja fuerza iónica pueden tener un efecto definitivo sobre la reacción antígeno-anticuerpo al aumentar la velocidad de combinación de los antígenos eritrocitarios con sus correspondientes anticuerpos, lo cual se traduce en una reducción del tiempo de la prueba (48).

En sistemas como el ABO y Lewis, el grado de asociación entre antígenos y anticuerpos generalmente no se favorece por el uso de un medio de baja fuerza iónica (45,46). Dada la naturaleza química de estos antígenos, es de esperarse que no se presenten grupos iónicos que puedan ser afectados por la fuerza iónica (10). No obstante, se ha sugerido que esta característica se debe a que los antígenos corres-

pendientes a estos sistemas, se encuentran fuera de la capa iónica que rodea al eritrocito y por tanto la modificación que pueda sufrir esta nube no influye sobre dichos antígenos (46).

Sin embargo, algunos anticuerpos contra antígenos del sistema Lewis se han encontrado empleando una baja fuerza iónica. Asimismo, ha sido útil para la detección de grupos A ó B débiles, el uso combinado de enzimas y baja fuerza iónica (25).

Se ha visto, a través de infinidad de estudios que las técnicas más sensibles para la detección de anticuerpos de clase IgG junto con la antiglobulina humana son aquellas que utilizan una baja fuerza iónica o el tratamiento enzimático. Le sigue en efectividad el uso de la albúmina bovina y el último término se encuentra la prueba salina (20, 28, 37, 44, 51, 68, 78, 80).

Si en lugar de efectuar todas las técnicas antes mencionadas, se lograra combinar algunas de ellas que permitiesen poner en evidencia los anticuerpos de mayor importancia inmunohematológica reduciendo el tiempo de la prueba y logrando además mejores, o por lo menos, iguales resultados a los que se encuentran usando cada una de las técnicas por separado, la cantidad de muestra empleada sería menor, hecho muy importante cuando no se dispone en forma suficiente de ella.

Hasta la fecha, se ha considerado principalmente sólo el efecto de la albúmina bovina en cuanto a la elevación de la constante dieléctrica en las reacciones inmunohematológicas, sin tomar en cuenta su fuerza iónica (61). Existen algunos reportes en que se menciona el uso de un medio a baja fuerza iónica seguido de una prueba albuminosa, es decir, como una técnica de dos pasos como mínimo (28, 37, 45,

78). Recientemente, la idea de usar albúmina bovina a baja fuerza iónica ha cobrado interés, al observar que tal vez el efecto que produce no es sólo el resultado de su constante dieléctrica o de su grado de polimerización, sino también de su fuerza iónica (14, 45, 46, 61).

Por lo tanto, en la presente tesis se propone la sensibilización eritrocitaria con anticuerpos incompletos en un medio albuminoso a baja fuerza iónica, seguida del uso de la antiglobulina humana en caso de ser necesario. Esta técnica toma menos tiempo que el preparar células modificadas por alguna enzima y no presenta la posibilidad de destrucción de determinados antígenos eritrocitarios, constituyendo así un método adecuado para efectuar una prueba cruzada de carácter urgente.

Reacción Antígeno-Anticuerpo

Cuando un antígeno y su anticuerpo específico se aproximan físicamente, las dos moléculas interactúan entre sí. Debe considerarse que la reacción se lleva a cabo en dos fases; la primera, que puede ser descrita bajo términos físico-químicos y que consiste en la combinación del antígeno con el anticuerpo para tener un primer complejo, y la segunda en la formación de complejos mayores al reaccionar el anticuerpo del primer complejo con el antígeno de otro complejo.

Para favorecer la reacción antígeno-anticuerpo puede modificarse el medio en que se produce, y es entonces que deben tenerse en cuenta ciertas características físico-químicas que la determinan.

1.1 Generalidades de la primera fase

La combinación entre el anticuerpo y su antígeno correspondiente puede representarse de la siguiente forma:



donde Ag = antígeno

Ac = anticuerpo

k_a = constante de asociación

k_d = constante de disociación

$AgAc$ = complejo formado

El grado de asociación antígeno-anticuerpo es la avidéz con que se lleva a cabo la reacción; estando esta a su máximo cuando cada colisión entre los sitios - reaccionantes resulte en unión, para lo cual (como cualquier reacción química), - requiere de una cierta energía de activación (31).

La reacción antígeno-anticuerpo está sujeta a la ley de acción de masas que establece "la velocidad de una reacción química es directamente proporcional al producto de las masas activas de los reactivos". La masa activa se asume que es proporcional a la concentración molecular de las sustancias disueltas. Por lo tanto, la velocidad de la reacción hacia la derecha en la ecuación (1)*, es proporcional al producto de las concentraciones moleculares de Ag y Ac :

$$V_a = k_a \times [Ac] \times [Ag] \quad (2)$$

y la velocidad de la reacción hacia la izquierda es:

$$V_d = k_d \times [AgAc] \quad (3)$$

si en equilibrio $V_a = V_d$ entonces

$$k_a \times [Ac] \times [Ag] = k_d \times [AgAc]$$

$$\frac{[AgAc]}{[Ag] \times [Ac]} = \frac{k_a}{k_d} = k_{eq} \quad (4)$$

es decir, que la constante de equilibrio (k_{eq}) se alcanza cuando $k_a = k_d$ (35)

(1)* Ver página .5

La constante de equilibrio puede considerarse como la medida de la fuerza de la asociación que hay entre el antígeno y el anticuerpo; cuando es elevada, - los enlaces entre los dos serán difícilmente rotos (IV:30-31). Se han encontrado - constantes de equilibrio muy diferentes para ejemplos diversos de anticuerpos, inclu_ sive de la misma especie; dichas diferencias se reflejan en la avidez que desple_ gan los anticuerpos (35, IV:30-31). Por ejemplo, se han encontrado en promedio las siguientes constantes de equilibrio para algunos anticuerpos (VII:217, 313, 356):

$$\text{anti-A} = 6.0 \times 10^7 - 1.3 \times 10^9 \text{ l/mol} \quad (\text{IgG})$$

$$\text{anti-D} = 1.4 \times 10^7 - 1.2 \times 10^9 \text{ l/mol}$$

$$\text{anti-E} = 4.0 \times 10^8 \text{ l/mol}$$

$$\text{anti-e} = 2.5 \times 10^8 \text{ l/mol}$$

$$\text{anti-c} = 3.2 - 5.6 \times 10^7 \text{ l/mol}$$

$$\text{anti-K} = 0.6 - 4.5 \times 10^{10} \text{ l/mol}$$

Comparando el valor de la constante de equilibrio del anti-D y el anti-K, se deduce que la unión anti-K-K será más fuerte que la anti-D-D.

El valor de la constante de equilibrio no sólo da una información relativa a la naturaleza de la unión entre antígeno y anticuerpo. Para que los eritrocitos sen sibilizados sean destruidos por el organismo, se necesita un mínimo de moléculas de anticuerpo unidas a cada célula. Este valor mínimo está dado por la relación - - $[\text{AgAc}]/[\text{Ag}]$. Ordenando los términos de la ecuación (4), se observa que la propor_ ción $[\text{AgAc}]/[\text{Ag}]$ depende de k_{eq} y $[\text{Ac}]$ (34, 35):

$$\frac{[\text{AgAc}]}{[\text{Ag}]} = k_{eq} \times [\text{Ac}] \quad (5)$$

La constante de equilibrio es también una medida de la efectividad biológica del anticuerpo; los anticuerpos que tienen los valores más altos de k_{eq} , son los más activos, ya que pueden alcanzar mejor la proporción $[AgAc]/[Ag]$ aún cuando se encuentren a bajas concentraciones plasmáticas (35).

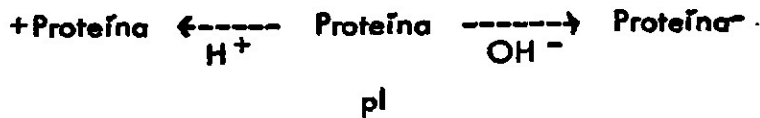
Se sabe que la constante de equilibrio (k_{eq}) depende a su vez de la concentración de iones hidrógeno (pH), temperatura (T) y fuerza iónica (μ) proporcionados por el medio de reacción (12,33,34). Ya que tanto los antígenos como los anticuerpos son en gran parte de carácter proteico, los parámetros mencionados anteriormente afectarán la primera fase de la reacción antígeno-anticuerpo en la medida en que modifiquen la conformación de las proteínas (V:53).

1.1.1 pH

Las proteínas son compuestos de alto peso molecular constituidas por una secuencia ordenada de aminoácidos en una o más cadenas; debido a esta composición, es que se consideran como anfóteros o electrolitos anfóteros, dado que pueden actuar tanto como bases o como ácidos al ionizarse sus grupos amino y carboxilo libres (NH_3^+ , $-COO^-$) (XVIII:118). Por la ionización de estos grupos, se crean fuerzas electrostáticas no covalentes, que mantienen la estructura terciaria y por ende la estabilidad de dicha proteína (V:53). La carga neta de la proteína depende del pH del medio en que se encuentre. Existe para cada proteína un valor de pH en que su carga neta es cero, por lo cual no migra en un campo eléctrico; este pH es el punto isoeléctrico (pI) (XVIII:118).

A un pH ácido con respecto al punto isoeléctrico la proteína tendrá una car

ga neta positiva y como catión migrará hacia el polo negativo o cátodo. Igualmente, a un pH alcalino al punto isoeléctrico, la proteína tendrá una carga neta negativa, y por lo tanto, migrará hacia el polo positivo o ánodo.



Cada proteína tiene una solubilidad definida y característica en una solución, con una determinada concentración de sales y un determinado pH. La solubilidad de las proteínas está marcadamente influenciada por el pH, siendo mínima en su punto isoeléctrico e incrementándose al aumentar la acidez o alcalinidad con respecto a este punto. La explicación es la siguiente: en el punto isoeléctrico las fuerzas electrostáticas de repulsión entre las moléculas de soluto están a un mínimo y por lo tanto tienden a coalescer y precipitar. Cuando las moléculas anfólicas existen predominantemente ya sea como aniones o como cationes, las fuerzas repulsivas entre los iones son altas ya que todas las moléculas poseen un exceso de cargas del mismo signo y serán muy solubles (IV:123).

La molécula tridimensional proteica se encuentra plegada de tal forma que los aminoácidos polares (ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, etc.) están predominantemente en una parte de la molécula mientras que aquellos de cadena no polar (fenilalanina, valina, metionina, etc.), se congregarán en otra creando así zonas hidrofílicas e hidrofóbicas.

Ha sido posible demostrar que la mayoría de las cargas que presentan las proteínas a un pH cercano a la neutralidad provienen de los siguientes grupos, los cua

les se ionizan dentro de los límites de pH indicados:

- A) Grupos ácidos, que al disociarse crean zonas cargadas negativamente en la molécula proteica:



- B) Grupos básicos, que al asociarse con protones producen zonas cargadas positivamente:



Los grupos terminales de la cadena α carboxilo (pH 3.3 - 3.8) y α amino (pH 7.5 - 8) contribuyen muy poco a la carga. Los grupos amida de la glutamina y asparagina son ligeramente básicos y no se ionizarán a este pH. Por otra parte, los grupos ligeramente ácidos de la cisteína (grupo sulfhidrilo) y la tirosina (grupo -hidroxilo), ambos con un pH 9 - 10, sólo se ionizarán en una solución moderadamente alcalina (XIII:164-165).

El punto isoeléctrico de una proteína es un indicio de su carácter neto ácido o básico, lo que se verá reflejado en su carga neta cuando se encuentre a pH 7. A este pH, las cargas positivas son proporcionadas por las cadenas laterales de arginina y lisina y por aproximadamente la mitad de los residuos de histidina; las cargas negativas serán resultado de los grupos carboxilo del aspartato y glutamato - (XIII:166).

Todas las proteínas, independientemente de su función, pueden actuar como amortiguadores como resultado de su alto contenido de grupos ácidos y básicos. La albúmina, por ejemplo, con un punto isoeléctrico de 4.7 se encuentra a un pH fisiológico como anión y se comporta como ácido débil. Por eso su capacidad amortiguadora prácticamente no depende de su habilidad para reaccionar como electrolito anfótero, sino que está en función casi exclusivamente del sistema amortiguador que se forma por la mezcla de proteína ácida libre, no combinada y proteína que forma una sal con una base fuerte (III:223; VII:190-193).

Albúmina
Albuminato de Sodio

Aunque no se requiere obligatoriamente de grupos cargados formalmente en los antígenos o en los anticuerpos, es necesario que estas moléculas se encuentren ligeramente ionizadas para que la reacción antígeno-anticuerpo se produzca. Las inmunoglobulinas, proteínas plasmáticas con un pI promedio de 6.7 (5.8 - 7.3), se encontrarán al pH de la reacción con una carga eléctrica débil que permitirá en parte, a través de los grupos carboxilo y amino la interacción antígeno-anticuerpo (2,35). La fuerza final de esta interacción representa la suma de todas las fuerzas, tanto de unión como de repulsión que se originan entre las moléculas de antígeno y anticuerpo, y que se deben a fuerzas más débiles como son: puente de hidrógeno, uniones hidrófobas, fuerzas de Van der Waals, etc. (35; V:53).

1.1.2 Temperatura

Para poder comprender en una forma más sencilla el efecto de la temperatura sobre la reacción antígeno-anticuerpo, debe considerarse en este caso dicha reacción no como un fenómeno biológico, sino puramente químico y que al igual que toda reacción química genera o requiere energía para poder llevarse a cabo.

La temperatura puede tener un profundo efecto sobre el resultado final de la reacción antígeno-anticuerpo (XIX:45). Ya que la hemaglutinación es un proceso de dos fases, es posible que solo una de ellas o ambas se vean afectadas por la temperatura; todo parece indicar que es en la primera donde se ejerce su efecto principalmente (35). Así, una modificación en la temperatura conducirá igualmente a un cambio en la velocidad de reacción y por lo tanto en la constante de equilibrio (XI:571).

Arrhenius sugirió que las reacciones químicas tienen lugar como resultado de la colisión entre las moléculas, y para lo cual han de tener una energía adicional superior a la energía promedio de las moléculas reactantes del sistema (XIV:396). Esta energía se conoce como energía de activación, y se dice de aquellas moléculas que la presentan que están en un estado activado.

Este concepto se expresa por la siguiente ecuación:

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (6)$$

donde k = constante de velocidad de reacción

T = temperatura absoluta

E_a = energía de activación

R = constante de los gases

A = constante

Como consecuencia a la explicación de Arrhenius, se origina la teoría del estado de transición que interpreta la forma en que la constante de cambio varía con la temperatura indicando la existencia de una barrera inicial de energía que los reactivos deben sobrepasar antes de que la reacción se produzca (XIII:266). La energía de activación es siempre positiva y debe liberarse de las moléculas o complejos activados cuando estos cambian a su estado normal.

El resultado de la energía de activación varía de acuerdo a la naturaleza de la reacción; puede traducirse en una mayor velocidad de reacción, o en un arreglo de los átomos o grupos moleculares para producir un isómero más activo.

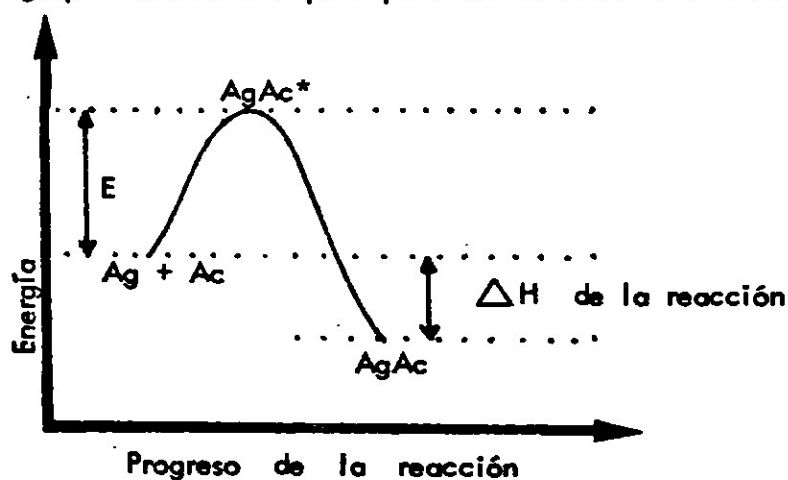


Figura 1

Las moléculas reaccionantes deben adquirir cierta energía de activación (E)

para formar el complejo de transición que después se descompone para proporcionar los productos de la reacción, o bien si la reacción es reversible, dirigirse hacia la izquierda.

El complejo activado no es un compuesto intermedio iónico y simple, sino que se le considera con las propiedades termodinámicas definidas de una molécula ordinaria que posee cierta, aunque temporal, estabilidad debido a que los enlaces entre los átomos están en proceso de formarse y romperse. Por lo tanto, los enlaces no son definitivos, como lo son en las moléculas de los reactivos o el producto (I:652; XI:584; XII:269).

La teoría del estado de transición propone que la concentración del complejo intermedio debe estar en equilibrio con los reactivos y que especialmente es su descomposición lo que determina la dirección de la reacción (XI:584; XIV:267):



este cambio está gobernado principalmente por la diferencia de energía libre de Gibbs estándar entre el complejo de transición (AgAc^*) y los reactivos, y se puede expresar mediante (XIII:267):

$$\Delta G = -RT \ln k_{eq}^* \quad (7)$$

donde ΔG = cambio en la energía libre de activación

k_{eq}^* = constante de equilibrio que produce el complejo de transición

Ya que los cambios en la energía libre se relacionan con los cambios de entropía y entalpía por la ecuación (XIII;268):

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ} \quad (8)$$

donde ΔG° = cambio de energía libre

ΔH° = cambio de entalpía

ΔS° = cambio de entropía

el grado de reacción final estará gobernado por las diferencias entre la entropía y entalpía estándar del complejo de transición y los reactivos, y se podrá conocer k_{eq}^* a través de la determinación de ΔG° .

Para predecir cualitativamente el efecto de la variación en presión o temperatura de un sistema en equilibrio, se hace uso del principio de Le Chatelier-Braun que establece "cuando se varían las condiciones de un sistema, inicialmente en equilibrio, éste se desplazará en sentido opuesto para restablecer las condiciones originales" (XIV:310).

Cuando una reacción es endotérmica al adicionar calor al sistema en equilibrio, se propicia el desplazamiento (k_a) de la reacción (1)* hacia la derecha con la formación de más productos y el consiguiente aumento en el valor de la constante de equilibrio. Por el contrario, si la reacción es exotérmica, la aplicación de calor causará que el equilibrio se dirija hacia la izquierda promoviendo la disociación del producto (k_d) (XI:236).

*Ver página 5

Si una reacción es exotérmica o endotérmica depende de los valores de la energía de activación entre los productos y los reactivos. Siendo los reactivos las moléculas de antígeno y anticuerpo, la conversión de estos en el complejo AgAc se acompaña de la formación de un complejo intermedio de transición $AgAc^*$ cuya energía potencial es mayor que la de los reactivos y equivale a la energía de activación que señala el carácter exotérmico o endotérmico de la reacción (Figura 1)* (XII:267). Cada clase de inmunoglobulina tiene una energía de activación específica para que puedan reaccionar (XIX:45).

La reacción entre antígeno y anticuerpo resulta en la liberación de energía (ΔG) que puede aparecer como calor (ΔH), o como un cambio en la entropía ($T\Delta S$), o ambos de acuerdo a la ecuación (8)** (35).

Se ha visto que los anticuerpos "fríos" son exotérmicos, mientras que por el contrario, los "calientes" están predominantemente relacionados a la entropía. Los pocos experimentos termodinámicos que se han hecho sobre los eritrocitos apoyan esta idea; por ejemplo, los anticuerpos fríos como el anti-I y anti-A son principalmente exotérmicos y muestran un ligero cambio de entropía (Tabla I). De hecho, reciben su nombre de anticuerpos fríos debido a que su poder aglutinante es mayor a temperaturas de 4-20°C, mientras que cuando se eleva la temperatura a 30-37°C la aglutinación es mínima, o bien no llega a producirse al dirigirse la reacción hacia la izquierda. Por otro lado, el anti-D que se puede clasificar como anticuerpo caliente, se ha observado no que produzca calor cuando se combina con las células ro

*Ver página 13

**Ver página 15

jas, sino que se acompaña de un incremento en la entropía (35).

<u>Anticuerpo</u>	<u>ΔH (kcal/mol)</u>	<u>ΔS (cal/grado/mol)</u>
anti-I	-36	-98
anti-A	-5.4 a -21.8	-2 a -33
anti-D	0 \pm 0.7	41 \pm 2

TABLA 1
(10, 32, 56)

Cuando se forma el complejo antígeno-anticuerpo, el sistema se hace menos casual, esto es, hay una disminución en la entropía. El decremento en la casualidad debe ser compensado por un aumento en el grado de desorden por un proceso concomitante (31).

