

2:110



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**LA PRUEBA DE LA MANCHA COMO VARIANTE
DE LA REACCION DE COOMBS PARA EL
DIAGNOSTICO DE ANEMIA HEMOLITICA
AUTOINMUNE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

MARIA DEL CARMEN SARABIA LEON

1989

**TESIS CON
PUNTA LE ORG**

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I OBJETIVOS

a) Comparar la sensibilidad de la prueba de la mancha contra la prueba de Coombs tradicional, ante pacientes con diagnóstico confirmado de anemia hemolítica autoinmune.

b) Establecer si es o no posible su utilización en forma rutinaria en el estudio de la citada patología.

c) Determinar la cantidad mínima de anticuerpos por eritrocito necesaria para producir positividad en la prueba de la mancha.

II INTRODUCCION

Las anemias hemolíticas autoinmunes son trastornos hematológicos adquiridos, donde la lisis se debe a la acción de autoanticuerpos dirigidos contra algún antígeno eritrocitario. Para establecer el diagnóstico se necesita: primero, demostrar la presencia de por lo menos tres hallazgos clínicos y/o hematológicos como son anemia, ictericia y reticulocitosis, lo cual es indicativo de hemólisis y, segundo, demostrar la presencia de anticuerpos que recubren a los eritrocitos; para esto último se efectúa la prueba de antiglobulina humana también conocida como prueba de Coombs directa.

Esta prueba se basa en una reacción de hemaglutinación en donde la anti γ globulina humana (suero de Coombs) está dirigida contra los anticuerpos que se encuentran en la superficie de los hematíes. La positividad de la prueba se ve afectada por una serie de variantes, que entre otras se citan: la ubicación y tipo de antígenos, así como el número y clase de anticuerpos involucrados, a este respecto se sabe que el número mínimo de IgG para producir positividad es de 300 moléculas por eritrocito¹. Este hecho explica en parte porqué en algún número de pacientes cuyas pruebas pantalla son sugestivas de anemia hemolítica autoinmune, la prueba de antiglobulina resulta negativa. Otro hecho importante que afecta la interpretación de esta prueba son variantes técnicas como velocidad y tiempo de centrifugación y la más importante la subjetividad de la lectura.

Estas causas han motivado la búsqueda de nuevas variantes metodológicas más sensibles y por lo tanto más certeras en el diagnóstico definitivo de estas entidades clínicas. Dentro de las pruebas, recientemente descrita² y que al parecer se empleo en el pasado en algunas instituciones del sector salud, pero no se encontraron antecedentes bibliográficos, está la prueba de la mancha. La cual sugiere ventajas tales como sensibilidad, estabilidad, simplicidad y de interpretación más objetiva que la tradicional.

Durante el desarrollo de este trabajo se hacen notar los problemas que se presentan en la preparación, ejecución e interpretación de la prueba, así como las ventajas que se obtienen de ella.

III GENERALIDADES

La sangre es un fluido que circula a través del cuerpo de un individuo y entra en contacto con todas las células de su organismo. Entre otras funciones transporta oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos. En esta actividad participan los eritrocitos con la sustancia química más importante que contienen: la hemoglobina.

Si la cantidad de hemoglobina que hay en la sangre circulante disminuye de manera que perturbe el transporte de oxígeno, el proceso se conoce con el nombre de anemia y puede deberse a la falta de la propia hemoglobina y/o de eritrocitos.

Existen varios grupos de anemias que debido a su etiología, se clasifican como sigue:

1. Anemias carenciales, debidas a deficiencias nutricionales.
2. Anemias por falta de producción de eritrocitos (aplásicas).
3. Anemia por pérdida (hemorrágicas).
4. Anemias hemolíticas, debidas a destrucción de los glóbulos rojos por diversas causas.

A este último grupo pertenece la "anemia hemolítica autoinmune" en la cual la lisis de los eritrocitos es ocasionada por el sistema inmune del individuo mismo. Para entender como se lleva a cabo este proceso, y su forma de diagnóstico se revisarán algunos aspectos relacionados con la inmunidad y la anemia hemolítica autoinmune.

IIIa ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Existe una gran cantidad de agentes en el medio ambiente que al entrar en contacto con el organismo pueden provocar una enfermedad. El sistema que protege al individuo en tales casos es el sistema inmune, el cual se divide en dos secciones a saber: los mecanismos naturales de resistencia y el sistema inmune adaptativo. El primero no mejora la resistencia por infecciones repetidas y lo constituyen factores solubles como lisozima y complemento, y factores celulares como fagocitos (neutrófilos)

entre otros. El sistema inmune adaptativo si mejora la resistencia por infecciones repetidas y está constituido por la llamada inmunidad humoral y celular reguladas por linfocitos B y T respectivamente.

A los componentes solubles del sistema inmune se les denomina: inmunidad humoral y a los celulares: inmunidad celular. Las moléculas más importantes de la inmunidad humoral son: los anticuerpos y el complemento. Las inmunoglobulinas o anticuerpos son un grupo de proteínas presentes en el suero y fluidos de tejidos...Su producción es inducida cuando el sistema linfóide del hospedero entra en contacto con moléculas inmunogénicas extrañas (antígeno) y se enlazan específicamente al antígeno que indujo su formación³.

La estructura básica de estas moléculas está constituida por cuatro cadenas de polipeptidos unidas entre si por enlaces disulfuro. Dos de ellas de peso molecular pequeño 25,000 d (cadenas ligeras) y dos de ellas de peso molecular grande 50,000-77,000 d (cadenas pesadas). Las dos cadenas ligeras son idénticas para cada molécula, lo mismo sucede con las cadenas pesadas.