Debido a que la reacción antígeno-anticuerpo ocurre en un medio acuoso, las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas entre las moléculas también son importantes. Las moléculas de agua no son eléctricamente neutras, sino que tienen un polo relativamente positivo (hidrógeno extremo) y uno relativamente negativo (oxígeno extremo). Estas moléculas son atraídas hacia aquellas regiones superficiales de la molécula proteica que contenga aminoácidos polares, necesitándose una cierta energía para desplazar estas moléculas de agua y permitir que el antígeno interactúe con el anticuerpo (V:53).

La energía libre de atracción es mucho más alta cuando no existe o casi no hay agua entre los sitios activos del anticuerpo y los determinantes antigénicos que cuando se encuentra una capa de moléculas de agua situadas entre ellos. Esta capa

no sólo disminuye la fuerza de atracción sino que también aumenta la distancia intermolecular. La expulsión de agua entre antígeno y anticuerpo ayuda a fortalecer su unión. Usualmente se interpreta que la liberación de las moléculas de agua unidas a antígenos y anticuerpos disminuyen su entropía causando un incremento en el desorden del sistema externo (32,56,73,74).

Otra explicación posible, pero menos probable al cambio de entropía, es la modificación en la estructura terciaria del anticuerpo durante la formación del complejo, conduciendo a un mayor grado de casualidad dentro de la molécula del anticuerpo (31).

Los factores que determinan si un anticuerpo en particular es exotérmico o no, es la naturaleza de las uniones en el sitio de combinación. Algunos tipos de enlaces, tales como el puente de hidrógeno son predominantemente exotérmicos, mientras que las uniones hidrofóbicas están principalmente asociadas a un cambio de entropía (10,38). La razón que determina que los anticuerpos sean fríos o calientes, es pues la naturaleza química del antígeno (33).

Aunque la vasta mayoría de los anticuerpos antieritrocito humanos reaccionan mejor a la temperatura corporal (37 °C), algunos requieren de temperaturas mucho más bajas. Ejemplos de éstos son las aglutininas frías fuera del sistema ABO que reaccionan mejor a 4 °C. Anticuerpos de este tipo producen agregados al ser incubados con eritrocitos a temperaturas de refrigeración, y al elevar la temperatura a 37 °C, se dispersan completamente (ejemplo, anti-P) (XIX:45).

1.1.3 Fuerza iónica

El comportamiento de cualquier ión, como las proteínas, en una solución está influenciado tanto por el número como por la carga de todos los iones presentes. Debye y Hückel derivaron una expresión que relaciona el coeficiente de actividad iónica media de un electrolito en solución muy diluida, con la naturaleza del disolvente, la temperatura y las valencias y concentración de los demás iones presentes en esta solución. Dicha expresión es la siguiente (X:58):

$$-\log \gamma = \frac{1.81 \times 10^6}{D T} Z_1 Z_2 \sqrt{\mu} \quad (9)$$

donde γ = coeficiente de actividad
 D = constante dieléctrica
 T = temperatura en °K
 Z_1 y Z_2 = cargas del ión y contraión
 μ = fuerza iónica

y la fuerza iónica se define por fórmula como:

$$\mu = 1/2 \sum c_i Z_i^2 \quad (10)$$

siendo c_i = concentración molar del ión tipo i
 Z = valencia de ese ión

La fuerza iónica constituye una medida no sólo de la concentración, sino - también del número de cargas eléctricas provenientes de los cationes y aniones aportados por una sal.

Además de que la ecuación de Debye-Hückel está hecha sólo para soluciones muy diluidas (μ menor a 0.01), los coeficientes de actividad varían de un ión a otro de la misma carga a una fuerza iónica en particular. Por ésto, se han sugerido otras ecuaciones para cubrir aquellos casos que no cumplan con la ecuación de Debye-Hückel; una de ellas es la desarrollada por Davies que proporciona en forma adecuada un valor de la actividad de los iones en solución a una determinada fuerza iónica (VIII:161):

$$-\log \gamma = 0.509 Z^2 \frac{\sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}} - 0.2 \sqrt{\mu} \quad (11)$$

Las proteínas como electrolitos multivalentes, tienen un comportamiento similar al predicho por la expresión de Davies, esto es, al aumentar la concentración de sales en el medio, decrece el coeficiente de actividad γ . Con los siguientes ejemplos se puede observar claramente lo anterior:

$$\text{Si } \mu = 0.03$$

$$-\log \gamma = 0.509 (1)^2 \frac{0.173205}{1.173205} - 0.034641$$

$$\log \gamma = -0.0405047$$

$$\gamma = 0.910952$$

$$\text{Si } \mu = 0.14$$

$$-\log \gamma = 0.509 (1)^2 \frac{0.3741657}{1.3741657} - 0.0748331$$

$$\log \gamma = -0.0637603$$

$$\gamma = 0.863455$$

Es decir, cuando la fuerza iónica es de 0.03, el coeficiente de actividad es mayor que cuando ésta es de 0.14

La concentración de sales existente en el medio de reacción influye sobre la reacción antígeno-anticuerpo cuando los grupos ionizados del antígeno y del anticuerpo ($-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$) son parcialmente neutralizados, evitando así su interacción; de ahí que a bajas fuerzas iónicas estos grupos queden expuestos dando como resultado un incremento en la atracción de grupos cargados diferentemente en los antígenos y anticuerpos, lo que se traduce en una mayor frecuencia de colisión (1,2,31,34,-35,65).

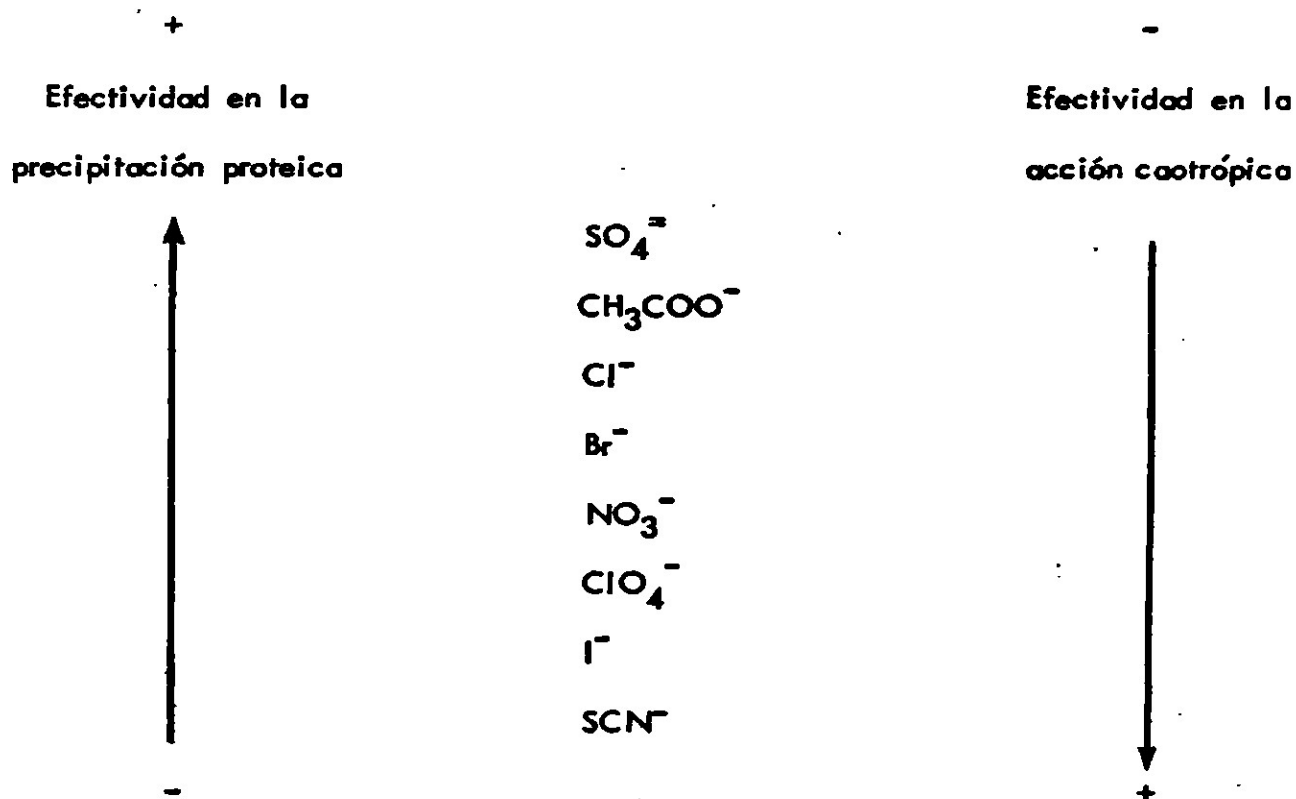
El incremento considerable en la constante de asociación (k_a) en la reacción antígeno-anticuerpo* implica un aumento similar en el valor de la constante de equilibrio, permitiendo que la reacción se efectúe en menor tiempo (35).

La importancia de la fuerza iónica en la reacción antígeno-anticuerpo es tal, que cuando la concentración de sales en el medio es muy alta, las proteínas precipitan al ser removida el agua de hidratación permitiendo que la interacción proteína-proteína sea mayor; debe hacerse notar que tal precipitación no es específica,

*Ver página 5

y no favorece la reacción antígeno-anticuerpo.

Existen algunos iones, llamados cootrópicos como por ejemplo SCN^- , I^- , Cl^- , etc., que tienen una marcada capacidad para modificar fuerzas débiles no covalentes como el puente de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas y iónicas que son responsables no sólo de la estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas, sino también de la formación del complejo antígeno-anticuerpo (72).



Series de Hofmeister (tabla 2)

El orden de los iones en su efecto cootrópico es inverso a su efectividad en la precipitación salina de las proteínas de acuerdo a las series de Hofmeister (tabla

2). Los aniones divalentes precipitan a las proteínas cargadas positivamente en forma más eficiente que los aniones monovalentes. Aunque la valencia del ión es de importancia en la precipitación, existen algunos iones monovalentes que son más efectivos que otros (III:363).

El complejo antígeno-anticuerpo es separado en proporción a las propiedades caotrópicas y concentración molar de los iones caotrópicos (11). Su efecto lo ejercen sobre la fase primaria de la reacción alterando la constante de equilibrio al modificar las fuerzas de unión entre las moléculas reaccionantes (72).

Efectos iónicos simples, como los producidos por el NaCl no son suficientes para romper completamente las uniones antígeno-anticuerpo, debido a la capacidad caotrópica relativamente limitada de los iones Cl^- (tabla 2)*.

1.2 Reacción de Hemaglutinación ó segunda fase

En el estudio inmunohematológico de los grupos sanguíneos eritrocitarios, la reacción entre el antígeno de la superficie celular, y su anticuerpo correspondiente se detecta la mayoría de las veces, por la aglutinación específica de las células involucradas, y con menor frecuencia por su lisis (XII:216). El agregado observado - puede considerarse como una malla, en la cual los eritrocitos se encuentran unidos entre sí, como resultado de la creación de puentes intercelulares debidos a las moléculas de anticuerpos (58).

*Ver página 22

•

1.2.1 Antígenos eritrocitarios; número, localización, características generales y efectos de carga.

Como puede observarse en la ecuación (4)*, la cantidad de antígeno (es decir, el número de eritrocitos), el número de sitios antigénicos por eritrocito, la concentración del anticuerpo y la capacidad de combinación del anticuerpo afectará la captación del mismo por los eritrocitos, lo que a su vez influirá en el grado de aglutinación (IV:36). Para que la formación de la malla se produzca, es necesaria la presencia de miles de sitios antigénicos sobre el eritrocito. Algunos estudios han determinado el número de sitios antigénicos que se encuentran en los eritrocitos (tabla 3)** (IV:111).

La superficie eritrocitaria está compuesta de colinas y valles ultramicroscópicos, los determinantes antigénicos pueden encontrarse en unas u otros (XIX:48). Estos determinantes están clasificados bajo aspectos genéticos, químicos y/o biológicos (V:398).

a) Aspecto Genético.-

Para algunos especialistas, los grupos sanguíneos humanos constituyen un material muy importante para el estudio de los problemas de la herencia aplicables en Antropología, Medicina Legal y Forense, etc. Esto radica en que las leyes de su transmisión hereditaria pueden demostrarse con rapidez y objetividad; siendo posible repetir las determinaciones obteniendo siempre re

*Ver página 6

**Ver página 25

<u>Sistema</u>	<u>Antígeno</u>	<u>Tipo de Eritrocito</u>	<u>Número aproximado de sitios antigénicos</u>
ABO	A	A ₁	800,000 - 1,000,000
		A ₂	250,000 - 290,000
		A ₁ B	460,000 - 850,000
		A ₂ B	120,000
		A ₁ (cordón)	250,000 - 370,000
		A ₂ (cordón)	140,000
		B	B
A ₁ B	430,000		
Rhesus	D	CcDEe	33,300 - 38,500
		--D--	110,000 - 202,000
	c	cc	70,000 - 85,000
		Cc	37,000 - 53,000
	e	ee	18,200 - 24,400
		Ee	13,400 - 14,500
	E	EE	4,890 - 5,560 (1)*
			22,400 - 25,600 (2)*
		Ee	450 - 2,890 (1)*
			5,800 - 11,800 (2)*
Kell	K	KK	5,090 - 6,975
		kk	2,750 - 3,900

Tabla 3 *Los datos marcados con (1) y (2), pertenecen a resultados obtenidos con diferentes anticuerpos anti-E

sultados estables y reproducibles (XV:7).

Desde el punto de vista antropológico, los grupos sanguíneos pueden estar altamente relacionados a ciertos núcleos raciales. Por ejemplo, el factor Diego se presenta muy difundido entre determinadas tribus indias de Sudamérica que se encuentran particularmente aisladas del resto del mundo y donde se tiene que más de la mitad de la población es Di^a positiva.

Con esto queda confirmada una vieja hipótesis que sostiene que los indios de América son descendientes directos de los pueblos mongólicos asiáticos. El antígeno Di^a está ausente en los caucásicos y negros, confinándose prácticamente a las personas de origen mongólico.

Otro factor sanguíneo, que no tiene relación con el Diego, es el factor Sutter (Js^a), que no se encuentra ni entre los indios americanos, ni en los esquimales, así como tampoco en los asiáticos, sino preferentemente en la raza blanca. El antígeno Js^a se hereda como un carácter mendeliano dominante, es independiente de los sistemas grupales hasta ahora descritos (XV: 89-90).

Por otra parte, todas las personas reciben un juego de cromosomas de cada progenitor; cada juego está compuesto de 22 autosomas y 1 cromosoma sexual con lo que se tiene un total de 46 cromosomas.

Los genes que controlan las estructuras de los antígenos de cualquier sistema de grupo sanguíneo, se asume que se encuentran en loci correspondientes de un par de cromosomas homólogos. Por lo tanto, para todos los genes llevados en los autosomas, un individuo puede ser homo- o heterocigoto.

El descubrimiento del grupo sanguíneo Xg ha resultado revolucionario, los únicos genes de grupo sanguíneo que no se transmiten en autosomas son - aquellos que pertenecen a este grupo, y se transmiten en el brazo corto del cromosoma X. Las mujeres pueden ser homo- o heterocigotas a Xg^a (Xg^aXg^a ó Xg^aXg), pero los hombres sólo pueden ser Xg^a ó Xg, y se dice que son - hemícigotos (XII:174).

Hasta ahora se ha observado que en el cromosoma X no sólo se encuentra el gen que da la información para el antígeno Xg^a, sino también aquellos de los cuales depende el daltonismo, la hemofilia, la enfermedad de - Christmas o deficiencia del factor IX de la coagulación (componente tromboplástínico del plasma), la distrofia muscular de Duchenne, el déficit de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y la disposición familiar para la hipogammaglobulinemia. En vista de que se conoce con relativa certeza la distancia que existe entre los genes que determinan las características descritas anteriormente, el grupo Xg^a ofrece una muy buena oportunidad para el estudio de la - herencia de estas enfermedades y algunas anormalidades cromosómicas (XV: 92-94).

No sería un atrevimiento pronosticar que un día será encontrado un - factor sanguíneo cuyo gen pertenezca al cromosoma Y.

b) Aspecto Químico.-

El eritrocito humano es una estructura sumamente complicada, de la - cual los antígenos de grupos sanguíneos sólo constituyen una pequeña parte.

No es de sorprenderse que aquellos intentos hechos para determinar la estructura química de los antígenos aislados de los eritrocitos, no den una información de mucho valor (II:45).

Hasta donde se sabe los antígenos eritrocitarios pueden ser glucolípidos o proteínas. Comparando el gran número de grupos y sistemas que se conocen, son pocos los antígenos de los cuales se sabe su estructura. Por ejemplo, la especificidad de los sistemas ABH, Lewis, li y P está determinada por estructuras de oligosacáridos unidos a la ceramida (N-acil-esfingosina). De estos, la primera que se conoció fue la del sistema ABH y Lewis en 1966-1969, a diferencia de los antígenos P que fueron identificados recientemente en 1974-1976 (XII:290-291).

Los datos experimentales sugieren que los antígenos M y N son totalmente glucoproteínas, ambas están determinadas por la diferencia en la composición de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas a las cuales se unen residuos de carbohidrato.

Otros antígenos estudiados son aquellos que pertenecen al sistema Rh-Hr; existe una gran evidencia para considerarlos de carácter proteico ya que son inactivados por agentes alquilantes, urea o digestión proteolítica (XII:172).

El conocimiento de la estructura química de los diversos antígenos eritrocitarios, puede llegar a ser de importancia en el establecimiento de nuevas técnicas que aprovechen este dato para proporcionar mejores condiciones de reacción en la búsqueda de anticuerpos antieritrocito.

c) Aspecto Biológico.-

Se ha observado que existe una relación, a veces no bien definida y explicada entre los grupos sanguíneos y diversas enfermedades, así como con la forma o función del eritrocito (III:185;27).

En el primer caso, estas relaciones pueden situarse en varias categorías:

- 1.- Alteración de la expresión de los antígenos eritrocitarios como resultado de una enfermedad (cambios en los antígenos ABH en pacientes con leucemia) (IV:186).
- 2.- Influencia de los grupos sanguíneos sobre la resistencia (infestación por *P. vivax* en la población $Fy(a-b-)$, o susceptibilidad a ciertos padecimientos (úlceras duodenales en personas de grupo O, o cáncer de estómago en pacientes de grupo A) (IV:191, XII:178)

En el segundo caso, los eritrocitos se caracterizan por la disminución o ausencia de los antígenos en su superficie. Por ejemplo, las células Rh_{null} presentan estomatocitosis y una supervivencia menor "in vivo"; los eritrocitos con el fenotipo McLeod (supresión de los antígenos del sistema Kell), son acantocíticos, y aquellas que presentan en fenotipo $Jk(a-b-)$ resisten a la lisis con urea (27).

Independientemente del aspecto bajo el cual se les quiera considerar, el número de sitios antigénicos puede ser un factor importante para la hemaglutinación por anticuerpos IgG o IgM. Al estar muy separados los antígenos sobre el eritrocito es más difícil que se formen los puentes intercelulares y se produzca la hemaglu-

tinación (30,77).

Bajo condiciones normales, los eritrocitos en suspensión salina tienen una carga neta negativa a consecuencia del exceso de grupos carboxilo provenientes de residuos de los ácidos siálicos* que están sobre la membrana celular (6,7,13). De acuerdo al hecho de que partículas de carga igual se repelen entre sí, los eritrocitos en suspensión salina se encuentran alejados unos de otros una cierta distancia - en base a la carga que presentan; y conforme a la ley de Coulomb, esta distancia se puede determinar con la siguiente expresión (58):

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{Dd^2} \quad (12)$$

donde F = fuerza de repulsión
 Q_1 y Q_2 = carga de las partículas
 D = constante dieléctrica
 d = distancia entre las partículas

es decir, que la distancia depende de la carga de las partículas, fuerza de repulsión y la constante dieléctrica del medio:

$$d^2 = \frac{Q_1 Q_2}{D F} \quad (13)$$

Se ha calculado que la distancia intereritrocitaria en medio fisiológico es de 25 nm y de 50-100 nm en una solución electrolítica (7).

*95% ácido N-acetil neuramínico (NANA) y 5% ácido N-glucosil neuramínico

Cuando los eritrocitos se suspenden en soluciones electrolíticas, los iones en solución se orientan sobre la superficie celular, de tal forma que los cationes le recubran primero para neutralizar la carga negativa y después los aniones para compensar a su vez a los cationes. Esta orientación iónica se repite formando una nube - cada vez más difusa en cuanto más alejada se encuentre del eritrocito (figura 2 y 3) (57,58).

En la figura 3*, las cargas mostradas inmediatamente adyacentes a la superficie probablemente se encuentran sobre ésta, con algunas de las cargas compensatorias sostenidas en una capa estacionaria líquida junto a la superficie (capa fija). Las demás cargas están distribuidas a través de la solución electrolítica como una atmósfera difusa y móvil análoga a la postulada por Debye-Hückel (57,58; XI:848).

La caída de potencial entre el sólido y el líquido puede verificarse en dos formas que dependen de las características de los iones o moléculas presentes en la disolución que forman la porción exterior de la capa (figura 4)**.

Si el potencial del sólido se indica por A y el de la masa del líquido por B, en cada caso AC es la caída definida de potencial en la parte fija, es decir - entre la superficie del sólido y la capa compensatoria. Por otra parte CB es la variación gradual del potencial y se da entre la capa compensatoria y el resto de la solución; esta segunda caída de potencial es lo que se conoce como potencial electrocinético (término ya olvidado) o potencial zeta (ξ) (VI:1099-1100).

El potencial zeta depende de la carga neta de la superficie de la membrana

* Ver página 32

**Ver página 33

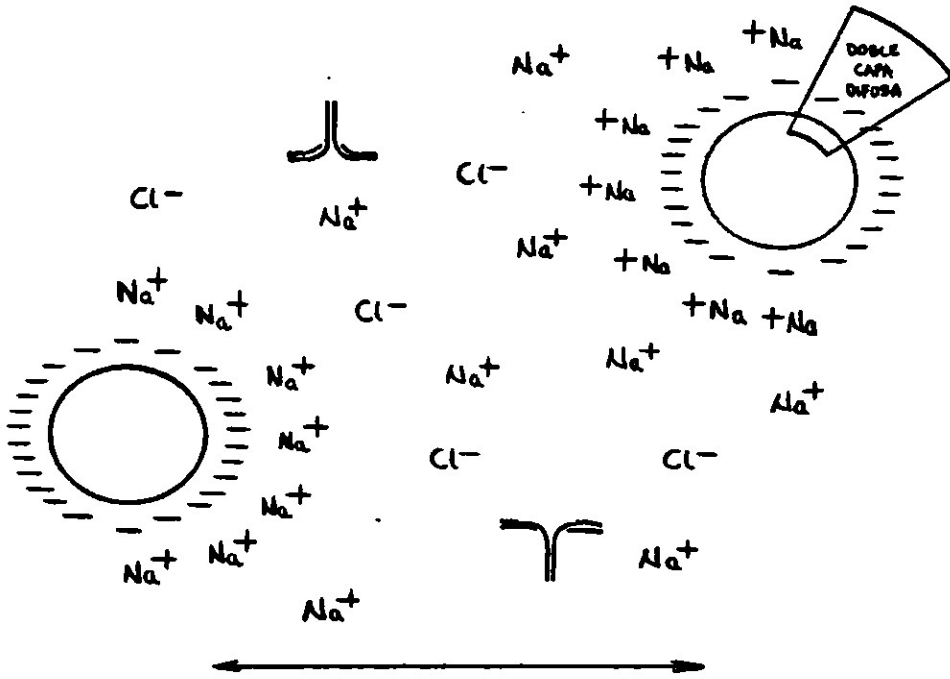


FIG.2 NUBE IONICA

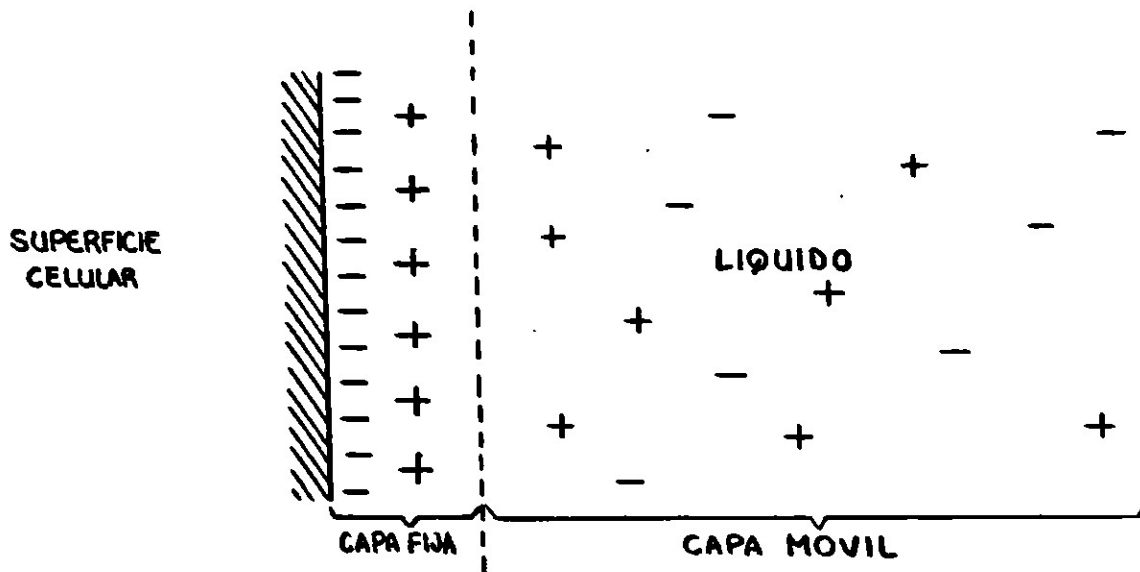
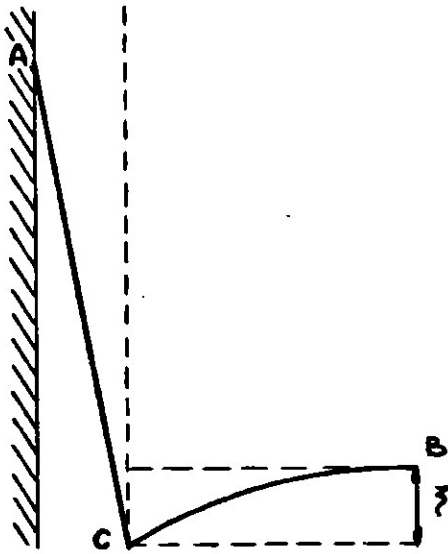


FIG.3 DOBLE CAPA DIFUSA



A = POTENCIAL DEL SOLIDO

B = POTENCIAL DEL LIQUIDO

AC = PRIMERA CAIDA DE POTENCIAL
ENTRE LA SUPERFICIE DEL
SOLIDO Y LA CAPA ESTACIONARIA

CB = SEGUNDA CAIDA DE POTENCIAL
ENTRE LA CAPA COMPENSATORIA
ESTACIONARIA Y EL RESTO DE LA SOLUCION = POTENCIAL ZETA (ζ)

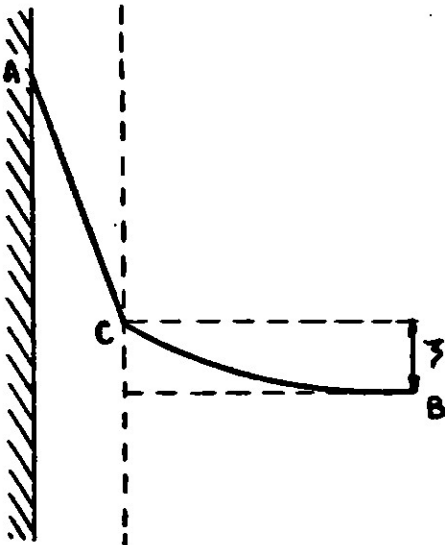


FIG. 4 CAIDA DE POTENCIAL

celular, de la constante dieléctrica y la fuerza iónica del medio de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\zeta = \frac{4 \pi Q d}{D} \quad (14)$$

donde Q = carga por unidad de área
 d = distancia a la capa difusa
 D = constante dieléctrica del medio

y constituye el índice de la repulsión electrostática intercelular.

En la ecuación de Coulomb (12)* se observa claramente que al aumentar el valor de la constante dieléctrica, la fuerza de repulsión entre las cargas se reduce y por consiguiente la distancia que les separa. Igualmente esta fuerza de repulsión disminuye cuando la carga eléctrica celular está sólo en parte neutralizada por cationes. De acuerdo a la concentración salina del medio, será entonces el espesor de la nube iónica que rodea al eritrocito y por consiguiente el potencial zeta se verá alterado.

El potencial zeta crítico para la aglutinación por anticuerpos IgM es de - -23 mV y para los IgG de -12 mV; es decir que no habrá aglutinación con estos anticuerpos cuando el potencial zeta sea de -24 y -13 mV respectivamente. El valor óptimo se encuentra en -18 mV para los IgM y -6.5 mV para los IgG (50).

*Ver página 30

1.2.2 Anticuerpos antieritrocito; características generales

Además de la localización y número de los sitios antigénicos, es importante que las distancias efectivas intercelulares sean tales durante la segunda fase de la hemaglutinación, que permitan la formación de puentes por los anticuerpos o de lo contrario, aunque el eritrocito se encuentre sensibilizado, la formación de la malla no será posible (58). La distancia que se requiere para una aglutinación óptima depende del sistema antígeno-anticuerpo involucrada, ya que éste varía de acuerdo a la localización particular del sitio antigénico y a la clase de inmunoglobulina que interviene (77).

Es importante recordar las características de las dos principales clases de inmunoglobulinas que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo inmunohematológica: IgG e IgM.

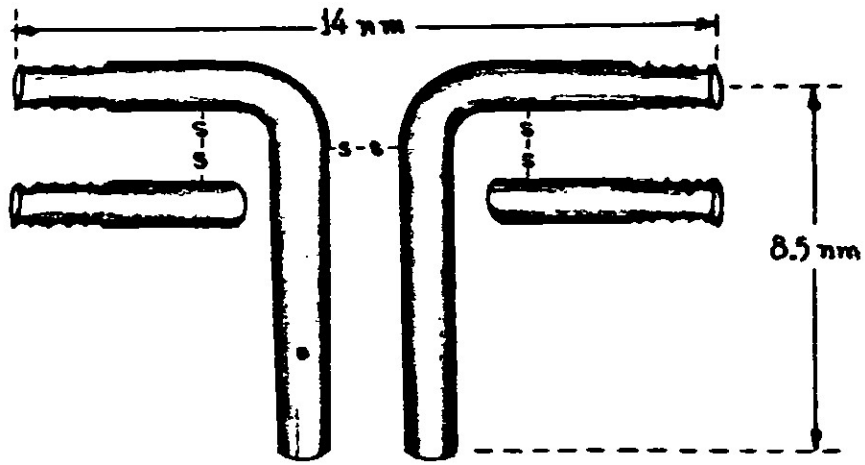
Las moléculas más grandes, IgM, tienen un peso molecular de 900,000; - presentan 5 sitios posibles de combinación y son de un tamaño aproximado a 35 nm. Las más pequeñas, IgG, tienen un peso molecular de 160,000; con dos sitios de combinación y un tamaño de 14 nm. Las moléculas de IgM son un pentámero cíclico - de 5 subunidades, cada una semejante a la molécula de IgG (figura 5)*.

Las moléculas de inmunoglobulinas son flexibles, pueden en cierta medida modificar su estructura para permitir su unión con el antígeno correspondiente; por es to sus dimensiones pueden variar (figura 6)**(XIX:35,36).

Ya que las moléculas de IgG cuando se encuentran con el fragmento Fab a su máxima extensión son más cortas que las IgM, necesitan que la distancia intereri

*Ver página 36

**Ver página 37



I_gG EN ESTADO NATIVO O CONFIGURACION T

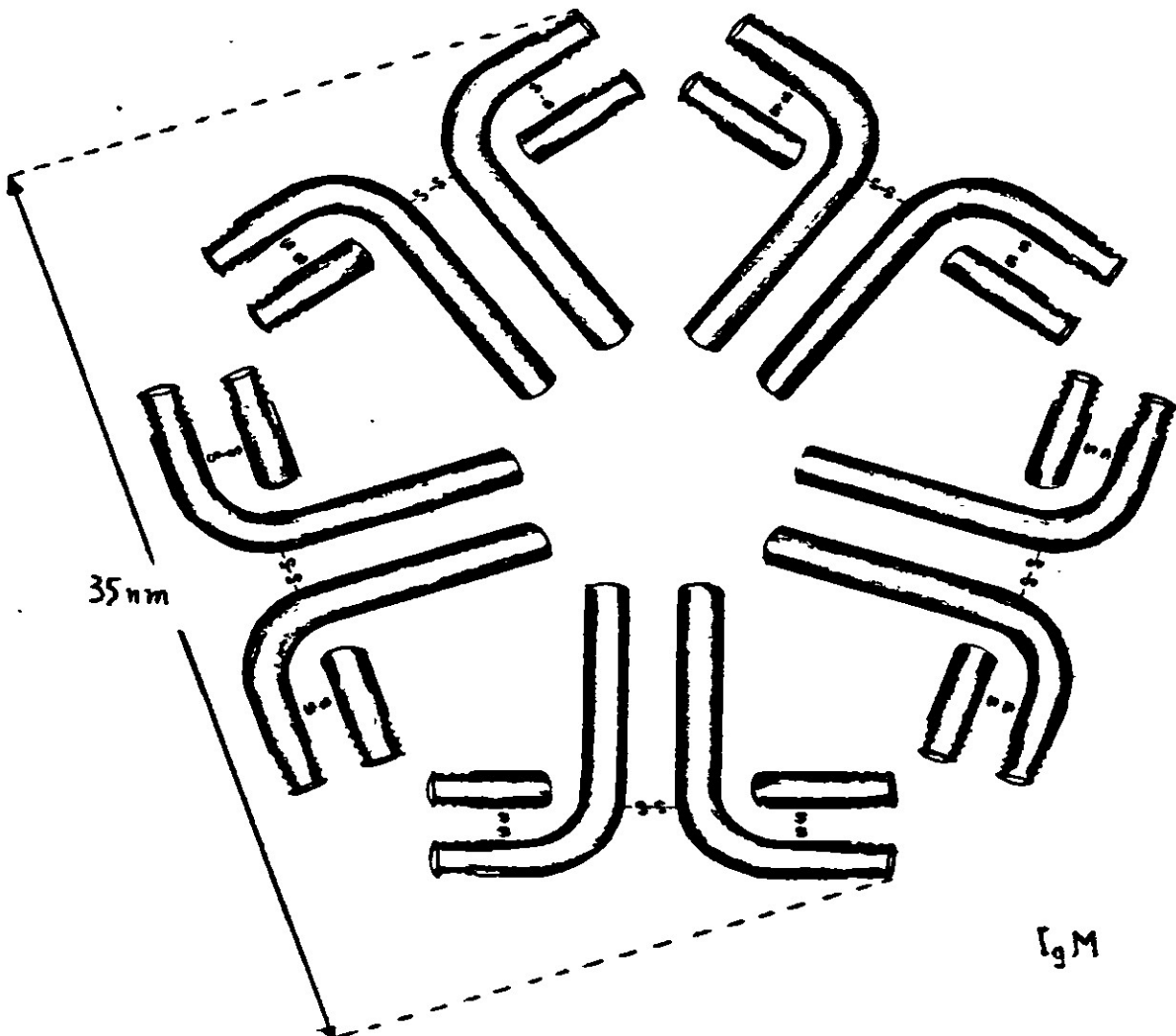
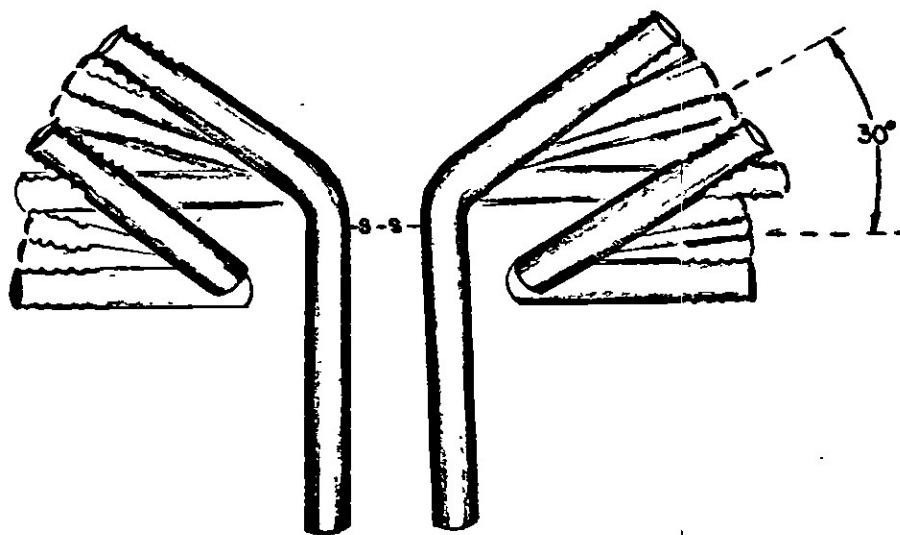
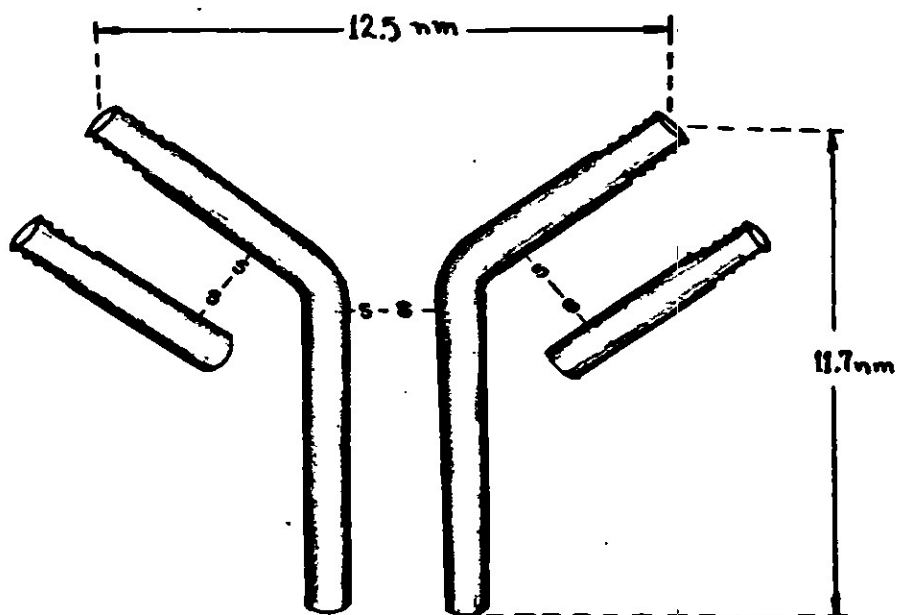


FIG.5 INMUNOGLOBULINAS I_gG e I_gM



LOS BRAZOS QUE FORMAN EL EXTREMO F_2 PUEDEN GIRAR CON UN ANGULO DE 30°

FIG. 6

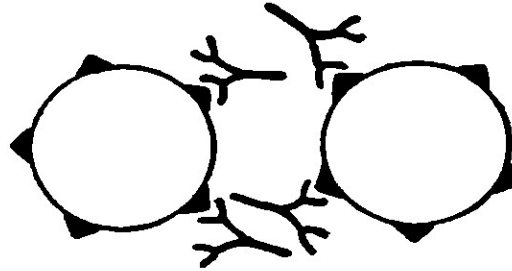


I_g COMBINADA CON EL ANTIGENO EN CONFIGURACION Y

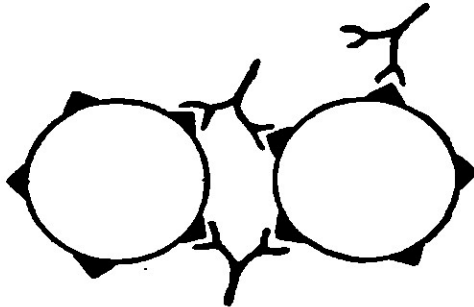
trocitaria sea menor para que puedan unirse a los sitios antigénicos. Los anticuerpos IgG pueden unir a los eritrocitos cuando la distancia no sea mayor de 14 nm, mientras que para los IgM es de 35 nm.(figura 7)* (59).

Se ha visto que el número necesario de moléculas de anticuerpo para hacer posible la hemaglutinación es muy diferente; por ejemplo, cuando el anticuerpo es IgM, se necesitan de 25 a 50 moléculas de anti-A, 120 de anti-D, de 65 a 440 de anti-I, etc. Por el contrario, el número de moléculas de IgG necesarias para la hemaglutinación es mucho más alto; cerca de 7,000 de anti-A e incluso se habla de 20,000 y 500 de anti-D (37,71).

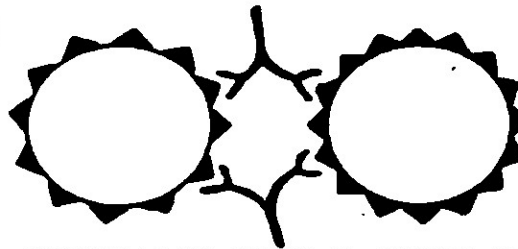
*Ver página 39



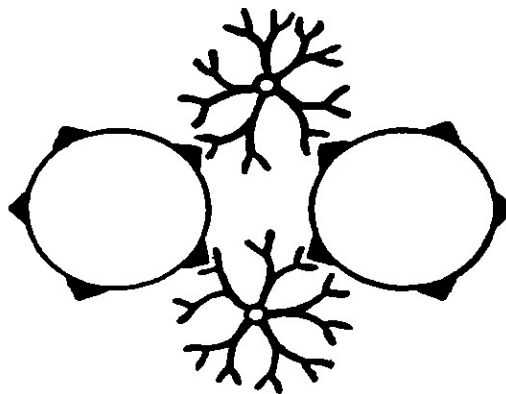
NO HAY AGLUTINACION



AGLUTINACION DEBIDA A LA CERCANIA CELULAR



AGLUTINACION DEBIDA AL NUMERO DE SITIOS ANTIGENICOS



AGLUTINACION

FIG. 7 AGLUTINACION POR ANTICUERPOS IgG e IgM

II

Agentes físicos, químicos y físico-químicos que ayudan a la segunda fase de la reacción Antígeno-Anticuerpo

Para que la hemaglutinación por anticuerpos IgG sea posible, la distancia entre las células debe ser mínima. Los eritrocitos pueden acercarse más entre sí modificando el medio que les rodea, o alterando su morfología exterior.