Existen cinco clases de inmunoglobulinas que difieren en tamaño, composición de aminoácidos y contenido de carbohidrato; y son denominadas según la clase de cadena pesada que contengan.

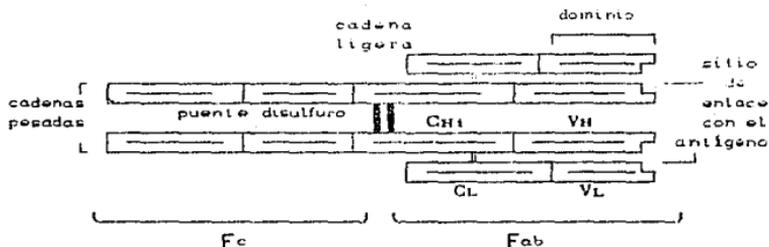
Tipo de cadena	Denominación
γ	Inmunoglobulina G IgG
α	Inmunoglobulina A IgA
μ	Inmunoglobulina M IgM
δ	Inmunoglobulina D IgD
ϵ	Inmunoglobulina E IgE

Por el tamaño de la cadena pesada y el número y colocación de puentes disulfuro las inmunoglobulinas se dividen en varias subclases. Las cadenas están compuestas por una serie de regiones globulares de estructura similar encerradas por puentes disulfuro, cada región constituye un "dominio".

La mitad carboxilo terminal de cada inmunoglobulina es constante y se llaman región C_L y C_H para la cadena ligera y para la pesada respectivamente, mientras que la mitad amino terminal es variable y se llaman región V_L y V_H para la cadena ligera y la pesada respectivamente. A los dominios de las cadenas se les llama región C_{H1} , región C_{H2} , región V_H , etc.

La destrucción enzimática con papaina de las inmunoglobulinas libera dos fragmentos: el Fab (fracción de unión con el antígeno) de 50,000 d y el Fc (fracción cristalizante) del mismo peso. El Fab contiene las cadenas ligeras y parte de las cadenas pesadas mientras que el Fc contiene el resto de las cadenas pesadas.

A continuación se presenta un esquema de la inmunoglobulina.



Las cadenas ligeras pueden ser de dos tipos llamados Kappa(K) y Lamda(λ), ambas cadenas son del mismo tipo en una inmunoglobulina. Las cinco clases de inmunoglobulinas tienen diferentes funciones. Esencialmente cada molécula es bifuncional; a una región de la molécula le concierne el enlace con el antígeno mientras que una región diferente media el enlace a los tejidos del hospedero y al primer componente del complemento...⁴ Además una parte de la región constante controla la velocidad de catabolismo de la molécula, y otra, puede unirse a la proteína A estafilocócica.

La primera función descrita se lleva a cabo en los dominios V_H y V_L , y la segunda en los dominios C_{H2} para IgG y C_{H3} para IgM .

Los anticuerpos reconocen a antígenos específicos. El sitio de reconocimiento se encuentra en una región hipervariable dentro de la región variable.

El complejo antígeno-anticuerpo formado puede iniciar o acelerar ciertos eventos a saber:

Primero. Se acelera la fagocitosis del antígeno porque los anticuerpos llevan a cabo un proceso de opsonización que es la preparación de partículas extrañas para la ingestión por fagocitos⁵.

Segundo. Se activa el complemento. El complemento es un conjunto de al menos 30 proteínas, la mayor parte precursores inactivos de enzimas. Cuando el primer componente C_1 es activado por moléculas de IgM o IgG unidas al antígeno se dispara la activación del complemento por la llamada vía clásica, que es una cascada de reacciones de rompimiento proteolítico y enlace de proteínas con tres consecuencias importantes: a) Los componentes activados atacan la superficie celular extraña y causan su lisis b) El fragmento C_{3b} del componente C_3 interacciona con receptores específicos promoviendo la inmunoadherencia semejante a la opsonización y c) otros fragmentos promueven el desarrollo de una reacción inflamatoria aguda local⁶.

Los eventos anteriores aunados a la inmunidad celular proveen una buena protección en condiciones normales; sin embargo, cuando los antígenos propios son reconocidos como extraños ocurre que el sistema inmune adaptativo se vuelve contra el propio organismo en una forma patológica conocida como autoinmunidad.

Se han postulado varias teorías para explicar la autoinmunidad pero en general se acepta que están involucrados diversos factores: inmunológicos, genéticos, hormonales y virales. Se mencionaran algunos a continuación sin profundizar en ellos.

Factores Inmunológicos. Entre otros se encuentran:

1. Liberación de antígenos secuestrados, los cuales se hallaban ocultos y al aparecer son reconocidos como extraños.
2. Disminución de la actividad de las células T supresoras.
3. Aumento de la actividad de las células T cooperadoras.
4. Actividad polifuncional de células B. Las células T supresoras controlan la respuesta inmune, si estas fallan la actividad de las células T cooperadoras y de las células B que son las productoras de anticuerpos se elevan, aunque esto puede suceder aun sin la falla de las células T supresoras.
5. Defectos de la inducción de tolerancia. La tolerancia es la falla para reaccionar contra una molécula antigénica potencial⁷ y es importante para que el cuerpo pueda tolerar sus propios

tejidos.

6. Deficiencias en la red idiotipo-antiidiotipo.

Factores Genéticos. Se ha demostrado que hay relación entre factores genéticos y la incidencia de padecimientos autoinmunitarios, en especial los que afectan a un solo órgano (organoespecíficos).

Factores Hormonales. Las hormonas sexuales, así como los genes ligados al cromosoma X o al Y pueden influir en la autoinmunidad.