El cambio del medio puede lograrse mediante el uso de: 2.1 Bajas fuerzas iónicas, y 2.2 Polímeros y Polielectrolitos.

La alteración exterior del eritrocito se efectúa con el uso de: 2.3 Enzimas.

Además se cuenta con otros factores que promueven la hemaglutinación y que son: 2.4 Antiglobulina humana o Suero de Coombs, y 2.5 Centrifugación.

2.1 Baja fuerza iónica

Anteriormente* ya se ha explicado el efecto que tiene la baja fuerza iónica sobre la reacción antígeno-anticuerpo al aumentar el coeficiente de actividad iónica; por lo tanto, no se repetirá aquí.

2.2 Polímeros y Polielectrolitos

Los polímeros son moléculas gigantes que consisten en la repetición de pequeñas unidades o monómeros enlazadas covalentemente entre sí. Dependiendo del disolvente en que se encuentren adoptan diversas configuraciones, de tal forma que el

*Ver página 19 y siguientes.

mejor disolvente será aquel que permita la mayor interacción polímero-disolvente lo que da como consecuencia que la molécula del polímero se extienda; por el contrario, cuando el disolvente no es el adecuado, el polímero se encontrará enrollado en forma compacta (1:679-683).

Si un monómero contiene un grupo ionizable que no reacciona durante el proceso de polimerización, entonces el polímero resultante contendrá grupos dependientes ionizables incorporados a la cadena. Mientras que la mayor parte de los polímeros no contienen grupos ionizables y, por consiguiente no son electrolitos, hay ciertos polímeros naturales y sintéticos que contienen grupos iónicos y se llaman polielectrolitos (1:685). Ejemplos de polímeros no iónicos son dextrano, metil-celulosa; y de polielectrolitos, proteínas en general, polibreno, etc.

En ocasiones se trata a los polímeros y a los polielectrolitos en forma separada, pero de acuerdo a la explicación anterior, es conveniente considerarlos juntos.

Los polímeros en solución pueden modificar en diversas formas la hemaglutinación a través de efectos electrocinéticos, estéricos y osmóticos:

a) Efecto electrocinético

Se ha dicho que algunos polímeros solubles en agua, ya sea sintéticos o naturales (albúmina, PVP, dextrano, Ficoll, etc.) aumentan la constante dieléctrica del agua en una cierta cantidad que es dependiente del grado en que sean polarizadas y orientadas dichas moléculas en un campo eléctrico (58). La constante dieléctrica es simplemente una medida de la capacidad del medio para reducir la carga de los cuerpos (1:49).

Las sustancias que elevan la constante dieléctrica tienen áreas en su molécula que pueden ser atraídas o repelidas por las cargas eritrocitarias de superficie (4,58,59). Los dipolos del polímero tienden a neutralizar parte de la carga en la cercanía de los cuerpos cargados, lo cual da como resultado una fuerza de repulsión efectiva menor entre éstos (4; 1:49).

A diferencia de los iones simples, los polímeros pueden ser forzados a rotar y orientarse de tal forma en que su distribución en el medio sea menos casual. La energía requerida para esta polarización y orientación la obtienen del campo eléctrico que rodea a los eritrocitos, de ahí que el potencial zeta se vea reducido durante la segunda fase de la hemaglutinación (58).

Por otra parte se ha encontrado que la adición de polímeros tales como el dextrano, polietilenglicol, metil-celulosa, etc. al medio de reacción, incrementa el potencial zeta de las células lo cual contradice la primera explicación (19,74). Además se sugiere que la agregación inducida por el dextrano es producto de la formación de puentes intercelulares del polímero; y cuanto mayor sea el peso molecular del dextrano, se tendrán mejores resultados (19,74).

Debe hacerse notar que estas conclusiones se refieren sólo a polímeros neutros; la molécula de albúmina, con una carga altamente negativa, puede no comportarse necesariamente de la misma forma. No hay duda de que la constante dieléctrica del medio acuoso se eleva con la adición de albúmina. Las aglutinaciones falsas que se pueden encontrar al usarla, pueden deberse a la gran cantidad de polímeros que a veces se presentan y que provocan la

formación de puentes intercelulares a semejanza del dextrano (19,61).

b) Efecto estérico

Las moléculas con gran peso molecular y que presentan carga positiva, pueden inducir la formación de complejos como resultado de su diferencia de cargas. Estos complejos se forman fácilmente con Polibreno (polímero cuaternario de amonio), Protamina y poli-l-lisina, a bajas fuerzas iónicas, y se dispersan con la adición de sales neutras (7,21,36,39,41,43,64,67,74).

Se tiene un mecanismo hipotético en tres pasos para explicar la inducción de la hemaglutinación por policationes. Como primer paso ocurre la sensibilización del eritrocito a baja fuerza iónica, el segundo paso asume la rápida distribución de cationes sobre la superficie eritrocitaria y la formación de complejos iónicos mediante aniones de ácidos siálicos. Esto bajaría drásticamente la carga neta superficial del eritrocito permitiendo el acercamiento entre las células. En el último paso, más lento, las colisiones entre los eritrocitos producen uniones cruzadas de policationes y ácidos siálicos de células cercanas; igualmente los anticuerpos 7S reaccionan de forma estable con los antígenos correspondientes a otros eritrocitos, provocando entre ambos la hemaglutinación (7,40,41,43).

Cuando se adicionan sales que elevan la fuerza iónica del medio, la carga neta negativa celular se hace efectiva y se restauran las fuerzas de repulsión dando como resultado la resuspensión de los eritrocitos si es que no había anticuerpos presentes. Los complejos antígeno-anticuerpo formados no

son afectados por este cambio en la fuerza iónica a menos de que la concentración salina sea muy alta (41,43).

c) Efecto osmótico

Cuando un soluto se introduce en un solvente se observa que ocurre una difusión espontánea de las moléculas del soluto a todas las partes del sistema para hacer su concentración uniforme. Si este soluto se encuentra separado del solvente puro por una membrana semipermeable que le impida pasar; igualmente se buscará unificar la concentración y se logrará con el paso del solvente puro hacia el lado contrario para diluir la concentración del soluto. A este fenómeno se le conoce como ósmosis. Por otra parte, no sólo se busca que exista la misma concentración de soluto en ambos lados de la membrana, sino que también se mantenga la neutralidad eléctrica por lo cual hay un movimiento de iones.

Los polímeros en solución provocan que el eritrocito que posee una membrana semipermeable pierda iones y agua adoptando la forma de un estomatocito, con lo cual se permite mayor contacto intercelular (21,74). Las moléculas del polímero se hidratan con el agua liberada por el eritrocito y evitan de esta forma que puedan constituir un impedimento estérico para la reacción antígeno-anticuerpo (21,36).

2.2.1 Albúmina

Después de haber explicado el efecto de los polímeros para promover la hema

glutinación, es necesario dedicar un espacio aparte a la albúmina.

Puede decirse que es en 1944 cuando empieza el uso de la albúmina como reactivo en un banco de sangre cuando se observa que existen anticuerpos antieritrocito en el 40-50% de los pacientes, y que no eran puestos en evidencia con la técnica entonces empleada usando 1 hora de incubación a 37°C en medio salino. Estos anticuerpos al producir la enfermedad hemolítica del recién nacido y reacciones postransfusionales, indicaban que la sensibilización del eritrocito se llevaba a cabo. Ya que estos anticuerpos eran incapaces de producir la hemaglutinación "in vitro", Wiener y Race les denominaron en 1944, "anticuerpos incompletos".

Estos anticuerpos podían ser detectados si se usaba sangre total de preferencia, o si los eritrocitos contra los que se probaba el suero problema no eran lavados repetidas veces cuando se seguía la técnica de bloqueo (suero problema + anticuerpo capaz de aglutinar en medio salino + eritrocitos con el antígeno correspondiente; - si se observaba una disminución en la aglutinación, es que el suero problema contenía el anticuerpo). Wiener atribuyó este fenómeno al efecto coloidal de lo que él llamó, las conglutininas del plasma.

Debido a que el uso rutinario de plasma como medio de detección para anticuerpos incompletos requería de condiciones difíciles de llenar (plasma AB, Rh negativo), se buscó otras sustancias que lo suplieran. Diamond eligió albúmina humana, albúmina bovina, gelatina, metil-celulosa y dextrosa, y encontró que tanto la albúmina humana como la bovina eran capaces de detectar anticuerpos incompletos. - Las otras sustancias o no los encontraban, o daban resultados falsos positivos (8).

Aunque Diamond encontró que los resultados con ambas albúminas eran simi -

lares, el empleo inmunohematológico se limitó a la segunda por su costo y facilidad para conseguirla. Durante estos años se ha confirmado la experiencia de Diamond y se ha hecho de la albúmina un medio importante para la detección de anticuerpos de tipo IgG. Sin embargo, actualmente cabe pensar en el uso de la albúmina humana en base a los experimentos de Diamond y a que las posibilidades de su obtención son mejores en la actualidad.

Considerando que la albúmina es una proteína cuyo pI es 4.7, al encontrarse a un pH de 6.8 adquirirá una carga negativa que le permite funcionar como polielectrolito elevando la constante dieléctrica del medio. Por otra parte, para mantener la neutralidad eléctrica, la solución deberá tener una concentración equivalente de iones de carga opuesta. Estos iones serán entonces Na^+ que al ser retenidos producen que la solución se comporte como si fuera la solución de la sal de la proteína (proteinato de sodio) (XIII:169).

Una situación interesante se presenta cuando esta solución de proteinato sódico está separada de una solución de cloruro de sodio por una membrana dialítica dando lugar a lo que se conoce como equilibrio de membrana o equilibrio de Donnan (XIII:170). Considerando que la membrana eritrocitaria es permeable a iones pequeños tales como Na^+ y Cl^- , pero completamente impermeable a los grandes iones proteicos, Pr^- , se origina un movimiento de iones de acuerdo a la figura 8* :

La presencia del ión coloidal en uno de los lados de la membrana dialítica, modifica la distribución de iones difundibles de una manera característica. Si se tiene en la situación inicial en el proteinato sódico a la concentración c_1 y al

*Ver página 47

otro lado de la membrana NaCl a la concentración b, como en el primer compartimento no se encuentra presente el ión Cl^- , es evidente que difundirá Cl^- de II a I. Por otra parte, como la neutralidad eléctrica exige que haya un mismo número de cargas positivas y negativas en cada lado, por cada Cl^- que pasa del compartimento II al I, pasará un ión Na^+ en la misma dirección para neutralizarlo.

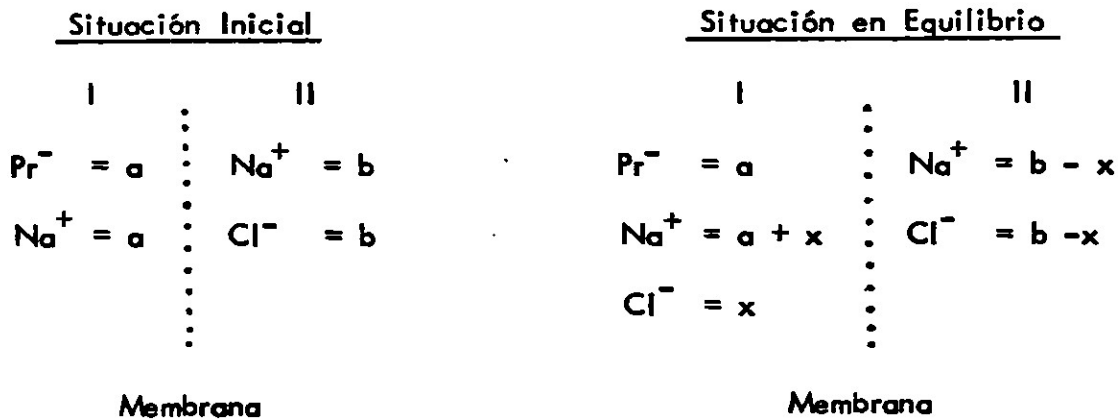


Figura 8

Por lo tanto, al alcanzarse el equilibrio, habrán difundido de II a I x pares iónicos de NaCl y se tendrá en I las siguientes concentraciones:

$$\text{Pr}^- = a, \text{ que no ha variado}$$

$$\text{Na}^+ = a + x$$

$$\text{Cl}^- = x$$

y en II:

$$\text{Na}^+ = b - x$$

$$\text{Cl}^- = b - x$$

En esta situación se cumplen evidentemente las leyes fundamentales del equilibrio de membrana:

- 1° (Equilibrio eléctrico) La suma de cationes es igual a la suma de aniones en cada uno de los compartimentos.
- 2° El producto de los dos iones (anión y catión) de cualquier sal difundible es igual en los dos compartimentos.
- 3° La suma de cationes difundible es mayor en el compartimento que contiene al anión coloidal no difundible.
- 4° La suma total de iones es mayor en el compartimento del coloide iónico.

Aquí se observa que cuando la concentración de proteína sea mayor, mayor será también la diferencia en equilibrio de los iones Cl^- y Na^+ de ambos compartimentos.

El número de partículas osmóticamente activas es mayor en el medio proteico, por lo cual se ejerce un efecto osmótico correspondiente a este exceso de partículas, y pasa agua hacia este lado de la membrana produciendo la deformación del eritrocito y con esto una mayor superficie de reacción (VII:219-223).

Se ha propuesto también que las moléculas de albúmina pueden agregar a las células como resultado de su adsorción entre células vecinas. Los agregados débiles de eritrocitos no sensibilizados se romperán por efecto del movimiento Browniano, mientras que las células sensibilizadas se mantendrán juntas permitiendo que los anticuerpos reaccionen con ellas dando como resultado la hemaglutinación (15,77).

Aún cuando se ha buscado la explicación a la acción de la albúmina sobre la hemaglutinación, no existe todavía un criterio uniforme y posiblemente todas las razones expuestas con anterioridad constituyan en parte esta explicación.

2.3 Enzimas

Las enzimas proteolíticas, tales como la neuraminidasa, ficina, bromelina, - papaína, etc., actúan sobre la superficie celular al separar las glucoproteínas, especialmente la glucoforina, que contienen a los ácidos siálicos, con lo que se reduce la carga electrostática superficial negativa (13,50); además liberan a otras cadenas que constituyen un impedimento estérico para la reacción antígeno-anticuerpo (6,50,70). Al reducir la carga neta negativa del eritrocito se propicia la hemaglutinación a través de la reducción del potencial zeta (50).

Aunque todos los ácidos siálicos se encuentran sobre la superficie externa del eritrocito humano, algunas moléculas están más expuestas que otras y contribuyen - en mayor grado al valor del potencial zeta que las internas (6,13). Los residuos - de ácido siálico son responsables de aproximadamente 80% de la carga eléctrica del eritrocito, carga que puede ser reducida hasta en un 95-100% por el tratamiento - enzimático (70).

2.4 Antiglobulina humana o suero de Coombs

A pesar de que esta prueba ya se había descrito a principios del presente siglo, fue Coombs quien la redescubrió en 1945 y la introdujo en la Medicina Clínica demostrando que podía ser utilizada tanto para la búsqueda de anticuerpos anti -

eritrocito incompletos en el suero (prueba indirecta), como para detectar la "sensibilización" de eritrocitos "in vivo" como ocurre por ejemplo en la enfermedad hemolítica del recién nacido (prueba directa) (XII:434).

En la reacción de la antiglobulina humana, los eritrocitos recubiertos o sensibilizados con anticuerpos de clase IgG como en anti-Rh (D), son aglutinados por un anticuerpo anti-IgG que reaccione con estas moléculas pegadas en células vecinas (figura 9)* (XII:434).

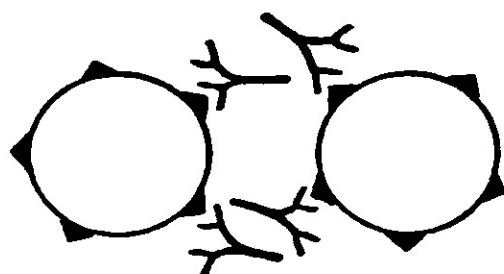
Algunas antiglobulinas son capaces de aglutinar eritrocitos que contengan - cerca del 1% del anticuerpo total necesario para sensibilizar por completo a una célula (9); si consideramos un eritrocito que tenga 15,000 sitios antigénicos para D, se necesitan por lo menos de 150 moléculas de anti-D por célula para que pueda ser detectado por la técnica de Coombs.

Parece ser que la concentración óptima de un anti-IgG debe ser de 20 - 40 $\mu\text{g/ml}$, ya que la cantidad necesaria para encontrar a los anticuerpos varía de acuerdo al sistema al que éste pertenece. Para encontrar un anti-D basta una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ a diferencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ que se requieren para un anti-Jk^a (XII:442-443).

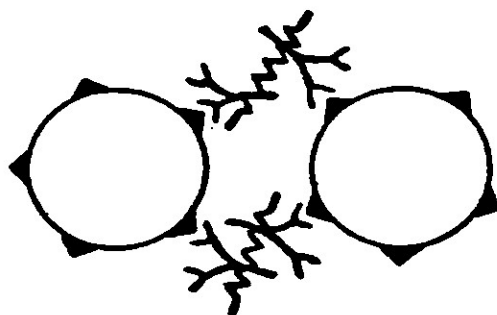
La utilidad de la prueba depende de la cantidad de complejos formados entre el anticuerpo investigado y el antígeno eritrocitario, siendo que a mayor número de complejos formados, mayor grado de aglutinación (34).

Cualquier factor que incremente la formación de complejos antígeno-anticuerpo, dará más sensibilidad a la prueba. Esta máxima sensibilidad será entonces lograda cuando la prueba sea llevada a cabo bajo condiciones que den el valor más

*Ver página 51



SIN AGLUTINACION



AGLUTINACION

FIG.9 AGLUTINACION MEDIANTE ANTIGLOBULINA HUMANA
O SUERO DE COOMBS

alto a la constante de equilibrio para el sistema en estudio (34). Si la constante de equilibrio depende de la fuerza iónica, la sensibilidad de la prueba indirecta de Coombs puede incrementarse si durante la fase de incubación se disminuye ligeramente la fuerza iónica (37), lo cual permite reducir el tiempo de reacción, lográndose además un aumento en la titulación de anticuerpos lo que facilita su detección cuando no se encuentran en altas concentraciones (34,80).

2.5 Centrifugación

Como la segunda fase de la reacción de hemaglutinación depende de la distancia que los complejos antígeno-anticuerpo tengan entre sí, cualquier factor físico que promueva este contacto acelerará dicha reacción.

Si los eritrocitos sensibilizados se dejan a que sedimenten por sí solos, la aglutinación no será máxima hasta que la sedimentación sea completa, lo que no siempre se logra. La aglutinación puede acelerarse y facilitarse grandemente por la centrifugación ya que esta pondrá rápidamente en contacto a los eritrocitos y anticuerpos dando oportunidad a que la reacción se produzca (XII:421).

III

Material y Métodos

3.1 Material

3.1.1 Material Biológico

- Albúmina humana cristalizada
- Albúmina humana en solución al 25% *
- Albúmina bovina polimerizada comercial **
- Control Rh-Hr**
- Suero anti Rh₀ (D) albuminoso comercial **
- Antiglobulina humana o Suero de Coombs**
- Sueros anti-A, anti-B y anti-AB***
- Eritrocitos humanos de fenotipo conocido en los principales sistemas de grupos -
sanguíneos***
- Sueros humanos
- Plasmas humanos

3.1.2 Material de vidrio

- Tubos de ensayo de 10 x 75 y 13 x 100 mm
- Pipetas Pasteur
- Pipetas graduadas de 0.1, 0.2, 1, 5 y 10 ml

*Instituto Nacional de Higiene, SSA

**Ortho Diagnostics

***Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional, IMSS

3.1.3 Aparatos

- Microscopio
- Espectrofotómetro
- Flamómetro
- Potenciómetro
- Baño de agua a 22°, 37° y 56°C
- Estufa a 37°C
- Centrífugas

3.2 Métodos

La parte práctica de la presente tesis se divide en:

3.2.1 Desarrollo de la solución de albúmina humana a baja fuerza iónica (ABFI)

Se preparó una solución al 30% a partir de albúmina humana cristalizada, y utilizando ésta como solución madre, se hicieron diluciones con un contenido de albúmina desde 30% hasta 6.9%

Tomando alícuotas de cada una de ellas, se les mezcló con medio volumen de una suspensión de eritrocitos en solución de cloruro de sodio 0.85%, se incubaron dichas mezclas a 22° y 37°C durante periodos de 2 y 4 horas.