Factores Virales. Los virus pueden actuar sobre el sistema inmunológico promoviendo reacciones autoinmunitarias.

Los mecanismos por los cuales la autoinmunidad daña al individuo son tres:

1. El primer mecanismo es la actividad del autoanticuerpo sobre las estructuras celulares destruyendo el tejido por acción del complemento o por citotoxicidad celular. En algunos casos los anticuerpos dirigidos contra receptores estimulan o inhiben funciones celulares especializadas sin que haya destrucción de la célula.
2. Los complejos autoantígeno-autoanticuerpo se forman en los líquidos intercelulares o en la circulación general y se depositan en tejidos provocando lesión por el complemento o por una reacción inflamatoria.
3. El proceso puede ser causado por linfocitos T sensibilizados a través de un mecanismo que aun no se comprende⁸.

La autoinmunidad es la causa de la lisis de eritrocitos en la anemia hemolítica autoinmune principalmente por el mecanismo descrito como numero 1, en este caso el antígeno forma parte del eritrocito mismo.

IIIb.- ASPECTOS HEMATOLOGICOS.

Las células de la sangre representan una categoría de células libres del tejido conectivo; son de dos tipos: Eritrocitos (células rojas) y Leucocitos (células blancas). Los eritrocitos son discos bicóncavos de 7.2 a 7.9 μ de diámetro, con un volumen de 80-96 μ^3 .

Los eritrocitos tienen una estructura definida, que consiste en una membrana, un citoesqueleto y en el interior transporta entre otras sustancias hemoglobina. El citoesqueleto es una red protéica bidimensional localizada en la superficie interior de la

membrana, compuesta por dos proteínas principales: espectrina y actina; enlazadas a las proteínas ankirina y la proteína 4.1⁹. La proteína 4.1 es responsable de las propiedades de elasticidad del eritrocito¹⁰.

La membrana contiene ácidos grasos, fosfolípidos, ciertas enzimas, proteínas estructurales y proteínas que portan antígenos de grupos sanguíneos. Existen al menos trece sistemas de grupos sanguíneos claramente definidos entre los que se incluyen los sistemas ABO, MNS, P, Rh-Hr, I-i, Jay, Lutheran, etc. Cada uno con características propias y diferentes, en número y ubicación distinta sobre la membrana eritrocítica.

Así, el eritrocito posee estructuras antigénicas capaces de reaccionar con diversos anticuerpos por adsorción (sensibilización), a la que puede seguir o no una agrupación (aglutinación) de los eritrocitos¹¹. La aglutinación se lleva a cabo si la cantidad de anticuerpo y la de antígeno son equivalentes. Si hay exceso de antígeno (postzona) no existe aglutinación. Por supuesto que en un organismo no existen anticuerpos contra sus antígenos de grupo sanguíneo, en condiciones normales.

En las anemias hemolíticas autoinmunes, el individuo produce anticuerpos contra sus antígenos eritrocíticos. Estas anemias son convenientemente clasificadas de acuerdo a las propiedades termales del anticuerpo antieritrocito en cuestión¹² en anemias hemolíticas autoinmunes debidas a anticuerpos calientes y anemias hemolíticas debidas a anticuerpos fríos.

Anemias Hemolíticas Autoinmunes Debidas a Anticuerpos Calientes

Los signos más comunes son esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatías, etc. y los síntomas son debilidad, mareos, fiebre, ictericia, entre otros. Este padecimiento puede ser de dos tipos, a saber: Primario o idiopático, y secundario asociado a lupus eritematoso sistémico, leucemia linfocítica crónica, linfomas, tumores, infecciones virales, y otras enfermedades autoinmunes o inmunodeficientes.

Los anticuerpos en este caso se enlazan más avidamente a las células a 37°C, son generalmente IgG y pocas veces pueden ser IgM o IgA. Pueden estar dirigidos contra antígenos de grupo sanguíneo

con gran frecuencia del sistema Rh, pero también contra los del sistema P y otros sistemas, contra la proteína 4.1¹³ y otras proteínas. También se han encontrado asociados con otros autoanticuerpos por ejemplo contra eritroblastos¹⁴.

Estos anticuerpos aumentan el secuestro de eritrocitos por el bazo y la lisis por activación del complemento no es extensa.

Anemias Hemolíticas Autoinmunes debidas a Anticuerpos Frios

Existen dos sindromes ocasionados por anticuerpos frios: el síndrome de aglutinina fría que se asocia a enfermedades infecciosas en especial por *Mycoplasma pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* y otros. Y la hemoglobinuria paroxística fría debida a hemolisinas y asociada a sífilis congénita o adquirida.

Los anticuerpos son IgM, aunque algunos raros casos son IgA e IgG. La mayoría tiene especificidad contra el antígeno de grupo sanguíneo I, aunque también puede haber contra el antígeno i, o el P.

Estos anticuerpos son más eficientes a temperaturas menores de 32°C, promueven la destrucción celular por acción del complemento o su secuestro por el hígado. Algunos IgM no fijan complemento¹⁵.

Hay otros tipos de anemias hemolíticas autoinmunes, las inducidas por fármacos, que son clínicamente indistinguibles de las anteriores. Existen cinco tipos de anemias inducidas por fármacos.

1. Hapteno tipo penicilina. Donde la penicilina se une a la célula e induce la formación de anticuerpos contra el fármaco, los anticuerpos son IgG y no activan complemento.
2. Hapteno tipo estreptomycin. Sucede lo mismo que el anterior, pero en este caso hay activación de complemento.
3. Tipo alfa-metildopa. Donde el fármaco probablemente inhibe a las células T supresoras y hay síntesis de anticuerpos anti-Rh, son IgG y no activan complemento.
4. Tipo espectador-inocente (estibofen). El complejo antígeno-anticuerpo se forma en la circulación y una parte es absorbida por el eritrocito, los anticuerpos son frios y activan complemento¹⁶.
5. Tipo carbimazol. La droga se fija al eritrocito y forma una

estructura nueva con los antígenos eritrocíticos contra la cual son dirigidos los anticuerpos. Hay fijación de complemento¹⁷.

Cuando la presencia de los signos y síntomas ya mencionados sugiere un desorden hematológico, los datos de laboratorio que hacen sospechar que se trata de un padecimiento hemolítico son los siguientes:

1. Anemia de etiología no obvia, baja cuenta de eritrocitos y baja concentración de hemoglobina.
2. Reticulocitosis. Los reticulocitos reflejan la actividad eritropoyética, valores mayores al 8 % (8×10^{10} células/litro) implican que hay una gran producción de eritrocitos.
3. Hiperbilirrubinemia. La bilirrubina proviene de la degradación de la hemoglobina, valores mayores de $13.7 \mu \text{ mol/litro}$ indican una alta velocidad de hemólisis.

Si el frotis de sangre del paciente no muestra anomalías morfológicas de los eritrocitos que puedan sugerir la causa de la hemólisis, entonces, puede pensarse en un padecimiento autoinmune.

Para confirmar el diagnóstico, se debe demostrar que existen anticuerpos y/o moléculas de complemento unidas a los eritrocitos, o anticuerpos en el suero del paciente dirigidos contra antígenos de sus eritrocitos. Estos anticuerpos generalmente no aglutinan por sí mismos a los eritrocitos (anticuerpos incompletos) por lo cual se utilizan las siguientes técnicas para demostrarlos.

Demostración de Anticuerpos sobre el Eritrocito

1. Prueba con albúmina. Los eritrocitos se suspenden en suero O normal más 20% de albúmina, ésta disminuye la repulsión debida a las cargas (potencial Z) y permite la aglutinación si las células están altamente sensibilizadas.

2. Prueba en medio con baja fuerza iónica. La suspensión se realiza en medio con baja fuerza iónica lo cual aumenta la sensibilización de los eritrocitos y reduce el tiempo de reacción.
3. Prueba directa de antiglobulina. Es de rutina y se basa en la reacción de Coombs. A una suspensión de eritrocitos sensibilizados se les agrega un suero con anticuerpos antigammaglobulina humana (suero de Coombs), los cuales se unen a los anticuerpos que están fijados a los eritrocitos provocando aglutinación. El uso de soluciones de baja fuerza iónica o que contengan policationes que bajen la fuerza iónica parece incrementar la sensibilidad de esta prueba¹⁸.
4. Prueba de antiglobulina unida a enzima. Los anticuerpos antigammaglobulina humana se encuentran conjugados con fosfatasa alcalina, la cual actúa sobre paranitrofenolfosfato. Es de alta sensibilidad pero lleva mucho tiempo realizarla¹⁹.
5. Prueba de la Mancha. Los anticuerpos antigammaglobulina se fijan a un papel de nitrocelulosa, si los eritrocitos están sensibilizados se unen a la antiglobulina humana en el papel formando una mancha roja²⁰. Más adelante se profundizará en esta prueba.

Demostración de Anticuerpos en el Suero

1. Prueba con eritrocitos tratados con enzimas. Eritrocitos normales son tratados con enzimas, con lo cual se exponen más sitios antigénicos y se baja el potencial Z, después se adiciona suero, si éste contiene anticuerpos contra antígenos eritrocitarios se lleva a cabo una aglutinación.
2. Prueba de antiglobulina indirecta. Eritrocitos normales se incuban con suero del paciente, después se tratan con antiglobulina humana como en la prueba directa. Si la incubación se realiza en presencia de polietilenglicol se puede aumentar la sensibilidad²¹.
3. Prueba de la antiglobulina en fase sólida. Después de tratar las células como en la prueba anterior, se colocan en un pozo de poliestireno recubierto con IgG humana, si la antigammaglobulina humana está unida a las células éstas se pegan en las paredes del pozo, sino caen formando un botón²².

Cuando se ha confirmado que se tiene anemia hemolítica autoinmune , se procede al tratamiento. Para esto se ha utilizado principalmente inmunosupresores como la ciclofosfamida; o gammaglobulina dirigida contra linfocitos. Recientemente se ha sugerido el uso de gammaglobulina humana no específica intravenosa, lo cual tiene como ventajas el incremento rápido del nivel de hemoglobina y que las crisis hemolíticas pueden tardar hasta cuatro años en volverse a presentar²³; actúa bloqueando los receptores Fc de las células reticuloendoteliales y baja la producción de autoanticuerpos²⁴. En el caso de anemias inducidas por fármacos o asociados a infecciones hay que eliminar el agente causal.

IV MATERIAL Y METODOS

Se utilizarán dos métodos para detectar anticuerpos humanos unidos a eritrocitos: la prueba directa de antiglobulina realizada en tubo, y la prueba de la mancha sobre papel de nitrocelulosa. Ambas coinciden en la preparación de la muestra. En general los pasos son los siguientes:

Los eritrocitos problema son lavados con solución salina isotónica y con solución de glicina para eliminar los anticuerpos no unidos y permitir un acercamiento mayor entre ellos. Una vez eliminada la última solución de lavado, con una gota del paquete globular se prepara una suspensión y con ella se realiza la prueba directa de antiglobulina; por otro lado, con otra gota se realiza la prueba de la mancha.