Este paso se realizó para escoger aquella dilución mínima de albúmina en la cual, no hubiese hemólisis asegurando así la isotonicidad del reactivo. Cada prueba fue hecha paralelamente a un autotestigo, siendo los eritrocitos empleados de -

grupo O.

Debido a la dificultad para obtener cantidades importantes de albúmina cristalizada para la continuación del trabajo, se decidió emplear una solución de albúmina humana al 25% adicionada de caprilato de sodio como estabilizador - - - - (0.0033 gr/ml), producida por el Instituto Nacional de Higiene. Con esta solución se repitió la prueba anterior y se observó que, hasta una concentración de 13.2% no se presentaba daño en el eritrocito.

A continuación se procedió al ajuste de la fuerza iónica requerida, que es de 0.03 y para lo cual se efectuó una determinación del contenido de sodio de la solución. El resultado obtenido de 97 meq/lit hizo necesario el dializar la muestra para eliminar el excedente de sal; esta diálisis se practicó contra agua destilada a temperatura ambiente.

3.2.2 Verificación de las propiedades físico-químicas y biológicas de la solución ABFI

Con la diálisis se obtuvieron los meq/lit requeridos de sal. Paralelamente, se hizo la determinación de proteínas, teniéndose que diluir la muestra con agua destilada para tener una concentración del $22 \pm 2\%$; en caso de tener menos de los meq/lit necesarios en esta solución, se adicionó NaCl en cantidad suficiente. El pH de esta solución se mantuvo entre 6.8 -7.2

Al dializar la solución de albúmina no sólo se pierde sodio, sino también parte del caprilato que le sirve como estabilizador; por consiguiente, fue necesario comprobar la estabilidad de dicha solución sometiéndola a 56°C en baño de agua -

durante 50 horas, al cabo de las cuales no se presentó alteración en ella.

Para comprobar la pureza de la solución y descartar así cualquier aglutinación como consecuencia de la presencia de isoaglutininas anti-A y/o anti-B, o cualquier otro factor causante de una reacción falsa positiva, se incubaron eritrocitos de grupo A, B y O suspendidos en solución salina, durante 1, 2 y 4 horas a 37°C. Se centrifugaron, se buscó la presencia de aglutinación y/o hemólisis, y se llevaron hasta la prueba de Coombs. Para estas pruebas se utilizó 1 volumen de la suspensión de eritrocitos y 2 volúmenes de albúmina; para cada muestra se incluyó un autotestigo.

Posteriormente, se hicieron dos series de diluciones de un antisuero comercial (anti-Rh₀ albuminoso). Con estas diluciones se perseguían tres objetivos: determinación del tiempo óptimo de reacción y de la eficacia de la solución empleándola como medio de suspensión y como reactiva; y tercero, establecer una comparación con la albúmina bovina usada normalmente.

La primera serie, con diluciones hasta 1/512 que se usaron contra glóbulos rojos de distinto fenotipo en el sistema Rh-Hr, la albúmina humana dializada ($\mu = 0.03$) se empleó como: a) medio de suspensión, y b) reactiva.

a) Como suspensión: una gota de eritrocitos en suspensión salina se centrifuga 2', y se decanta el sobrenadante completamente. Se resuspende el botón eritrocitario con 3 gotas de la solución ABFI

b) Como reactiva: a una gota de la suspensión de eritrocitos, se le añaden 2 gotas de la solución ABFI.

En ambos casos se utilizaron 2 gotas de la dilución del antisuero comercial.

El tiempo de incubación varió entre 5 y 60' (5, 10, 15, 30 y 60'), después del cual se centrifugaron los tubos 90", se observó aglutinación y en caso de resultados negativos, se hizo la prueba de Coombs. Además de la albúmina humana se incluyó albúmina bovina polimerizada y control para albúmina como testigo, de acuerdo a las técnicas habituales.

En la segunda serie de diluciones, hasta un título de 1/1024, se utilizaron los reactivos en las mismas condiciones que se siguieron para la primera serie, pero con diferentes tiempos de incubación. Para la solución ABFI se dio un tiempo inicial de 10' a 37°C, centrifugación y lectura de aglutinación, y 5' más de incubación en ausencia de ésta antes de efectuar la prueba de Coombs. Para la albúmina bovina y control de albúmina se usó el tiempo normal de incubación de 60' seguido de la prueba de Coombs en caso necesario.

La efectividad mostrada por la solución ABFI en ambas series de diluciones, se aceptó como prueba inicial para establecer que no producía resultados falsos positivos o negativos.

3.2.3 Evaluación del reactivo frente a la metodología empleada habitualmente en un banco de sangre

Con el fin de reafirmar lo anterior, se escogieron como testigos negativos - sueros frescos sin anticuerpos, de cualquier grupo ABO, y se trabajaron contra eritrocitos de un "semipanel", con 1 hora de incubación a 37°C, seguida de la prueba de Coombs.

Después se emplearon tanto muestras frescas como congeladas con un tiempo

de incubación de 5' más, antes de llevar a la prueba de Coombs.

En estas dos pruebas, aún cuando se utilizó la solución ABFI como medio de suspensión, en la forma ya descrita, se hizo una variación en la proporción de los reactivos usados, empleándose 2 volúmenes de ABFI, 2 volúmenes de suero y 1 de glóbulos rojos en suspensión.

La comprobación de la sensibilidad de la solución para no mostrar resultados falsos negativos, se hizo a través de los sueros problema con anticuerpos demostrados.

Considerando los resultados obtenidos con las diferentes diluciones del anti - suero, y las pruebas con testigos negativos se propone la siguiente técnica para el uso de la solución ABFI:

- 1.- Se centrifuga una gota de la suspensión de eritrocitos al 2% durante 2'30" usando tubos de 10 x 75 mm.
- 2.- Se decanta perfectamente el sobrenadante
- 3.- Se añaden 2 gotas de la solución ABFI y 2 del suero a probar.
- 4.- Se incuban 10' en estufa o baño de agua a 37°C
- 5.- Se centrifugan los tubos 90" y se lee aglutinación
- 6.- En caso de resultados negativos, se incuba nuevamente durante 5'.
- 7.- Se hace la prueba de Coombs, efectuando los 3 lavados de los eritrocitos con solución salina precalentada a 37°C.

Para la evaluación de la técnica propuesta en la presente tesis, se procedió

al análisis de 47 muestras reportadas con anticuerpos antieritrocito fuera del sistema ABO positivos. A todas las muestras siempre antes de ser sometidas a una prueba - cruzada, se les determina el grupo ABO y Rh₀(D) para descartar una posible incom_ patibilidad debida a anticuerpos antieritrocito naturales regulares, y verificar aque - llos casos en que la muestra pertenece a la variedad D^u.

En algunos casos se repitió, en forma paralela el estudio de las muestras em_ pleando la metodología usada originalmente en la detección de dichos anticuerpos.

Los resultados obtenidos usando la solución ABFI, se compararon con los re_ portados primeramente por las pruebas salinas, proteicas y a baja fuerza iónica, de acuerdo al tiempo necesario para encontrar el o los anticuerpos en cuestión y el - grado de aglutinación mostrado.

Durante las diferentes etapas en el desarrollo de esta técnica, se empleó la antiglobulina humana o suero de Coombs; es importante aclarar que siempre antes - de ser usada, fue sometida al control de calidad que se lleva normalmente en un - banco de sangre, y que consiste en probarla en diluciones dobles progresivas frente a eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados.

IV

Resultados

4.1 Estabilidad

La solución de albúmina humana dializada demostró tener una estabilidad muy buena después de 50 horas a 56°C; no se encontró cambio de color, formación de escarcha o nata, precipitación, etc.; es decir, cualquier alteración que fuera indicio de inestabilidad.

4.2 Concentración

Después de efectuar las determinaciones correspondientes, se ajustó la solución dializada a una concentración proteica de $22 \pm 2\%$ con 55-65 meq/lit de Na^+ .

Durante el transcurso de la parte experimental fue necesario preparar varias veces el reactivo. Es importante hacer notar que la concentración de proteína puede mantenerse dentro del límite señalado, no así la fuerza iónica que debe ser constante. Ya que cada lote usado de albúmina humana en solución presenta una concentración iónica diferente, se presentó el caso en que se sacrificó la concentración proteica por la fuerza iónica.

4.3 Isotonicidad

Se encontró que la solución de albúmina humana se conservaba isotónica hasta una concentración de 13.2% en un tiempo de incubación de 2 y 4 horas a 22° y 37°C. A concentraciones menores se observó hemólisis y alteración de la morfología

eritrocitaria.

4.4 Pureza

Al ser probada esta solución con eritrocitos de grupo A y B con las técnicas Ar, A 37°C (1, 2 y 4 horas), y A/C y no encontrar aglutinaciones falsas positivas, se descartó la posibilidad de contaminación con γ -globulinas naturales regulares (anti-A y anti-B).

4.5 Determinación del tiempo óptimo de reacción, de la sensibilidad y del modo de empleo de la solución ABFI

En los cuadros I, II, III y IV* se observa que un tiempo de incubación mínimo de 5' permite la detección de la actividad del anticuerpo para la solución - ABFI y no para la albúmina bovina que requiere de mayor tiempo. La solución - ABFI se utiliza como medio de suspensión y como reactivo, y es notorio que se obtienen mejores resultados cuando se suspenden los eritrocitos en ella.

En los cuadros V y VI* por una parte se comprueba la ventaja de usar la - solución ABFI como medio de suspensión para los eritrocitos, y por otra, se observa que la sensibilidad de esta solución a un tiempo de incubación de 10' es tan buena como la obtenida normalmente con albúmina bovina en 60'.

*Ver página 62 y siguientes

Dilución 1/32

Cuadro I

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A / C	A	A / C	A	A / C	
R ₁ R ₁	2½		g	2	2½		5'
R ₂ R ₂	2		g	2	2		
R ₁ R ₂	2		1½		2½		
R ₁ r	g	2	g	1½	2½		
R ₂ r	-	2	-	1½	1½		
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A / C	A	A / C	A	A / C	
R ₁ R ₁	2		+	2	2½		10'
R ₂ R ₂	2		g	2	3		
R ₁ R ₂	3		1½		2		
R ₁ r	3½		g	1½	2½		
R ₂ r	1½		-	2½	2½		
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A / C	A	A / C	A	A / C	
R ₁ R ₁	2½		2½		2½		15'
R ₂ R ₂	2		2		3		
R ₁ R ₂	3		2½		4		
R ₁ r	3		2		4		
R ₂ r	1½		+		2½		
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A / C	A	A / C	A	A / C	
R ₁ R ₁	2		1½		3		30'
R ₂ R ₂	2		1½		2½		
R ₁ R ₂	3		2½		4		
R ₁ r	2½		2½		3½		
R ₂ r	2		1½		2½		
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A / C	A	A / C	A	A / C	
R ₁ R ₁	4		3		4		60'
R ₂ R ₂	3		2½		3		
R ₁ R ₂	4		3		4		
R ₁ r	3½		2½		3½		
R ₂ r	2½		2		3		
r r	-	-	-	-	-	-	

Anti-D (Rh₀) comercial diluido pro-
bado con ABPI como medio de suspensión -
(columna A), como reactivo (columna B) y
con albúmina bovina como reactivo (colum-
na C) a diferentes tiempos de incubación.

Cuadro II

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	-	2	-	1/2	-	2	
R ₂ R ₂	-	1/2	-	g	-	+	
R ₁ R ₂	-	2	-	+	-	+	
R ₁ r	-	1/2	-	+	-	g	
R ₂ r	-	1/2	-	+	-	g	
r r	-	-	-	-	-	-	5'

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	-	2	-	+	-	2	
R ₂ R ₂	-	+	-	1/2	-	+	
R ₁ R ₂	-	2	-	+	-	+	
R ₁ r	-	2	-	+	-	g	
R ₂ r	-	2	-	+	-	g	
r r	-	-	-	-	-	-	10'

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	-	2 1/2	-	+	+	2	
R ₂ R ₂	-	1/2	-	1/2	-	+	
R ₁ R ₂	-	2	-	+	-	+	
R ₁ r	-	2	-	1/2	-	+	
R ₂ r	-	2	-	1/2	-	g	
r r	-	-	-	-	-	-	15'

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	-	3	-	+	1/2	2	
R ₂ R ₂	-	1/2	-	1/2	g	2 1/2	
R ₁ R ₂	-	2 1/2	-	2 1/2	1/2	2 1/2	
R ₁ r	-	2	-	2	-	+	
R ₂ r	-	2 1/2	-	1 1/2	-	2	
r r	-	-	-	-	-	-	30'

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	-	+	-	2	+	2	
R ₂ R ₂	-	2	-	2 1/2	1/2		
R ₁ R ₂	-	2	-	2 1/2	1/2		
R ₁ r	-	2 1/2	-	2	-	1 1/2	
R ₂ r	-	+	-	1 1/2	-	+	
r r	-	-	-	-	-	-	60'

Anti-D (Rh₀) comercial diluido pro-
bado con ABPI como medio de suspensión -
(columna A), como reactivo (columna B) y
con albúmina bovina como reactivo (colum-
na C) a diferentes tiempos de incubación.

Cuadro III

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
R ₁ R ₁	37	/C	-	2	-	2 1/2	5'
R ₂ R ₂	-	2	-	2 1/2	-	2	
R ₁ R ₂	-	1 1/2	-	+	-	1 1/2	
R ₁ r	-	1 1/2	-	1/2	-	+	
R ₂ r	-	2 1/2	-	+	-	2 1/2	
r r	-	-	-	-	-	-	
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
R ₁ R ₁	37	/C	-	2 1/2	-	2	10'
R ₂ R ₂	-	2 1/2	-	2	-	2 1/2	
R ₁ R ₂	-	2	-	1 1/2	-	2 1/2	
R ₁ r	-	1 1/2	-	1/2	-	+	
R ₂ r	-	2 1/2	-	+	-	2 1/2	
r r	-	-	-	-	-	-	
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
R ₁ R ₁	37	/C	-	3	-	2 1/2	15'
R ₂ R ₂	-	2 1/2	-	2	-	2 1/2	
R ₁ R ₂	-	2	-	1 1/2	-	2	
R ₁ r	-	2	-	+	-	+	
R ₂ r	-	2 1/2	-	1 1/2	-	2 1/2	
r r	-	-	-	-	-	-	
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
R ₁ R ₁	37	/C	-	3	-	2 1/2	30'
R ₂ R ₂	-	2 1/2	-	2	-	2 1/2	
R ₁ R ₂	-	2 1/2	-	2	-	2 1/2	
R ₁ r	-	2 1/2	-	+	-	+	
R ₂ r	-	2 1/2	-	1 1/2	-	2 1/2	
r r	-	-	-	-	-	-	
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A	A	A	A	A	A	
R ₁ R ₁	37	/C	-	2 1/2	-	2	60'
R ₂ R ₂	-	2 1/2	-	2	-	3	
R ₁ R ₂	-	2	-	2	-	2 1/2	
R ₁ r	-	1 1/2	-	1 1/2	-	+	
R ₂ r	-	2	-	3	-	2 1/2	
r r	-	-	-	-	-	-	
r r	-	-	-	-	-	-	

Anti-D (Rh₀) comercial diluido probado con ABFI como medio de suspensión - (columna A), como reactivo (columna B) y con albúmina bovina como reactivo (columna C) a diferentes tiempos de incubación.

Cuadro IV

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R ₁ R ₁	-	1/2	-	-	-	-	5'
R ₁ R ₂	-	1/2	-	-	-	+	
R ₁ R ₃	-	1/2	-	-	-	1/2	
R ₁ r	-	g	-	-	-	g	
R ₂ r	-	g	-	-	-	g	
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R R	-	+	-	+	-	1/2	10'
R R	-	1/2	-	1/2	-	2	
R R	-	1/2	-	+	-	1/2	
R r	-	g	-	-	-	g	
R r	-	g	-	-	-	1/2	
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R ₁ R ₁	-	+	-	+	-	1/2	15'
R ₁ R ₂	-	1/2	-	1/2	-	2	
R ₁ R ₃	-	+	-	(+)	-	1/2	
R ₁ r	-	g	-	g	-	g	
R ₂ r	-	g	-	-	-	1/2	
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R ₁ R ₁	-	+	-	+	-	+	30'
R ₁ R ₂	-	2	-	1/2	-	2	
R ₁ R ₃	-	+	-	(+)	-	+	
R ₁ r	-	(+)	-	(+)	-	g	
R ₂ r	-	+	-	-	-	g	
r r	-	-	-	-	-	-	

Geno- tipo	A		B		C		tiempo
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R ₁ R ₁	-	1/2	-	2	-	1/2	60'
R ₁ R ₂	-	2	-	1/2	-	2	
R ₁ R ₃	-	1/2	-	2/2	-	2/2	
R ₁ r	-	1/2	-	1/2	-	-	
R ₂ r	-	2	-	2	-	2	
r r	-	-	-	-	-	-	

Anti-D (Rh₀) comercial diluido pro-
bado con ABPI como medio de suspensión -
(columna A), como reactivo (columna B) y
con albúmina bovina como reactivo (colum-
na C) a diferentes tiempos de incubación.

Quadro V

Geno-tipo	A		B		C		
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	3 1/2		2		4		
R ₂ R ₂	3		2 1/2		4		
R ₁ R ₂	2 1/2		2 1/2		4		
R ₁ r	2 1/2		+		3 1/2		
R ₁ ^h r	-	2	-	1 1/2	2		Dil.
r r	-	-	-	-	-	-	1/8

Geno-tipo	A		B		C		
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	2 1/2		1 1/2		3 1/2		
R ₂ R ₂	3		(+)		3 1/2		
R ₁ R ₂	2 1/2		+		4		
R ₁ r	2		-	3	2 1/2		
R ₁ ^h r	-	2	-	1 1/2	+		Dil.
r r	-	-	-	-	-	-	1/16

Geno-tipo	A		B		C		
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	1 1/2		1 1/2		3		
R ₂ R ₂	2 1/2		1 1/2		3 1/2		
R ₁ R ₂	2		+		2 1/2		
R ₁ r	(+) 2 1/2		-	2 1/2	2 1/2		
R ₁ ^h r	-	+	-	2	-	1 1/2	Dil.
r r	-	-	-	-	-	-	1/32

Geno-tipo	A		B		C		
	A	A	A	A	A	A	
	37	/C	37	/C	37	/C	
R ₁ R ₁	-	3	-	3	3		
R ₂ R ₂	-	3	-	3	3		
R ₁ R ₂	-	3 1/2	-	3	2 1/2		
R ₁ r	-	3 1/2	-	3	2 1/2		
R ₁ ^h r	-	+	-	-	-	1 1/2	Dil.
r r	-	-	-	-	-	-	1/64

Anti-D (Rh₀) comercial a diferentes diluciones probado con ABFI como medio de suspensión (columna A) y como reactivo (columna B), con un tiempo de incubación de 10'; y con albúmina bovina (columna C) como reactivo, con 60' de incubación.

Quadro VI

Geno- tipo	A		B		C		Dil.
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R ₁ R ₁	-	3/2	-	3	(+)		
R ₂ R ₂	-	2	-	1/2	2		
R ₁ R ₂	-	2	-	2	g	3	
R ₁ r	-	2	-	2	-	2	
R ₁ ^h r	-	-	-	-	-	-	Dil.
r r	-	-	-	-	-	-	1/128

Geno- tipo	A		B		C		Dil.
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R ₁ R ₁	-	2	-	2	(+)		
R ₂ R ₂	-	2	-	2	2		
R ₁ R ₂	-	2	-	1/2	-	2	
R ₁ r	-	2	-	-	-	1/2	
R ₁ ^h r	-	-	-	-	-	-	Dil.
r r	-	-	-	-	-	-	1/256

Geno- tipo	A		B		C		Dil.
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R ₁ R ₁	-	1/2	-	(+)	g	2	
R ₂ R ₂	-	1/2	-	+	g	2	
R ₁ R ₂	-	g	-	-	-	(+)	
R ₁ r	-	+	-	g	-	1/2	
R ₁ ^h r	-	-	-	-	-	-	Dil.
r r	-	-	-	-	-	-	1/512

Geno- tipo	A		B		C		Dil.
	A 37	A /C	A 37	A /C	A 37	A /C	
R ₁ R ₁	-	(+)	-	-	-	(+)	
R ₂ R ₂	-	+	-	-	-	(+)	
R ₁ R ₂	-	g	-	-	-	+	
R ₁ r	-	g	-	-	-	+	
R ₁ ^h r	-	-	-	-	-	-	Dil.
r r	-	-	-	-	-	-	1/1024

Anti-D (Rh₀) comercial a diferentes diluciones probado con ABPI como medio de suspensión (columna A) y como reactivo (columna B), con un tiempo de incubación de 10'; y con albúmina bovina (columna C) como reactivo, con 60' de incubación.