No se menciona aquí el material de vidrio y equipo que se utiliza, sino solo los reactivos que son fundamentales en el desarrollo de las pruebas.

Las muestras biológicas provienen de pacientes con diagnóstico de anemia hemolítica autoinmune y otras etiologías, tomadas con las técnicas comunes de venopunción y con anticoagulante. Se obtuvieron del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional.

IVa REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Papel de Nitrocelulosa BIO-RAD poro de $\approx 0.45\mu$
- Glicina Q.P. MERCK
- NaCl Q.P. MERCK
- TRIS Hidroximetilaminometano MERCK
- Leche Sveltes NESTLE
- Albúmina bovina polimerizada ORTHO
- Suero de Coombs (antihumano) BIOXON/ORBI
- Suero hemoclasificador anti Rho (anti D) ORTHO

- Solución salina isotónica.- solución de NaCl al 0.85% en agua destilada.
- Amortiguador de glicina.- solución de glicina al 1.9% con pH 7.0

- Amortiguador TRIS-HCl 18 mmolar a pH 7.5 con NaCl 135mmolar.
- Solución TRIS-Albúmina.- Amortiguador TRIS-Salino con Albúmina sérica bovina 0.9 mg/ml. Lo anterior corresponde a 0.5 ml de albúmina bovina polimerizada para 100 ml de solución.
- Solución de anticuerpos antigammaglobulina humana.- Dilución 1:10 del suero de Coombs BIOXON en solución TRIS-Albúmina.
- Solución bloqueadora.- Solución de Leche Suetes al 1% en amortiguador TRIS-salino.

IVb PROCEDIMIENTO

- 1-Preparación de la Nitrocelulosa para la Prueba de la Mancha.-El manejo de la nitrocelulosa se hace con pinzas, se debe evitar en todo momento que tenga contacto con algún lípido ya que éste se fijaría a la superficie e impediría la interacción de la nitrocelulosa con las proteínas.
 - Cortar cuadros de nitrocelulosa de 5 cm² rallarlos con lápiz en cuadros de 1cm².
 - Humedecer los cuadros perfectamente con agua destilada. Las partes que no se logren humedecer se desechan.
 - Secar perfectamente. A temperatura ambiente por lo menos 2 horas, si se utiliza calor o vacío se necesita menos tiempo. En este momento se puede interrumpir el procedimiento y los cuadros ya secos se guardan alejados de la humedad.
 - Aplicar una gota de 10 µl de solución de anticuerpos antigammaglobulina humana en el centro de cada cuadro de 1cm². Realizar esta operación con rapidez para evitar el corrimiento de la gota hacia los cuadros vecinos ya húmedos.
 - Dejar secar los cuadros a 37°C por 30 minutos.
 - Colocar el cuadro completo de 5 cm² en una caja petri de 65 mm de diámetro y cubrir con 30 ml de solución bloqueadora.
 - Incubar a temperatura ambiente con la solución bloqueadora por 30 min. con agitación.
 - Eliminar la solución bloqueadora y colocar el cuadro en los bordes de una caja pequeña adentro de un desecador. Si la nitrocelulosa queda colocada sobre una superficie plana, se pega al secar y puede romperse al intentar moverla.
 - Cortar el cuadro ya seco en tiras de 5 cm. de largo por 1 cm. de ancho y guardar las tiras en un desecador. La prueba de la

Mancha se realiza sobre cada cuadro de 1 cm², por lo tanto, al llevarla a cabo se corta el número de cuadros necesarios según el número de muestras.

2-Preparación de las Muestras.

- Obtener muestras de sangre tomadas con anticoagulante.
- Eliminar el plasma y lavar el paquete globular dos veces con solución salina isotónica y dos veces con amortiguador de glicina.
- Eliminar completamente el sobrenadante del último lavado.

3-Prueba Directa de Antiglobulina

- Preparar una suspensión al 4% del paquete globular del último lavado con solución salina isotónica.
- Colocar en un tubo de ensaye de 12 x 75 mm. una gota de suspensión de eritrocitos y una gota de suero de Coombs.
- Agitar y centrifugar a 3500 rpm por 15 seg.
- Leer los tubos agitando suavemente hasta desprender el botón del fondo del tubo. La presencia de aglutinación indica que la prueba es positiva.

4-Prueba de la Mancha

- Colocar una gota de solución TRIS-Albúmina en el cuadro de nitrocelulosa y permitir que se humecte perfectamente.
- Eliminar el exceso de líquido con un papel secante hasta que la superficie del papel se muestre opaca.
- Colocar una gota pequeña del paquete globular del último lavado.
- Incubar 5 min. a temperatura ambiente.
- Tomar el cuadro por una esquina y sumergirlo en un recipiente con solución salina isotónica, lavarlo moviéndolo hacia los lados hasta eliminar los eritrocitos que no están fijados a los anticuerpos sobre el papel.
- Sacar el papel de la solución salina y observar. La presencia de una mancha redonda indica que la prueba es positiva.

5-Preparación del Control Positivo.

- Tomar una muestra de sangre tipo Rh positivo con anticoagulante.
- Eliminar el plasma y lavar el paquete globular tres veces con solución salina isotónica.
- Preparar una suspensión de eritrocitos al 4% con solución salina isotónica.

-Mezclar 2ml. de suspensión de eritrocitos con 2ml. de suero hemoclasificador anti-D diluido 1:16 con solución salina isotónica.

-Incubar 30 min. a 37°C.

6-Determinación del límite de positividad de la Prueba de la Mancha.

-Preparar diluciones seriadas con el suero hemoclasificador anti D a partir de 1:32 hasta 1:32,768 en solución salina isotónica.

-En la serie de tubos de 12 x 75 mm. se pone 2ml. de una suspensión de glóbulos rojos R₁R₁ (cuyo número de determinantes antigénicos es de 14,500-19,300²⁵) al 4% y 2ml. de la dilución correspondiente.

-Incubar por 30 min. a 37°C todos los tubos.

-Centrifugar los tubos y eliminar el sobrenadante. Lavar el paquete globular dos veces con solución salina isotónica y dos veces con glicina.

-Realizar la prueba directa de antiglobulina y la Prueba de la Mancha a cada uno.

-Determinar la concentración de glóbulos rojos en la suspensión utilizada por conteo en cámara de Neubauer.

-La cantidad de anticuerpos por glóbulo rojo se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Concentración de anticuerpos } \mu\text{g/ml}}{\text{Peso molecular de IgG } \mu\text{g/mol}} \left[\text{ml en el tubo} \right] = \text{moles de anti D en el tubo}$$

$$\left[\text{moles de anti D en el tubo} \right] \left[\text{No. de Avogadro} \right] = \text{moléculas de anti-D en el tubo}$$

$$\frac{\text{moléculas de anti-D en el tubo}}{\text{eritrocitos en el tubo}} = \text{moléculas de anti-D/eritrocitos}$$

-Realizar el mismo procedimiento por duplicado.

V RESULTADOS

Esta sección comprende, lo referente al límite de positividad de la prueba de la mancha; después, se presentan los resultados de emplear ambos métodos en muestras de pacientes para el diagnóstico de anemia hemolítica autoinmune.

Va LIMITE DE POSITIVIDAD DE LA PRUEBA DE LA MANCHA

Se realizó lo siguiente: eritrocitos O Rh⁺ sensibilizados con diferentes diluciones de suero anti D se lavaron y se aplicó con ellos la prueba directa de antiglobulina (PDA) y la prueba de la mancha (PdM). Además se determinó la concentración de eritrocitos en la suspensión. Se obtuvo lo siguiente:

	Determinación 1	Determinación 2
Dilución límite en la cual se observa positividad de la PDA	1:2048	1:2048
Dilución límite en la cual se observa positividad de la PdM	1:16384	1:16384
Concentración de eritrocitos en la suspensión (células/mm ³)	305,830	315,830

Como se mencionó en la sección anterior, para calcular el número de moléculas por glóbulo rojo se utiliza la siguiente ecuación²⁶:

$$\frac{\text{moléculas}}{\text{glóbulo rojo}} = \frac{C(\text{g/ml})}{\text{dil}} \times \frac{N \text{ de A}}{PM} \times \frac{\text{ml}}{\text{GR por tubo}}$$

donde:

C = Concentración en g/ml de anticuerpos anti D en el suero utilizado.

dil = dilución

N de A = número de Avogadro = 6.023×10^{23} molec/mol

PM = peso molecular de IgG = 1.5×10^5 g/mol

ml = mililitros de dilución en el tubo = 2

GR por tubo = glóbulos rojos en el tubo, correspondientes a 2ml de la suspensión de eritrocitos.

Sustituyendo los valores en la fórmula anterior tenemos que para las determinaciones realizadas se obtiene:

$$\frac{\text{moléculas}}{\text{glóbulo rojo}} = \frac{C(\text{g/ml})}{\text{dil}} \times K$$

donde:

para la determinación 1 $K = 1.3129 \times 10^{10}$

para la determinación 2 $K = 1.2713 \times 10^{10}$

El costo de la ampoyeta comercial que tiene una concentración conocida de anticuerpos anti-D (Rho Gam) en el momento de realización del trabajo es muy elevado. Debido a esto se prefirió utilizar el suero hemoclasificador anti-D para determinar, en forma aproximada, el límite de positividad de la prueba de la Mancha.

Por esta causa era necesario la determinación de la concentración de anticuerpos en el suero. Lo anterior se intentó hacer por valoración de las proteínas totales seguido de electroforesis de proteínas.

Sin embargo la cantidad de gammaglobulina presente en el suero es muy pequeña y no pudo ser detectada en la electroforesis. En vista de lo anterior se realizó un cálculo de concentración basado en los resultados de la prueba directa de antiglobulina. El procedimiento es el siguiente:

Si el límite de detección para la prueba directa de antiglobulina es de 300 a 400 molec/glóbulo rojo, de la fórmula anterior se tiene que:

$$400 = \frac{C(\text{g/ml})}{\text{dil}} \times K$$

$$C(\text{g/ml}) = \frac{400 \times \text{dil}}{K}$$

La dilución límite para la prueba de antiglobulina fue 1:2048, sustituyendo dil por 2048 y utilizando las K respectivas se obtiene:

Determinación	Valor de C(g/ml)
1	6.2396×10^{-5}
2	6.4435×10^{-5}

Con estos valores y tomando como dilución límite para la prueba de la mancha 1:16384 se calcula el número de moléculas por glóbulo rojo mínimos necesarios para obtener una prueba positiva y corresponde a:

Determinación	moléculas/globulo rojo
1	50,000
2	49,999

Por lo tanto, el límite de positividad para la prueba de la mancha correspondería a un valor cercano a 50 moléculas por glóbulo rojo, calculado del modo anterior.

Lamentablemente, no es posible asegurar rotundamente que el valor anterior es exacto, ya que para esto sería necesaria la determinación directa de la concentración de anticuerpos en el suero utilizado, o disponer de un suero con anticuerpos anti-D de concentración conocida.

Lo que se obtiene de los resultados de dilución límite en que se observa positividad, es que la prueba de la mancha es 8 veces mas sensible que la prueba directa de antiglobulina en base a diluciones de lo cual se podría suponer que los límites de detección para la prueba de la mancha corresponderían a 38-50 molec/globulo rojo.