4.6 Problemas

Se estudiaron, previa determinación de grupo ABO y Rh₀ (D), las muestras de 38 personas (36 pacientes y 2 plasmas de donadores) que comprendieron 53 anticuerpos. A cada muestra le corresponde una hoja de reporte, a excepción del caso 27-28, ya que por circunstancias especiales se consideran dos.

En estas hojas se encuentra en la parte superior, en columna, los siguientes datos:

1a Columna.- Identificación del paciente, número de afiliación al - IMSS, hospital donde se le estudia y diagnóstico

2a Columna.- Grupo ABO y Rh-Hr, antecedentes transfusionales y - gestas

3a Columna.- Probable anticuerpo encontrado o mezcla de éstos

4a Columna.- Fecha en que se hizo el estudio por primera vez siguiendo las técnicas de rutina, y fecha en que se efectuó la prueba usando la solución ABFI; junto a ésta se encuentra indicado el tipo de muestra con que se trabajó: suero o plasma, fresco, refrigerado o congelado. Cuando sólo aparece una fecha es por que se realizaron los estudios de rutina y con ABFI en forma paralela.

A continuación aparece el panel de nueve o diez células de fenotipo conocido que se utilizó para conocer la probable especificidad del anticuerpo encontrado en el estudio original. Después se encuentran indicadas aquellas células que se emplearon para la prueba con ABFI.

En la parte inferior izquierda está el reporte original hecho con las técnicas habituales y el resultado con ABFI; es muy importante recordar que aún cuando am los resultados aparecen en el mismo cuadro, no siempre corresponden a las mismas células del panel. La proporción de albúmina y suero usada aquí fue de dos gotas de cada uno y una de eritrocitos.

A la derecha se encuentran dos columnas identificadas como A y B; cuando la muestra fue suficiente, se varió la proporción de albúmina y suero siendo entonces que A corresponde a tres gotas de albúmina por dos de suero, y B a dos gotas de albúmina por una de suero. La cantidad de eritrocitos fue siempre constante.

El grado de aglutinación encontrado se reporta desde g hasta 4+ de acuerdo a los patrones aceptados internacionalmente por la American Association of Blood Banks (AABB), y que son:

- 4+ Un agregado compacto de eritrocitos
- 3+ Agregados grandes y pequeños
- 2+ Agregados pequeños con el medio de suspensión claro
- + Agregados pequeños con el medio de suspensión turbio
- g Granulación

En total se estudiaron:

- 105 Muestras negativas
- 38 Muestras positivas comprobadas que incluyeron 53 anticuerpos
- 7 Muestras en las que se demostró que el anticuerpo en estudio perdió su actividad

- 2 Muestras en las cuales no se encontró el anticuerpo reportado, y que debido a la cantidad de muestra no fue posible verificar su actividad

G.M.Y.
168-53-0545
H.P.
I.M.F.

A Negativo anti D
Sin transfusión
G II A I

Caso 2

1) VI.08.82
2) VI.09.82 (S.R.)

Cel #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Xg a
1	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-		+	-		+	
2	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
3	r r	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	-		+	
4	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+		+	-			
5	R ₁ r	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R ₁ R ₂	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-		-	+	-	+	
7	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
8	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
9	R ₁ R ₂	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+		-	+	-	+	
10	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	

Técnicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22	3	4	-	3	2	3	4	4	3	-	-
S 37											
S/C											
Ar	2 1/2	2 1/2	-	+	+	2	3	1	3	-	-
A 37			-	2	3	3	4	3	3	-	-
A/C			-								
LISS/C	3	2	-	2	3	3	3	4	3	-	-
ABFI 37	4	3	-								
ABFI/C			-								

A

1	2	3	t
3 1/2	3	-	-
		-	-

B

1	2	3	t
3 1/2	3 1/2	-	-
		-	-

H.G.O.

anti D

Caso 4

1) VI.16.82 (S.C.)

Cell #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Xg a
1	R, r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+	
4	R, r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R, R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
7	R, R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
8	R, R ₁	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	+	
9	R, R ₁	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
10	R, R ₁	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+			

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/G											
Ar	4	4	-	4							
A 37	4	4	-	4							
A/C			-								
LISS/C											
ABPI 37	3	3	-	3							
ABPI/C			-								

A			
1	2	3	4
2 1/2	2 1/2	-	2 1/2
		-	

B			
1	2	3	4
2 1/2	2 1/2	-	2 1/2
		-	

 H.G.O.

anti D

Caso 6

1) VI.16.82 (S.C.)

Cel #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Py a	Py b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Xg a
1	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+	
4	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
7	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
8	R ₁ R ₂	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	+	
9	R ₁ R ₂	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
10	R ₁ R ₂	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+			

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/C											
Ar	(+)	3	-	3							
A 37	3½	4	-	4							
A/C			-								
LISS/C											
ABFI 37	4	4	-	2							
ABFI/C			-								

A

1	2	3	4
1½	2	-	1½
		-	

B

1	2	3	4
+	2	-	1½
		-	

 H.G.O. ---

anti D

Caso 7

1) VI.16.82 (S.C.)

Cell #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Ig a
1	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+	
4	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
7	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
8	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	+	
9	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
10	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+			

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/C											
Ar	-	-	-	-							
A 37	3 1/2	4	-	3							
A/C			-								
LISS/C											
ABFI 37	2	2 1/2	-	2							
ABFI/C			-								

A

1	2	3	4
1 1/2	2	-	1 1/2
		-	

B

1	2	3	4
1 1/2	2	-	1 1/2
		-	

anti D

Caso 8

H.G.O.

1) VI.16.82 (S.C.)

Cell #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Xg a
1	R,r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+		
2	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+		
3	r,r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+			-	+	-	+	
4	R,r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
6	R,R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
7	R,R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
8	R,r ₁	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+			-	+	-	+
9	R,R ₁	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
10	R,R ₁	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-			-	+		

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
s/c											
Ar	-	3/4	-	2/2							
A 37	3	3	-	3							
A/c											
LISS/c											
ABFI 37	+	4	-	3							
ABFI/c			-								

A

B

1	2	3	4
3/4	4	-	3
		-	

 H.G.O.

anti D

Caso 9

1) VI.16.82 (S.C.)

Cel. #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	a	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Ig a
1	R,r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+	
4	R,r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R,R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
7	R,R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
8	R,R	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	+	
9	R,R	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
10	R,R	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+			

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/C											
Ar	-	2 1/2	-	-							
A 37	3	4	-	3							
A/C			-								
LISS/C											
ABPI 37	2 1/2	3	-	3 1/2							
ABPI/C			-								

A

B

1	2	3	4
1 1/2	3	-	3 1/2
		-	

 H.G.O.

anti D

Caso 10

1) VI.16.82 (S.C.)

Cel #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Xg a
1	R,r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+	
4	R,r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R,R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
7	R,R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
8	R,R,	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
9	R,R,	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
10	R,R,	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+			

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/C											
Ar	-	-	-	-							
A 37	3	3	-	3							
A/C			-								
LISS/C											
ABPI 37	1½	2½	-	2							
ABPI/C			-								

A

B

1	2	3	4
(+)	(+)	-	(+)
		-	

H.G.O.

anti D

Caso 11

1) VI.16.82 (S.C.)

Cel #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Lg a	
1	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+		
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+		
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+			
4	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+		
5	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+		
6	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
7	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+		
8	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+		
9	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+		
10	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+				

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/C											
Ar	+	2	-	8							
A 37	3	3½	-	3½							
A/C			-								
LISS/C											
ABFI 37	2½	2½	-	2½							
ABFI/C			-								

A			

B			
1	2	3	4
1½	2	-	1½
		-	

- - -
- - -
H.G.O.
- - -

anti D

Caso 13

1) VI.16.82 (S.C.)

Col #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Zg a		
1	R, R	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+			
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+			
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+			
4	R, R	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+			
5	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+			
6	R, R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
7	R, R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+			
8	R, R, ,	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	+			
9	R, R, ,	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+			
10	R, R, ,	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+					

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/C											
Ar	-	-	-	-							
A 37	3 1/4	3 1/2	-	4							
A/C			-								
LISS/C											
ABPI 37	2 1/2	3 1/2	-	2 1/4							
ABPI/C			-								

A		

B			
1	2	3	4
2	2	-	1 1/2
		-	

 H.G.O.

anti D

Caso 14

1) VI.16.82 (S.C.)

Cel #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Xg a
1	R ₁ R	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+	
4	d ₁ R	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
5	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
6	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
7	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
8	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	-	+
9	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+			

Técnicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 t
Sr										
S 22										
S 37										
S/C										
Ar	-	-	-	-						
A 37	3/4	4	-	4						
A/C			-							
LISS/C										
ABPI 37	3	3/4	-	3/4						
ABPI/C			-							

A

B

1	2	3	4
2	3	-	3
		-	

 H.G.O.

anti D

Caso 15

1) VI.16.82 (S.C.)

Cel #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Ig a
1	R ₁ R	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	*		-	+	-	+	
4	R ₁ R	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
7	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
8	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	+	
9	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
10	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+			

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/G											
Ar	-	-	-	-							
A 37	4	4	-	4							
A/C			-								
LISS/C											
ABPI 37	3/2	3/2	-	3/2							
ABPI/C			-								

A

B

1	2	3	4
3/2	3/2	-	3/2
		-	

 H.G.O.

anti D

Caso 16

1) VI.16.82 (S.C.)

Cel #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Xg a
1	R,r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+	
4	R,r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R,R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
7	R,R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
8	R,R ₁	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	+	
9	R,R ₁	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
10	R,R ₁	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+			

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr											
S 22											
S 37											
S/G											
Ar	(+)	2	-	2/2							
A 37	3/2	3/2	-	3/2							
A/C			-								
LISS/C											
ABFI 37	4	4	-	3/2							
ABFI/C			-								

A

B

1	2	3	4
3/2	4	-	3/2
		-	

V.C.G.

O Positivo

anti c + E

Caso 19

1979-60-3937

Con transfusión

H.O.

G II P II

1) V.21.82 (S.F.)

Ca. Mama

Cell #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Ig a
1	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-		+	-		+	
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
3	r r	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	-		+	
4	R ₁ r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+		+	-			
5	R ₂ r	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-		-	+	-	+	
7	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
8	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
9	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+		-	+	-	+	
10	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+		-	-	+	-	

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr	-	2	-	-	2	-	2	4	-	-	-
S 22	-	2	-	-	2	-	4	4	-	-	-
S 37	-	2	-	-	2	-	2	3	-	-	-
S/C	(+)		(+)	-		-			-	-	-
Ar	+	4	(+)	(+)	3	-	4	4	-	2	-
A 37	2	4	2	1½	4	-	4	4	-	2	-
A/C						-			-		-
LISS/C											
ABFI 37	+	2½	1½	1½	3½	-	4	4	-	2	-
ABFI/C	2					-			-		-

A

B

O.B.L.

O Positivo

anti E + e

Caso 20

1663-40-1047

Con transfusión

H.G.

G VI P V A I

1) V.24.82 (S.C.)

Cell #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Xg a
1	R,r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-		+	-		+	
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
3	r r	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	-		+	
4	R,r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+		+	-			
5	R ₂ r	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
6	R,R ₁	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-		-	+	-	+	
7	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
8	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
9	R,R ₁	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+		-	+	-	+	
10	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+		-	-	+	-	

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 22	-	2	-	-	3 1/2	-	3 1/2	4	-	-	-
S 37	-	2	-	-	2	-	3	3	-	-	-
S/C	-		-	-		-			-	-	-
Ar	-	2	+	-	3	-	2	2	-	-	-
A 37	-	3	1 1/2	-	3	-	2 1/2	3 1/2	-	2	-
A/C	-			-		-			-	-	-
LISS/C											
ABFI 37	+	4	2 1/2	1 1/2	4	-	4	4	-	4	-
ABFI/C						-			-		-

A			
1	2	3	4
(+)	3 1/2	2	1 1/2

B			
1	2	3	4
+	3 1/2	2 1/2	1 1/2

V.V.I.

A Positivo

anti M

Caso 29

6572-41-0562

Con transfusión

Puebla, Pue.

- - -

1) VII.9.82 (S.R.)

C.R.I.

Cell #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Ig a
1	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-		-	+	-	+	
2	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+		-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
4	R ₁ r	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+		+	-	-	+	
5	R ₁ R ₁	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	
6	R ₂ R ₂	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-		-	-	-	+	
7		+	D ^u	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	-	-	+	
8	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+		-	+	-	+	
9	r'r	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	
10																						

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr	2	4	3	-	2	2	+	3	2		-
S 22	2	3	2	-	2	2	+	2	2		-
S 37											
S/C											
Ar	3	4	2	-	3	3	+	3	3		-
A 37	+	+	+	-	+	g	g	2	2		-
A/C	+	+	+	-	g	+	g	g	+		-
LISS/C											
ABPI 37				-	2	+					-
ABPI/C				-							-

A

B

E.S.A.
1723-20-506
H.C.N.
C.R.I.

B Positivo
Con transfusión
- - -

anti K

Caso 33

1) VI.16.82
2) VI.17.82 (S.R.)

Cell #	Geno tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Ig a	
1	R,r	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+		
2	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+		
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+		
4	R,r	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+		
5	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+		
6	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
7	R ₁ R ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+		
8	R,R	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+		-	+	-	+		
9	R ₁ R	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+		
10	R,R	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		-	+				

Técnica	A										B					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t	2	3	2	3	
Sr	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-					
S 22	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-					
S 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
S/C																
Ar	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-					
A 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
A/C																
LISS/C	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-					
ABPI 37		-	3/2									-	2/2		-	2/2
ABPI/C		-										-			-	

R.J.M.
 149-23-1012
 H.C.N.
 C.R.I.

O Positivo
 Con transfusión
 G IV P IV

anti Di^a

Caso 39

1) V.19.82
 2) V.20.82 (S.R.)
 VI.10.82 (S.C.)

Cel #	Gene tipo	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	Fy a	Fy b	K	k	Jk a	Jk b	Le a	Le b	Di a	Di b	Ig a
1	R,r	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	
2	R ₁ R ₂	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+		-	+	-	+	
3	r r	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
4	R,R	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5	r'r	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
6	R ₁ R ₂	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	
7	R,R ₁	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+		-	+	-	+	
8		+	D ⁿ	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	-	-	+	
9	R,R	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+		-	+	-	+	
10	R,R	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-		-	+	-	+	
9	R,R	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+		-	+	-	+	
10	r r	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+		-	-	+	-	

Técnicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	t
Sr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S/G	-	-	-	2	-	2 1/2	-	-	-	-	-
Ar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/C	-	-	-	2	-	2	-	8	-	-	-
LISS/C											
ABPI 37			-	8					-	2 1/2	
ABPI/C			-	2					-		

A			B		
9	10		9	10	
-	2		-	2	
-			-		

4.7 Análisis de Resultados

Para hacer la comparación entre las técnicas habituales y la solución ABFI, se pueden agrupar los casos estudiados de acuerdo a los resultados obtenidos tomando en cuenta el tiempo de reacción y el grado de aglutinación encontrados con la solución ABFI:

<u>Tiempo de reacción</u>	<u>Grado de aglutinación</u>	<u>Caso(s) #</u>
Mayor	Menor	4, 18, 19, 29
Mayor	Igual	5, 22
Mayor	Mayor	2, 6, 16, 17, 20, 33, 34
Menor	Menor	7, 10, 11, 14, 15, 26, 27, 32, 35
Menor	Variable	8, 9, 12, 13, 24, 30
Menor	Igual	38, 39
Igual	Mayor	21, 25, 36
Menor	Mayor	1, 3, 23, 28, 31, 37

Tabla 4

De los 53 anticuerpos en estudio, sólo el 15% necesitó de la prueba de - Coombs para ser demostrado.

Si bien se observan casos en que el tiempo necesario para hacer la identificación del posible anticuerpo es mayor, ésta se logra la mayoría de las veces con una aglutinación más clara, o por lo menos igual. Son mínimos los casos en que además del aumento en el tiempo de la prueba, se obtiene una lectura menor a la encontrada originalmente y que puede atribuirse al hecho de que estas muestras se conservaron en congelación o refrigeración con el consiguiente deterioro de los anticuerpos.

Por lo demás, la reducción en el tiempo de la prueba es notoria; el grado de aglutinación puede ser menor de $1/2$ a $+$, lo cual significativamente no es importante considerando que los valores que se dan son subjetivos, y aunque se trata de mantener el mismo criterio para asignarlos, son variables. No se encontraron resultados falsos positivos o falsos negativos.

V

Discusión

A través del tiempo se ha buscado que las técnicas empleadas en el banco de sangre tengan, en beneficio del enfermo, una mayor sensibilidad y especificidad; y que el tiempo en que estas se lleven a cabo y el error que lleven consigo, sean mínimos.

Solamente cuando se conocen aquellos factores que intervienen en el desarrollo de estas pruebas, se les puede modificar y manejar de tal forma en que se puedan obtener mejores resultados. En los primeros capítulos se han presentado una serie de conceptos en forma aislada, aunque tratando de conservar un orden lógico. Sin embargo, es ahora que no se les puede considerar así, sino como partes integrantes de un todo, y que entre unas y otras ejercen su efecto, siendo la única forma posible de tratar de conocer a fondo los mecanismos y factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo.

De todos los factores, se sabe que los medios de baja fuerza iónica permiten a través de la disminución de la barrera electrostática que rodea a los eritrocitos, la detección de anticuerpos durante la 1ª fase de la hemaglutinación, aunque se encuentren a bajas concentraciones y la reducción del tiempo de reacción (34, 62, 66, 80). Existen tres períodos durante los cuales puede modificarse la fuerza iónica (12):

- a) Sensibilización del eritrocito por anticuerpos específicos
- b) Lavado de las células sensibilizadas

c) Reacción de las células sensibilizadas con anti- γ globulina humana.

Se ha observado que es en el 1^{er} período cuando se pueden obtener los mejores resultados, siendo la fuerza iónica óptima del medio de 0.03 (12, 34, 37, 45, 48, 54).

Sin embargo, para anticuerpos contra el sistema ABO y a veces contra el Lewis, ésto no sucede así y se explica de la misma manera por la cual la reacción de la antiglobulina no se afecta por el uso de la baja fuerza iónica. La región Fc de una molécula de IgG que esté sobre la célula se encontrará aproximadamente a 10 nm de la membrana celular; si la capa iónica que rodea al eritrocito tiene 0.8 nm de espesor como se ha sugerido, entonces al reducir esta nube iónica no se produce efecto alguno sobre el extremo de la inmunoglobulina, ya que se encuentra fuera de esta nube. Se considera que los sitios antigénicos de los sistemas mencionados se localizan lo suficientemente alejados de la membrana celular con lo que escapan al efecto de la baja fuerza iónica (46, 54)

El tiempo de incubación para un medio de baja fuerza iónica se reporta entre 10-20', aunque generalmente se utilizan 15' en forma rutinaria y aún se puede acortar a 5' en caso de urgencia (24, 28, 37, 54, 62, 78, 80). Parece ser que cuando los medios de baja fuerza iónica se incuban durante más de 40', la sensibilidad decrece rápidamente, pero esto no está bien comprobado (37, 78).

Los medios de baja fuerza iónica estudiados están compuestos ya sea por azúcares o por aminoácidos que permiten reducir la concentración de sales del medio, y por consiguiente de iones, conservando la osmolaridad de éste. Cuando se cambia el número de iones en el medio, la nube iónica que cubre al eritrocito se alte

ra permitiendo que la distancia que existe entre las células sea menor y entonces, moléculas tan pequeñas como los anticuerpos de clase IgG, puedan llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo .

Los azúcares como lactosa, sacarosa y glucosa, como consecuencia de su naturaleza no iónica, permiten su empleo al no aportar a la solución cargas que interfieran en la reacción. De los aminoácidos sólo se emplean aquellos cuyo punto isoeléctrico sea cercano al pH de la reacción (6.5 -6.8) con lo que se tiene una ionización mínima ya que a un pH mayor podrían contribuir a la solución con una carga formal. De todas estas sustancias, posiblemente sea la glicina la más usada ya que es menos susceptible de contaminación bacteriana, más fácil de usar y al parecer no interfiere con la participación del complemento en la hemólisis de tipo inmune. Se ha dicho que la glicina en un medio de baja fuerza iónica se presenta en parte como zwitterion lo cual aumenta indirectamente la unión de IgG con los antígenos celulares al reducir el grado de hidratación entre ambas moléculas. Posiblemente su efecto no está asociado a su actividad dieléctrica (1,12,51).

Tomando en cuenta las características de las sustancias empleadas hasta ahora, se eligió a la albúmina porque al presentar una carga neta negativa se permite la captación de cationes del medio lo cual da a lugar a un segundo efecto también muy importante, la deshidratación que ejerce sobre y entre los sitios reactivos de las moléculas de antígenos y anticuerpos. Al permitirse que los sitios reactivos se encuentren libres de cualquier impedimento estérico, se facilita su choque y la unión resultante será mayor.