Sin embargo, a este respecto hay algun trabajo por realizar por ejemplo, para corroborar este dato es necesario emplear una tercera prueba de mayor sensibilidad como lo es la prueba de antiglobulina humana unida a enzima.

Vb RESULTADOS CON MUESTRAS DE PACIENTES

Se aplicaron ambas pruebas sobre muestras de pacientes con desordenes hematológicos, los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Diagnóstico	PDA (+) PdM (+)	PDA (-) PdM (+)	PDA (+) PdM (-)	PDA (-) PdM (-)	sub total
Anemia Hemolítica Autoinmune	32	6		4	42
Anemia ferropénica		3		21	24
Anemia megaloblástica		1			1
Leucemia Linfocítica Aguda				1	1
Leucemia Linfocítica Crónica	1	2			3
Politransfusión		1			1
H P N		1			1
Sin diagnóstico	1 [.]	1 ^o	1 ^x	2 ^o	5
Subtotal	34	15	1	28	
Total					78

HPN = Hemoglobinuria paroxística nocturna

(+) = Resultado positivo

(-) = Resultado negativo

. = Probable Lupus eritematoso sistémico

x = Esferocitosis

o = Anemia hemolítica sugerida por la biometría hemática

PDA = Prueba directa de antiglobulina

PdM = Prueba de la Mancha

Los resultados de ambas pruebas coinciden en 62 casos de los 78 casos probados, de estos 34 son positivos en ambos y 28 negativos. De estos números se puede observar que hay concordancia entre los métodos, pero su valor estadístico se dará más adelante.

De los resultados donde no concuerdan, se tiene 15 casos donde la prueba de la mancha fue positiva y la prueba directa de antiglobulina negativa y solo un caso en la forma inversa. Este último corresponde a un paciente con anemia hemolítica que presentaba esferocitos en el frotis.

Utilizando solo los datos obtenidos de aplicar las pruebas a pacientes cuyo diagnóstico previo era anemia hemolítica autoinmune se pueden calcular índices de asociación o concordancia que expresen numericamente el grado en que conciden los resultados de ambas pruebas.

Los resultados son:

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS	PDA (+) PdM (+)	PDA (-) PdM (+)	PDA (+) PdM (-)	PDA (-) PdM (-)
NUMERO DE PACIENTES	32	6	0	4
TOTAL	42			

La concordancia²⁷ entre la prueba significa que los resultados obtenidos con una de ellas pueden volverse a obtener si se utiliza la otra. El indice de concordancia absoluta es la proporción de resultados semejantes reportados por ambas pruebas y es una medida de la variabilidad que hay entre ellas.

En este caso:

Indice de concordancia absoluta = $(32 + 4) / 42 = 0.85$ o sea que el acuerdo absoluto entre ambas pruebas es del 85%

El coeficiente kappa K^{28} determina la fuerza de la concordancia entre ambas pruebas y se calcula como:

$$K = \frac{P_o - P_c}{1 - P_c} \text{ donde}$$

$P_c = [(a+b)/n] \times [(a+c)/n] + [(b+d)/n] \times [(c+d)/n]$ y corresponde a la proporción de concordancia esperada producida por el azar.

$P_o = (a+d)/n$ y corresponde a la proporción de concordancia observada.

a, b, c, d, n son los números correspondientes a las casillas del cuadro siguiente:

		PDA			
		Resultado Positivo	Resultado Negativo	Suma	
PdM	Resultado Positivo	32	a b 6	38	
	Resultado Negativo	0	c d 4	4	
	Suma	32	10	42	$\frac{n}{\text{total}}$

Calculado se tiene

$$P_c = 0.70$$

$$P_o = 0.85$$

$$K = \frac{0.85 - 0.7}{1 - 0.7} = 0.5$$

El cual según la interpretación siguiente, indica que existe una fuerza de concordancia moderada entre ambas pruebas.

Interpretación de los valores de Kappa cuando son positivos	
Valor de Kappa	Fuerza de concordancia
0	Pobre
0-0.20	Leve
0.21-0.40	Mediano
0.41-0.60	Moderado
0.61-0.80	Substancial
0.81-1.00	Casi perfecto

Dada la concordancia existente entre ambas pruebas es de interes también saber, qué probabilidad se tiene de que al probar una determinada muestra los resultados de ambas coincidan.

Para esto, se utiliza la prueba binomial²⁹ que se calcula de la siguiente forma:

1. A cada caso (x) se le asigna un valor de 1 o 0 si ocurre que:

los resultados de ambas pruebas coinciden $x = 1$

los resultados de ambas pruebas difieren $x = 0$

La suma de todos los casos es $Y = 36$ y tiene una distribución binomial de $n = 42$ y probabilidad P . Donde n es el total de casos utilizados para la prueba.

2. Se plantea la hipótesis nula: "La probabilidad de que los resultados de la prueba coincidan para una muestra dada es mayor o igual a P^* " y se expresa $H_0 = P \geq P^*$ con una hipótesis alternativa expresada $H_a = P < P^*$.

P^* es un valor de probabilidad asignado según la probabilidad que se desee tener.

Si la hipótesis no se rechaza se puede asegurar que los resultados tienen una probabilidad de coincidencia igual o mayor a P^* .