Debe recordarse que la capacidad amortiguadora de la albúmina se logra a

través del sistema Albúmina/Albuminato de sodio más que por la presencia de determinados aminoácidos en la molécula proteica. Cuando se emplea un medio albuminoso para efectuar la reacción antígeno-anticuerpo, ésta no se verá afectada por un cambio de pH. Igualmente debe tenerse en cuenta la constante dieléctrica de la albúmina que permite que la distancia intercelular sea menor.

No solamente deben evitarse los impedimentos estéricos, sino que debe haber un cambio de energía en el sistema para que el choque entre las moléculas sea mayor. Se ha establecido que los anticuerpos de clase IgG, requieren de un suministro de energía que se logra con la incubación a 37°C.

Considerando las cualidades de la albúmina se establece su empleo para favorecer la hemaglutinación por anticuerpos de tipo IgG principalmente.

Cuando se disminuye la fuerza iónica del medio pueden presentarse reacciones falsas positivas debido a la adsorción no específica de proteínas (12,37,48).

Los eritrocitos se aglomeran espontáneamente a muy bajas fuerzas iónicas. Los factores responsables son proteínas y euglobulinas (principalmente IgM, aunque también algunas IgG) que al adsorberse a éstos inespecíficamente precipitan juntos - al quedar reducida la carga eritrocitaria hasta en un 75% o más. Al adicionar una sal que restaure la fuerza iónica isotónica se dispersan los eritrocitos por la redisolución de las proteínas adsorbidas (74).

La reducción de la carga eritrocitaria sin la formación de puentes proteicos intercelulares resulta en la producción de rouleaux. Sin embargo, la aglutinación ocurre frecuentemente como resultado a la adsorción de moléculas a dos eritrocitos - al mismo tiempo. Esta aglutinación puede ocurrir en ausencia de anticuerpos anti -

eritrocito específicos y hacer difícil la distinción de una aglutinación por un anticuerpo específico.

Aunque a bajas fuerzas iónicas (0.06 - 0.08, más que a la comunmente usada de 0.15) se propicia la actividad hemolítica de todo el complemento (1,79), se fijan en especial sobre la superficie celular grandes cantidades de C_{4b} y C_{3b} lo que puede dar como resultado hemólisis e indicar la presencia de un anticuerpo hemolítico cuando realmente no sucede así (51,60,69) La fuerza iónica mínima para la actividad del complemento se ha fijado en 0.034 (53,79).

La fijación del complemento a bajas fuerzas iónicas se observa principalmente en sueros que contienen un título alto de anticuerpos fríos (37,51).

Se ha recomendado tener las siguientes consideraciones cuando se usa un medio de baja fuerza iónica:

- a) Usar volúmenes iguales de las células en el medio a baja fuerza iónica y del suero a probar durante la incubación, para tener una fuerza iónica final de 0.09, ya que un exceso del medio a baja fuerza iónica produce falsas positivas como producto de una fuerza iónica muy baja. Por el contrario, un exceso de suero, incrementa la fuerza iónica de la mezcla de reacción y por lo tanto la sensibilidad de la prueba (14, 51,54,78).
- b) Cuando se usan tubos de vidrio, es mejor usar pipeta Pasteur ordinaria porque cuando los tubos son de plástico, las gotas varían su volumen grandemente por la fuerza electrostática. La variación en el volumen

de las gotas puede ser de $6 \mu\text{l}$ a $14 \mu\text{l}$. Para los tubos de plástico es recomendable el uso de una pipeta Eppendorf para asegurar volúmenes iguales (49,54)

- c) Distribuir el medio a baja fuerza iónica en alícuotas esterilizadas y almacenadas a 4°C para prevenir la contaminación microbiana (54)
- d) Lavar los eritrocitos en solución salina antes de suspenderlos en el medio a baja fuerza iónica para evitar las reacciones falsas positivas, y a menos de que se elimine perfectamente la salina del último lavado, se recomienda hacer este con la solución a baja fuerza iónica (14,54)
- e) Hacer lavados con NaCl 8.5 g/l amortiguada a un pH de 6.7
- f) Lavar la sangre citratada completa con solución salina para prevenir la aglutinación espontánea de los eritrocitos (49).

Ya se ha demostrado la utilidad de un medio a baja fuerza iónica; por sus características, la albumina presenta diversos aspectos que promueven la hemaglutinación y es así que el uso de la albúmina bovina puede considerarse de rutina desde 1945. Sólo falta profundizar más en las semejanzas que existen entre la albúmina bovina y humana para proponer el uso de esta última en las técnicas inmunohematológicas.

Comparando las dos albúminas se observa que son muy similares; ambas moléculas consisten de una cadena sencilla de aproximadamente 580 aminoácidos cuya secuencia está bien definida; esta cadena se mantiene plegada mediante puentes disulfuro (XVI:68).

En la siguiente tabla se presentan varios datos que muestran el parecido existente entre ellas (XVI:40,64,141,147):

	<u>A. Humana</u>	<u>A. Bovina</u>
A.A. presentes:		
Ac. aspártico	39	41
Ac. glutámico	60	59
Alanina	63	46
Arginina	23	23
Asparagina	15	13
Cisteína	1	1
1/2 Cistina	34	34
Fenilalanina	30	27
Glicina	12	15
Glutamina	23	20
Histidina	16	17
Isoleucina	8	14
Leucina	61	61
Lisina	58	59
Metionina	6	4
Prolina	25	28
Serina	22	28
Tirosina	18	19
Treonina	36	34
Triptofano	1	2
Valina	39	36
Total	584	581
Grupos ácidos titulables	99	100
Grupos básicos titulables	97	99
Carga neta a pH 7	-18	-18
Cadena	Sencilla	Sencilla
Peso Molecular	66,290	66,210
Aminoácido terminal	Ac. aspártico	Ac. aspártico

	<u>A. Humana</u>	<u>A. Bovina</u>
Contenido carbohidrato	- - - -	- - - -
Constante de sedimentación $S_{20} w \times 10$		
Monómero	4.6	4.5
Dímero	6.5	6.7
Viscosidad Intrínseca	0.042	0.0413
Dimensión Å	38 x 150	40 x 140
Punto Isoeléctrico ($\mu / 2 = 0.15$)	4.7	4.7
Punto isoiónico ($\mu / 2 = 0$)	5.2	5.3
Absorbancia óptica A g/ litro 279 nm	0.531	0.667

La albúmina humana puede obtenerse de varias fuentes: placentas, sangres caducadas, fraccionamiento de plasma mediante etanol siguiendo la técnica de Cohn o alguna modificación a ésta, etc. (XVI:136; XVII:562).

La proteína pura es incolora, pero toma un ligero tono amarillento como resultado de residuos de hematina que son difíciles de remover. Fue de las primeras proteínas plasmáticas que se obtuvieron comercialmente debido al papel que desempeñó durante la II Guerra Mundial como sustituto de plasma (XVI:49,148).

La gran estabilidad de la albúmina permite el uso de condiciones en que la mayoría de las proteínas plasmáticas se desnaturalizan, además se caracteriza por su tamaño pequeño, gran solubilidad resultante de la presencia de más de 200 cargas

positivas y negativas que le confieren un carácter hidrofílico, y por su flexibilidad y diversidad para retener iones (XVI:146,154).

Considerando que es un derivado humano y por consiguiente un posible agente infeccioso, se le somete durante 10 horas a 60°C para inactivar al virus de la hepatitis (XVI:64). Antes de llevar a cabo este proceso, se le estabiliza con acetil-triptofanato de sodio o más comunmente con caprilato de sodio para evitar su desnaturalización (29).

La albúmina almacenada por diez años en estado líquido a 5°C no muestra deterioro, pero el almacenamiento a 32°C en estado líquido sí la altera, y más aún si se encuentra en forma sólida (XII:105).

El suero de una cantidad muy reducida de personas es capaz de aglutinar a los eritrocitos cuando no contengan anticuerpos antieritrocito. Este fenómeno se observa cuando las células se encuentran suspendidas en albúmina, pero no en aquellas que están en medio salino.

No se conoce el mecanismo causante de este fenómeno, pero se ha dicho que la aglutinación sólo se presenta cuando la albúmina ha sido tratada con caprilato de sodio u otras sales de ácidos grasos, y que el anticuerpo (IgG ó IgM) causante de la reacción está de hecho dirigido contra el estabilizador.

Estas aglutininas, que no corresponden a los anticuerpos antieritrocito, pueden causar reacciones falsas positivas en pruebas en las que se utiliza algún reactivo que contenga albúmina estabilizada. Sin embargo, existen reportes en los cuales se observa este efecto aún cuando la albúmina no tenga el estabilizador, lo cual sugiere que depende de las propiedades de ciertos anticuerpos o de otros factores.

También se ha pensado que es una reacción inmunológica resultante de un anticuerpo dirigido hacia un determinante conformacional presentado por la albúmina comercial. Aparentemente, la alteración que sufre la albúmina para evitar su desnaturalización, provoca que queden expuestos otros sitios antigénicos con los cuales se lleva a cabo la formación del complejo, y este se absorbe pasivamente a los eritrocitos inespecíficamente (3,17,18).

No sólo deben tomarse en cuenta las características ya descritas sobre la albúmina humana y bovina, sino que también debe observarse su costo. El Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, recibe a través de un convenio con el Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, albúmina humana con un precio que corresponde aproximadamente al 40% del valor que se tiene que pagar por la albúmina bovina, lo cual es un ahorro considerable.

Ciertamente esta solución de albúmina ha sido producida para ser utilizada como sustituto de plasma en pacientes y su uso como reactivo podría considerarse un desperdicio de un material biológico tan importante. Pero recordando que el objetivo de esta tesis es proporcionar una técnica confiable y encaminada hacia la reducción del tiempo de reacción para casos de urgencia, bien se puede "sacrificar" una mínima parte de este producto.

Para otras instituciones muy posiblemente sí resulte algo costoso el uso de la albúmina humana en lugar de la bovina, ya que su precio en el mercado es más elevado y se le consigue sólo en determinados sitios, pero dado el volumen que se utiliza, se puede trabajar un muy buen número de muestras justificando de esta forma

aún más su empleo.

La albúmina bovina que se utiliza normalmente como reactivo en un banco de sangre, es un producto de importación, sujeto a las situaciones que se deriven del caso y es entonces que deberá recordarse en un momento dado la posibilidad de usar albúmina humana si se carece de la bovina.

Los sistemas a los que pertenecen los anticuerpos estudiados son aquellos de mayor importancia inmunohematológica (Rh-Hr, Duffy, Kidd, Kell, Lewis, Diego, - MNSs y P. Por lo general, los anticuerpos dirigidos contra los antígenos eritrocitarios se presentan bajo un tipo de inmunoglobulina en especial, siendo entonces que los anticuerpos contra los sistemas Rh-Hr, Duffy, Kidd, Kell, Ss y Diego, son casi siempre de tipo IgG; mientras que los Lewis, MN y P, son IgM. Esto no significa que bajo determinadas circunstancias o como casos aislados, puedan presentarse en otra forma.

De los 53 anticuerpos estudiados, puede decirse que 49 fueron de tipo IgG y 6, IgM; la diferencia característica por su conducta entre ambos, es la temperatura de reacción y el medio adecuado para que ésta se lleve a cabo. Al usar la solución de albúmina humana a baja fuerza iónica (ABFI) se proporciona a la reacción un medio que favorece la hemaglutinación por anticuerpos calientes.

A través de la dilución de un antisuero comercial (anti-Rh₀) se estableció - que usando esta solución ABFI era posible la detección del anticuerpo en muy poco tiempo aún cuando este se encontrase a muy baja concentración (1/1024)*. Si se es cogió un tiempo de incubación de 10' como rutina para la prueba cuando pudo ser

*Ver página 67

menor, fue para evitar que en un momento dado se pudiese pasar por alto la presencia de un anticuerpo débil.

Para hacer la comparación entre los resultados obtenidos en base al tiempo de reacción y al grado de aglutinación con los métodos de rutina y la solución ABFI, deben tenerse algunos puntos en mente:

Los resultados anotados en los métodos de rutina fueron los que se tuvieron cuando se encontró por primera vez el anticuerpo, y para probar la acción de la ABFI se utilizaron estas muestras almacenadas (congeladas o refrigeradas) después de un tiempo variable. En algunos casos, si había la posibilidad, se repitió la técnica de rutina para comprobar la actividad del suero y se observó que no era la misma a la reportada originalmente. Por lo tanto, cabe esperar que aquellos sueros que mostraron un grado ligeramente menor de aglutinación cuando se usó ABFI que al obtenido con otro medio, hubieran presentado un resultado similar y aún mejor si se hubiera hecho la prueba con suero fresco y en forma paralela a la rutina.

Hay ocasiones en que algunos anticuerpos pueden llegar a detectarse con una prueba rápida (Ar), pero por lo general, es a través de una aglutinación débil y necesitan de la fase de incubación (60') para poder obtener su mayor aglutinación. Es cierto que la técnica de ABFI se efectúa con una fase de incubación, pero mucho más corta que la de cualquier otro método y con la cual se puede llegar al mismo resultado. Podría incluirse la prueba rápida antes de efectuar la incubación ya que a veces con ésta se tiene un buen resultado, pero tomando en cuenta que es un tiempo muy corto (10'), es mejor reducir los pasos a seguir y llevar la muestra directamente a incubación.

La técnica incluye un tiempo de incubación adicional de 5' seguido de la prueba de Coombs cuando después de los 10' iniciales se tiene un resultado negativo. Esta incubación tiene un doble fin; prolongar el tiempo de reacción y mantener ésta a la temperatura de 37°C. Si el anticuerpo presente en el suero sólo se detecta mediante la prueba de Coombs, lleva menos tiempo efectuar ésta después de 15' y no de 60'.

Debe hacerse una mención especial con respecto a los anticuerpos IgM, porque aunque esta prueba no está encaminada a su detección, ha demostrado que sí se les puede encontrar. Como ya se ha dicho, estos anticuerpos reaccionan preferentemente a temperaturas de 4°- 22°C en medio salino, y al no estar en las condiciones óptimas de reacción presentan grados de aglutinación menores o iguales. Siendo estos anticuerpos de naturaleza exotérmica, no necesitan que se les proporcione energía porque entonces se favorece la disociación del complejo antígeno-anticuerpo formado; por otro lado, si el efecto de la baja fuerza iónica es reducir la distancia intereritrocitaria, al quedar las células muy cercanas entre sí, puede dificultarse la entrada de una molécula grande como es un anticuerpo de tipo IgM. Con un tiempo de incubación mínimo de 10' aquellos anticuerpos fríos que se encuentran presentes no sufren el efecto total de la temperatura y pueden encontrarse con buenos resultados.

Dado que resultaría muy extenso hacer un análisis especial por separado para cada caso estudiado, es por eso que se les ha agrupado de acuerdo a los resultados obtenidos*. Sin embargo, a continuación se presentan algunos comentarios a

*Ver página 109

reportes que muestran características muy especiales y que deben ser observados con interés:

Caso 18 (Ch. V. M.)

En este caso se tiene de una manera muy significativa la variación que puede haber en la actividad de un anticuerpo cuando el suero problema se guarda en refrigeración más de 72 horas. En el momento de efectuar la prueba con ABFI, con suero refrigerado, y observar una aglutinación menor a la reportada con albúmina bovina, se repitió esta prueba (Ar y A 37°C), y se encontró una aglutinación de 1/2 + con lo cual se demuestra que la disminución de aglutinación obtenida con ABFI es sólo aparente y debida a una razón ajena a la técnica.

Caso 20 (O. B. L.)

La muestra de esta paciente se trabajó paralelamente por los métodos de rutina y ABFI, lo cual permite suponer que la actividad de los anticuerpos no disminuyó por el tiempo de almacenaje. Aquí se observa muy claramente la reducción del tiempo de reacción; por la técnica usual se requiere llegar a la incubación de 1 hora (A 37°C) para obtener la mejor imagen, y aún de la prueba de Coombs. Usando la solución ABFI, con un tiempo de incubación mínimo de 10' se obtienen mayores grados de aglutinación; además de ser posible encontrar un anticuerpo aún cuando el antígeno correspondiente sólo se presenta en dosis sencilla lo cual no se logra con las técnicas habituales.

Caso 21 (T. J. L.)

A pesar del tiempo transcurrido entre el reporte original y la prueba con ABFI, el anticuerpo activo todavía, permite que se le detecte cuando se emplean células con dosis sencilla del antígeno c.

Caso 27 y 28 (H. H. I.)

En el reporte original (caso 27) de la búsqueda de anticuerpos antieritrocito se da como resultado la presencia de una mezcla de anti-E + anti-Le^b, aunque éste último aparece muy dudoso. Después de múltiples transfusiones en el lapso de 2 años, presenta una reacción postransfusional muy fuerte por lo que se repite la búsqueda de anticuerpos antieritrocito, y en ésta se pierde por completo la imagen del anti-Le^b y surge un posible anti-Di^a (caso 28). La imagen poco franca que se tiene puede deberse a la reacción postransfusional en la que se consumieron los anticuerpos.

En las hojas de resultados se presentan dos reportes comparativos porque se trabajaron 2 muestras diferentes, una muy anterior a la reacción trasfusional y con la cual, debido a la poca cantidad de muestra, se encuentra un anticuerpo sin poder especificar si es anti-E, anti-Le^b o anti-Di^a (caso 27). Con la segunda muestra (caso 28), posterior a la reacción, se encuentran los 3 anticuerpos mencionados.

Caso 29 (V. V. I.)

El anticuerpo que aquí se estudia, es uno de los anticuerpos fríos que se incluyeron en este trabajo. Puede observarse que los mejores resultados se tienen cuan

do se utiliza un medio salino y a temperaturas menores a 37°C. No obstante estas características, al emplear la solución ABFI se le puede encontrar con un buen grado de aglutinación, lo cual indica que aunque se tuvieran anticuerpos de clase IgM es posible el uso de esta solución sin peligro de omitir su presencia.

Caso 30 (Ch. B. M.)

Aquí es difícil atribuir la menor aglutinación observada con ABFI al tiempo de congelación de la muestra, o al tipo de anticuerpo con el que se trata; siendo el anti-P un anticuerpo frío, cuya principal característica es la disminución de su reactividad por efecto de la temperatura, podrían darse las dos situaciones.

Caso 37 (H. O. I.)

Aunque sería aventurado asegurar con los resultados obtenidos que la sensibilidad del reactivo y de la técnica es muy buena, con este ejemplo en que se incluyeron tanto la prueba albuminosa como el LISS, podría correrse el riesgo de afirmarlo. Mientras que con la técnica albuminosa, seguida de la prueba de Coombs no se encuentra al anticuerpo, el medio LISS ofrece un resultado muy débil y que puede en un momento dado considerarse dudoso. Por el contrario, la solución ABFI proporciona con 10' de incubación un dato mucho más claro que el que se encuentra con LISS.

Caso 39 (R. J. M.)

Para este ejemplo se hizo la prueba con ABFI dos veces; la primera emplean

do las células del panel con el que fue encontrado el anticuerpo, y que presenta -
ban al antígeno Di^a en dosis sencilla. Con la segunda se utilizaron otras células
que tenían al antígeno en doble dosis, y si con la primera muestra fue necesario ha-
cer la prueba de Coombs, con la segunda bastó el tiempo de incubación. Para am-
bas pruebas se utilizó la misma muestra, la primera refrigerada y la segunda conge-
lada.

Por último, tal vez resulte conveniente hacer algunas indicaciones respecto a
la parte práctica de la técnica.

Se recomienda que:

- 1.- Los tubos usados sean de 10 x 75 mm, pues de lo contrario, al momen-
to de centrifugar los eritrocitos y decantar la solución salina, se pierde
una parte de éstos, dificultando posteriormente la lectura de aglutina-
ción. Si a esta razón se añade la posibilidad de llevar la prueba a -
Coombs, debe recordarse que con cada lavado se pierde otra parte del
botón eritrocitario.
- 2.- La punta de las pipetas Pasteur sean aproximadamente del mismo calibre,
para asegurar en lo posible que los volúmenes empleados sean iguales.
- 3.- El lavado de los eritrocitos previo a la prueba de Coombs sea continuo,
ya que si éstos permanecen mucho tiempo en la solución salina, al res-
taurarse la fuerza iónica y disminuir la temperatura del medio, podría
destruirse el trabajo ya hecho.
- 4.- En el momento de efectuar la prueba, sea ésta lo único que se trabaje,

pues si se interrumpe la secuencia de trabajo por estudiar otra muestra al mismo tiempo, se pierde el principal objetivo de la técnica que es la reducción del tiempo de reacción.

VI

Conclusiones

1.- Todas las pruebas que se hagan deben incluir, en lo posible, testigos positivos y negativos; y además, es sumamente importante tener el control previo físico-químico de los reactivos como son: pH, concentración proteica, fuerza iónica, isotonicidad y estabilidad.

2.- Se sabe que los eritrocitos en suspensión se rodean de iones Na^+ con lo que se origina el potencial zeta; si la concentración de iones en el medio se altera, el potencial zeta se verá afectado.

3.- La elevación de la constante dieléctrica del medio a través de polímeros permite la reducción de la distancia intereritrocitaria. La albúmina además de tener esta característica, produce por su efecto osmótico la captación de Na^+ y la deshidratación del medio y de los eritrocitos.

4.- La capacidad amortiguadora de la albúmina permite que no se requiera de otras sustancias que actúen con este fin, manteniéndose así la fuerza iónica del medio en niveles bajos.

5.- La utilización de albúmina humana en lugar de bovina proporciona a la reacción condiciones más semejantes a las que se tienen "in vivo".

6.- Como no se ha comprobado perfectamente que la albúmina estabilizada con caprilato de sodio sea causa de resultados falsos positivos, y dado que la concentración de éste es muy baja, no se puede rechazar la utilización de una albúmina así tratada dentro de los métodos empleados en un banco de sangre.

7.- La ausencia de resultados falsos positivos puede explicarse en base a - que toda la prueba se lleva a cabo a la temperatura de 37°C con lo que se evita la acción de las globulinas frías que las causan, y al control de la baja fuerza - iónica.

8.- El uso de volúmenes iguales de albúmina y suero proporciona los mejores resultados; la variación de esta proporción confirma la disminución en la sensibilidad de otras pruebas a baja fuerza iónica ya estudiadas.

9.- Esta solución ABFI presenta una sensibilidad probada en muestras con - anticuerpos a bajo título.

10.- Se evita en mayor grado el efecto de dosis.

11.- La cantidad de muestra y reactivo empleada, así como el costo de - la prueba es menor.

12.- La observación del efecto de un tiempo prolongado de incubación para un medio de baja fuerza iónica no se hizo, por estar fuera del objetivo de esta tesis.

En base a las características químicas que se tienen en la albúmina bovina - y en la humana, es posible sugerir que los efectos logrados con el uso de una solución de albúmina humana a baja fuerza iónica (ABFI) sean perfectamente reproducibles con la albúmina bovina, siendo el costo de una y otra la única diferencia que determine su empleo.

Debe recordarse que muchos de los sueros empleados se conservaron en congelación desde el momento en que fueron detectados a través del trabajo de rutina - del Banco Central de Sangre, hasta cuando fueron probados con la solución ABFI. Durante este tiempo algunos sueros perdieron su actividad y de otros se pudo comprobar que ésta había disminuído considerablemente repitiendo las pruebas originales.

Es importante observar que si bien se encuentran resultados que muestran un grado de aglutinación menor a los obtenidos por las técnicas usuales, existen otros, en que la aglutinación es mayor y también se produce en menos tiempo, por lo que se consideran resultados muy aceptables.

Por otro lado, al requerirse del suero de Coombs para la detección de los - anticuerpos sólo en una mínima parte, hace que el costo de la prueba en general - disminuya.

Por lo tanto, no es sólo en base a su efectividad hemaglutinante que debe - tomarse en cuenta esta solución de albúmina, sino principalmente en la reducción del tiempo de reacción en casi un 60% sin perder sensibilidad y del costo de la prueba, lo que justifica que se le proponga como un método confiable para la búsqueda de anticuerpos antieritrocito en caso de urgencia, y con lo cual se alcanza el objetivo de esta tesis.

VII

Citas Bibliográficas (textos)

- 1.- Atchley, W.A., Bhagavan, N.V. and Masouredis, S.P. (1964) Influence of the ionic strength on the reaction between anti-D and D positive red cells. *J. Immunology* 93:701-711
- 2.- Barnes, A.E. (1966) The specificity of pH and ionic strength effects on the kinetics of the Rh(D)-antiRh(D) system. *J. Immunology* 96:854-864
- 3.- Beck, M.L., Edwards, P.L., Pierce, S.R., Hicklin, B.L. and Bayer, W.L. Serologic activity of fatty acid dependent antibodies in albumin-free systems. *Transfusion* 16(5):434-436
- 4.- Brooks, D.E., Millas, J.S., Seaman, G.V.F. and Vassar, P.S. (1967) Some physicochemical factors relevant to cellular interactions. *J. Cell Physiology* 69:155-168
- 5.- Case, J. (1967) Albumin autoagglutinating phenomenon as a factor contributing to false positive reactions when typing rapid slide-test reagents. *Vox Sanguinis* 30:441-444
- 6.- Cook, G.M.W., Heard, D.H. and Seaman, G.V.F. (1961) Sialic Acids - and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature* 191:44-47
- 7.- Dembitzer, H.M., Oberhardt, B.J., Duffy, J.L. and Lalezari, P. (1973) Polybrene induced red blood cell aggregation in vitro; morphological - aspects. *Transfusion* 12(2):94-97
- 8.- Diamond, L.K. and Denton, R.L. (1945) Rh agglutination in various media

with particular reference to the value of albumin. *J. Lab. Clin. Med.*
31:821-830

- 9.- Dupuy, M.E., Elliot, M., and Masouredis, S.P. (1964) Relationship between red cell bound antibody and agglutination in the antiglobulin reaction. - *Vox Sanguinis* 9:40-44
- 10.- Economidou, J., Hughes-Jones, N.C. and Gardner, B. (1967) The functional activities of IgG and IgM anti-A and anti-B. *Immunology* 13; 227-234
- 11.- Edington, T.S. (1971) Dissociation of antibody from erythrocyte surfaces by chaotropic ions. *J. Immunology* 106(3):673-680
- 12.- Elliot, M., Bossom, E., Dupuy, M. and Masouredis, S.P. (1964) Effect of ionic strength on the serologic behavior of red cell isoantibodies. *Vox Sanguinis* 9:396-414
- 13.- Eylar, E.H., Madoff, M.A., Brody, O.V. and Oncley, J.L. (1962) The contributions of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. *J. Biological Chemistry* 237(6):1992-1999
- 14.- Fitzsimmons, J.M. and Morel, P.A. (1979) The effects of red blood cell suspending media on hemagglutination and the antiglobulin test. *Transfusion* 19(1):81-85
- 15.- Garraty, G., Petz, L.D. and Hoops, J.K. (1973) The correlation of cold agglutinin titrations in saline and albumin with haemolytic anaemia. *Brit. J. Haematology* 25:587-595
- 16.- Garraty, G., Petz, L., Hafleigh, E., Howard, J. and Grumet, C. (1978)

- Evaluation of LISS for compatibility testing including a prospective study - comparing saline, albumin and enzyme techniques. *Transfusion* 18(4):648-649
- 17.- Golde, D.W., Mc Ginniss, M.H. and Holland, P.V. (1969) Mechanism of the albumin agglutination phenomenon. *Vox Sanguinis* 16:465-469
- 18.- Golde, D.W., Greipp, P.R. and McGinniss, M.H. (1973) Spectrum of - albumin auto-agglutinins. *Transfusion* 13(1):1-5
- 19.- Goldsmith, K.L.G., Albrey, J., Brummelhuis, H.G.J., Gunson, H.H., - Ikin, E.W., Kekwick, R.A., Metaxas, M., Moore, B.P.L., Yasuda, J.R. Phillips, T.T.B. (1976) A study performed on batches of serum albumin used as diluents in Rh testing. *Brit. J. Haematology* 32:215-224
- 20.- Green dyke, R.M., Banzhaf, J.C., and Inglis J. (1979) A comparison - of six procedures for compatibility testing. *Transfusion* 19(6):782-786
- 21.- Greenwalt, T.J. and Steane, E.A. (1973) Relationship of sialic acid - content of red cells and aggregation by polybrene, protamine and poly-L- lisine. *Brit. J. Haematology* 25:227-237
- 22.- Grove-Rasmussen, M. and Soutter, L. (1953) The necessity for adding - albumin to serum in crossmatching. *N. England J. Med.* 248(4):149-151
- 23.- Haffleigh, E.B., Svoboda, R.K. and Grumet, F.C. (1978) LISS technique without RT phase: extensive transfusion service experience. *Transfusion* - 18(4):649
- 24.- Haigh, T.J. and Fairham, S.A. (1980) Advantages of LISS techniques in - blood bank management. *Med. Lab. Sci.* 37:119-125
- 25.- Harvey, M.F., Smith, T.R., Pineda, A.A. and Taswell, H.F. (1978) Study

- of weak A and B subgroups utilizing LISS-enzyme-antiglobulin test. -
Transfusion 18(4):650
- 26.- Haynes, C. and Chaplin, H. Jr. (1971) An enhancing effect of albumin on the determination of cold hemagglutinins. Vox Sanguinis 20:46-54
- 27.- Heaton, D.C. and Mc Loughlin (1982) Jk(a-b-) red blood cells resist urea lysis. Transfusion 22(1):70-71
- 28.- Herron, R. and Smith, D.S. (1978) Use of LISS in compatibility testing. J. Clin. Pathol. 31(11):1116-1117
- 29.- Hink, J.H. and Johnson, F.F. (1951) The stabilization of albumin during the ultraviolet irradiation of plasma. J. Am. Pharm. Association - 40(11):537-542
- 30.- Hoyer, L.W. and Trabold, N.C. (1970) The significance of erythrocyte - antigen site density. J. Clin. Investigation 49:87-95
- 31.- Hughes-Jones, N.C. (1963) Nature of the reaction between antigen and - antibody. Brit. Med. Bulletin 19(3):171-177
- 32.- Hughes-Jones, N.C., Gardner, B. and Telford, R. (1963) Studies on the reaction between the blood-group antibody anti-D and erythrocytes. - Biochem. J. 88:435-440
- 33.- Hughes-Jones, N.C., Gardner, B. and Telford, R. (1964) The effect of pH and ionic strength on the reaction between anti-D and erythrocytes. - Immunology 7:72-80
- 34.- Hughes-Jones, N.C., Polley, M.J., Telford, R., Gardner, B. and - Kleinschmidt, G. (1964) Optimal conditions for detecting blood group -

- antibodies by the antiglobulin test. *Vox Sanguinis* 9:385-395
- 35.- Hughes-Jones, N.C. (1975) Red cell antigens, antibodies and their -
interaction. *Clin. in Hematology*. 4(1):29-43
- 36.- Inglis, G. and Sheridan, R. (1978) A study on the erythrocyte aggregating
properties of polybrene and protamine sulphate. *Transfusion* 18(1):84-88
- 37.- Jørgensen, J., Nielsen, M., Nielsen, C.B. and Nørmark, J. (1980) The
influence of the ionic strength, albumin and incubation time on the -
sensitivity of the indirect Coombs' test. *Vox Sanguinis* 36:186-191
- 38.- Karush, F. (1962) Immunologic specificity and molecular structure. *Adv.*
Immunol. 2:1-40
- 39.- Lalezari, P. and Spaet, T.H. (1961) Antiheparin and hemagglutinating -
activities of polybrene. *J. Lab. Clin. Med.* 57(6):868-873
- 40.- Lalezari, P. (1967) A polybrene method for the detection of red cell -
antibodies. *Fed. Proc.* 26:756
- 41.- Lalezari, P. (1968) A new method for the detection of red blood cell -
antibodies. *Transfusion* 8(6):372-380
- 42.- Lalezari, P. and Oberhardt, B. (1971) Temperature gradient dissociation
of red cell antigen-antibody complexes in the polybrene technique. *Brit.*
J. of Haematology 21:131-146
- 43.- Lalezari, P. and Jiang, A.F. (1980) The manual polybrene test: a -
simple and rapid procedure for detection of red cell antibodies. *Transfusion*
20(2):206-211
- 44.- Langley, J.W., McMahan, M. and Smith, N. (1980) A nine month -

- transfusion service experience with low ionic strength saline solution (LISS).
Am. J. Clin. Pathol. 73(1):99-103
- 45.- Leikola, J., Morel, P.A. and Perkins, H.A. (1978) Red cell antibodies and low ionic strength solution: a study with enzyme-linked antiglobulin test. Transfusion 18(4):649-650
- 46.- Leikola, J. and Perkins, H.A. (1980) Red cell antibodies and low ionic strength: a study with enzyme-linked antiglobulin test. Transfusion 20(2): 224-228
- 47.- Lincoln, P.J. and Dodd, B.E. (1978) The use of LISS in elution experiments and in combination with papain-treated cells for the titration of various antibodies, including eluted antibody. Vox Sanguinis 34:221-226
- 48.- Löw, B. and Messeter, L. (1974) Antiglobulin test in low ionic strength salt solution for rapid antibody screening and crossmatching. Vox Sanguinis 26:53-61
- 49.- Lown, J.A.G., Barr, A.L. and Davis, R.E. (1979) Use of low ionic strength saline for crossmatching and antibody screening. J. Clin. Pathology 32:1019-1024
- 50.- Luner, S.J., Sturgeon, P., Szklarek, D. and McQuiston, D.T. (1975) Effects of proteases and neuraminidase on RBC surface charge and agglutination. Vox Sanguinis 28:184-199
- 51.- McPhearson, A.J. (1979) Low ionic strength salt solution (LISS): its effective use in routine compatibility testing. Pathology 11:615-620
- 52.- Meneses, A. (1980) Importancia de las pruebas cruzadas en la detección -

e identificación de las isoaglutininas antieritrocito. Tesis U.N.A.M.

- 53.- Mollison, P.L. and Polley, M. (1964) Uptake of γ -globulin and complement by red cell exposed to serum at low ionic strength. *Nature* 203:535-536
- 54.- Moore, H.C. and Mollison, P.L. (1976) Use of a low-ionic-strength medium in manual test for antibody detection. *Transfusion* 16(4):291-296
- 55.- Myers, R.J. and Jones, P.D. (1979) Low ionic-strength salt solution (LISS). *Med. Lab. Science* 36:302-303
- 56.- Olesen, H. (1966) Thermodynamics of the cold agglutinin reaction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18(1):1-15
- 57.- Pollack, W. (1965) Some physicochemical aspects of hemagglutination. *Ann. N.Y. Acad. Sciences* 127:892-900
- 58.- Pollack, W. and Reckel, R.P. (1970) The zeta potential and hemagglutination with Rh antibodies. *Int. Arch. Allergy* 38:482-496
- 59.- Pollack, W. and Reckel, R.P. (1977) A reappraisal of the forces involved in hemagglutination. *Int. Arch. Allergy appl. Immun.* 54:29-42
- 60.- Rapp, H.S. and Borsos, T. (1963) Effects of low ionic strength on immune hemolysis. *J. Immunology* 91:826-832
- 61.- Reckel, R.P. and Harris, J. (1978) The unique characteristics of covalently polymerized bovine serum albumin solutions when used as antibody detection media. *Transfusion* 18(4):397-406
- 62.- Rock, G., Baxter, A., Charron, M. and Jhaveri, J. (1978) LISS, an effective way to increase blood utilization. *Transfusion* 18(2):228-232

- 63.- Rosenfield, R.E., Bar-Shany, S., Rubinstein, P. and Kochwa, S. (1967) Specific hemagglutination induced by adjustment of ionic concentration and pH. *Fed. Proc.* 26:579
- 64.- Rosenfield, R.E. (1978) Low ionic incubation and polycation aggregation (LIP) to augment hemagglutination in test tubes. *Transfusion* 18(4):649
- 65.- Ross, H.M. and Ducie, P. (1978) Introduction of low ionic strength salt solution into a district blood transfusion laboratory. *Med. Lab. Sciences* 35:147-153
- 66.- Rouger, Ph., Hertel, F., Andreu, G., Cartron, J. et Salmon, Ch. (1980) Étude critique du test de Coombs à basses force ionique. *Rev. Franc. Transf. et Immuno-hématologie* 23(1):7-16
- 67.- Rubini, J.R., Stahmann, M.A. and Rasmussen, A.F. (1951) Agglutination of red cells by synthetic lysine polypeptides. *Proc. Soc. Expr. Biol. & Med.* 76:659-622
- 68.- Silvergleid, A.J. (1980) Evaluation of a low-ionic-strength solution monospecific anti-IgG antiglobulin technique for donor antibody screening. *Transfusion* 20(6):729-732
- 69.- Stratton, F. and Rawlinson, V.I. (1965) Interaction between human serum complement and normal red cells at low ionic strength. *Nature* 207:305-306
- 70.- Stratton, F., Rawlinson, V.I., Gunson, H.H. and Phillips, P.K. (1973) The role of zeta potential in Rh agglutination. *Vox Sanguinis* 24:273-279
- 71.- Tönder, O. (1967) Studies on agglutination by macromolecular antibodies *Vox. Sanguinis* 12:241-251

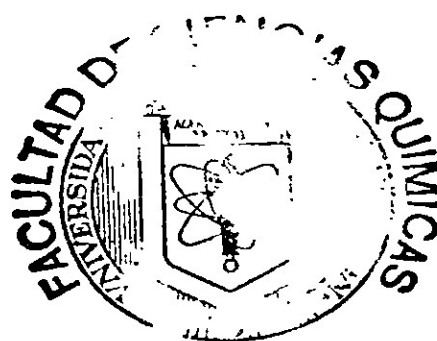
- 72.- Vader, H.L., Geuskens, L.M. and Vink, C.L.J. (1977) Influence of ions on the antigen-antibody complex formation as measured by radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* 80:361-372
- 73.- van Oss, C.J. and Neumann, A.W. (1977) Comparison between antigen-antibody binding energies and interfacial free energies. *Imm. Comm.* 6(4):341-354
- 74.- van Oss, C.J., Mohn, J.F. and Cunningham, R.K. (1978) Influence of various physicochemical factors on hemagglutination. *Vox Sanguinis* 34:351-361
- 75.- van Oss, C.J., Absolom, D.R., Grossberg, A.L. and Neumann, A.W. (1979) Repulsive van der Waals forces. I Complete dissociation of antigen antibody complexes by means of negative van der Waals forces. *Imm. Comm.* 8(1):11-29
- 76.- Voak, D. and Downie, D.M. (1974) The sensitivity of Rh-anti-Rh system to ordered water of hydration. *Immunology* 26:673-675
- 77.- Voak, D., Cawley, J.C., Emmines, J.P. and Barker, C.R. (1974) The role of enzymes and albumen in haemagglutination reactions. *Vox Sanguinis* 27:156-170
- 78.- Voak, D., Downie, D.M., Darnborough, J., Haigh, T., and Fairham, A. (1980) Low ionic strength media for rapid antibody detection: optimum conditions and quality control. *Med. Lab. Sciences* 37:107-118
- 79.- Wardlaw, A.C. and Walker, H.G. (1963) The effect of ionic strength on the haemolytic activity of complement. *Immunology* 6:291-300

- 80.- Wicker, B. and Wallas, C.H. (1976) A comparison of a low ionic strength saline medium with routine methods for antibody detection. -
-
Transfusion 16(5):469-472

Obras Generales Consultadas

- I.- Ander, P. y Sonnessa, A.J. (1973) Principios de Química, 1ª ed., Editorial Limusa. México
- II.- Boyd, W.C. (1965) Introduction to Immunochemical Specificity, 1st ed., Interscience Publishers. USA
- III.- Crockford, H.B. and Knight, S.B. (1964) Fundamentals of Physical Chemistry, 2nd ed., Wiley International Ed. USA
- IV.- Dodd, B.E. y Lincoln, P.J. (1976) Inmunología de los grupos sanguíneos. 1ª ed., El Manual Moderno. México
- V.- Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. and Wells, J.V. (1980) Basic & Clinical Immunology, 3rd ed., Lange. USA
- VI.- Glasstone, S. (1970) Tratado de Química Física, 7ª ed., Ed. Aguilar. Madrid
- VII.- Jiménez Vargas, J. y Macarulla, J.M. (1979) Fisicoquímica Fisiológica. 5ª ed., Ed. Interamericana. Madrid
- VIII.- Knight, A.R. (1970) Introductory Physical Chemistry, 1st ed., Prentice - Hall. USA
- IX.- Lehninger, A.L. (1975) Biochemistry, 2nd ed., Worth Publishers Inc. USA
- X.- Mahler, H.R. and Cordes, E.H. (1967) Biological Chemistry. 3rd ed., Harper & Row. Japan
- XI.- Maron, S.H. and Prutton, C.F. (1969) Principles of Physical Chemistry. 4th ed., MacMillan Co. Hong Kong

- XII.- Mollison, P.L. (1979) Blood Transfusion in Clinical Medicine. 6th ed., Blackwell Scientific Publications. Great Britain
- XIII.- Morris, J.G. (1974) A Biologist's Physical Chemistry. 2nd ed., Addison Wesley. Great Britain
- XIV.- Pauling, L. (1965) Química General. 8^a ed., Ed. Aguilar. Madrid
- XV.- Prokop, Otto (1970) Grupos Sanguíneos Humanos. 2^a ed., Editorial Científico Médica. Barcelona
- XVI.- Putnam, F.W. (1975) The Plasma Proteins, Structure, Function and Genetic Control. 2nd ed., vol. I Academic Press. USA
- XVII.- Putnam, F.W. (1977) The Plasma Proteins, Structure, Function and Genetic Control. 2nd ed., vol III Academic Press. USA
- XVIII.-White, A., Handler, P. and Smith, E.L. (1968) Principles of Biochemistry. 4th ed., McGraw Hill. USA
- XIX.- Zmijewski, Ch. (1978) Immunohematology. 3rd ed., Appleton Century - Crofts. USA



DE LICENCIADO EN QUÍMICA
DE LICENCIADO EN FARMACIA
DE LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