3. La hipótesis es rechazada si Y es menor al valor K obtenido por la ecuación:

$$K = nP^* + (Z_{\alpha}) \sqrt{nP^* (1 - P^*)}$$

donde:

Z_{α} es el cuantil de orden α de una distribución normal de media cero y varianza 1 y α es el nivel de significancia de la prueba o sea la cantidad que uno se permite equivocarse en la

prueba.

para una $\alpha = 0.05$, $Z_{\alpha} = -1.64$

Calculando K para una P^* de 0.90 se tiene:

$$P^* = 0.90 \qquad \alpha = 0.05$$
$$K = 42(0.90) + (-1.64)\sqrt{42(0.90)(0.10)} = 34.61$$

Como $Y = 36$ es mayor a $K = 34.61$ no se rechaza H_0 y por tanto la probabilidad de coincidencia es mayor o igual a 0.90

Si se realiza este calculo para valores diferentes de P^* se obtiene que la probabilidad de coincidencia máxima de los resultados de ambos métodos es 0.92 para $\alpha = 0.05$ y en base a los datos de las pruebas realizadas sobre pacientes con diagnóstico previo de anemia hemolítica autoinmune.

Es necesario señalar que aunque estos cálculos indican que prácticamente se puede obtener el mismo diagnóstico utilizando cualquiera de las dos pruebas, esto no es lo que se espera si se asume que la prueba de la mancha es más sensible que la prueba directa de antiglobulina.

VI DISCUSION

Via Preparación de los Reactivos para la Prueba de la Mancha

1.- Acerca de la Nitrocelulosa.

El papel de nitrocelulosa es la base para diversas técnicas en las que uno de los pasos incluye la fijación de moléculas a su superficie.

El mecanismo por el cual las moléculas se absorben a la matriz del papel de nitrocelulosa no se conoce, pero se sabe que se lleva a cabo por interacciones químicas y que las moléculas no quedan atrapadas como si estuvieran en un tamiz. Se cree, que los efectos hidrofóbicos son importantes y que los glicolípidos se unen directamente por su fragmento lípido³⁰.

En la prueba de la mancha los anticuerpos goteados sobre el papel se fijan a él. A este respecto, vale la pena hacer notar que la cantidad de proteína que se fija a la nitrocelulosa depende de la composición de la misma.

En el trabajo experimental se usaron tres tipos de papel para llevar a cabo la prueba de la mancha. Se probaron acetato de celulosa, papel de nitrocelulosa marca Millipore y papel de nitrocelulosa marca BIO-RAD.

Con los tres se siguió todo el procedimiento descrito en la preparación de la nitrocelulosa y se probaron con controles positivos (eritrocitos sensibilizados). Con los tres se realizó lo siguiente: después de colocar la gota de anticuerpos e incubar, se tñieron los papeles con colorante negro de Amido para las proteínas fijas al papel.

Después de realizar la prueba de la mancha con los controles positivos se observó que el acetato de celulosa no mostraba mancha, mientras que ambas nitrocelulosas sí lo hacían, pero la mancha era más intensa en la BIO-RAD que en la Millipore.

Con respecto a los papeles teñidos, se observó que la mancha en el acetato de celulosa tenía un diámetro grande y la zona central pálida. En los papeles de nitrocelulosa la mancha era regular, pero otra vez fue más intensa en el de marca BIO-RAD.

Los resultados anteriores se deben a la capacidad de fijación de proteínas del material utilizado. El acetato de celulosa fija $1-5\mu\text{g}$ de proteína/ cm^2 mientras que la nitrocelulosa pura fija $80-100\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La nitrocelulosa Millipore contiene algo de acetato de celulosa y eso provoca que su capacidad de fijación sea menor que la de la nitrocelulosa pura³¹.

En base a esto, aun cuando el acetato de celulosa y el papel de nitrocelulosa Millipore son más fáciles de obtener porque se pueden comprar en el país, se decidió trabajar con nitrocelulosa BIO-RAD. Es mejor usar nitrocelulosa pura que la que contiene acetato de celulosa porque se utiliza una cantidad pequeña de anticuerpos en cada papel y mientras más de ellos queden fijos, pueden unir más eritrocitos sensibilizados.

2.- Fijación de Anticuerpos al Papel

La gota de anticuerpos se pone sobre el papel cuando éste se encuentra seco, para estar seguros de ello, se puede calentar un poco la nitrocelulosa sin exceder la temperatura de 60°C ; de hecho, se ha reportado que esto aumenta la capacidad de fijación de proteínas del papel de nitrocelulosa³².

Después de gotear la solución de anticuerpos sobre el cuadro de nitrocelulosa se incuba por media hora, con lo cual se permite que haya un secado a fondo ya que en este paso el secado puede estabilizar el enlace³³.

3.- Bloqueo.

Ya que se tiene el círculo de anticuerpos fijos en el papel, se bloquea la superficie libre para evitar el enlace inespecifico de los eritrocitos sobre el cuadro de nitrocelulosa.

El bloqueo se lleva a cabo incubando el papel con solución de leche Sveltes, ésta contiene proteínas, grasas y otros compuestos que se fijan a la nitrocelulosa. Las proteínas de la leche cubren el papel en los lugares que no hay anticuerpos, así, estos sitios quedan bloqueados y ya no pueden unirse a ellos otras proteínas incluyendo las que se encuentran sobre el eritrocito; lo cual ocasiona que la única forma que existe para que los eritrocitos se unan al papel es por una reacción antígeno-anticuerpo con los anticuerpos antigammaglobulina humana.

Vib Comparación de las Pruebas Realizadas

Como se observa en el cuadro de resultados, la prueba directa de antiglobulina resultó negativa en quince casos donde la prueba de la mancha fue positiva. Esto indica que la prueba de la mancha puede detectar la presencia de anticuerpos que recubren al eritrocito en padecimientos que pueden cursar con anemia hemolítica inmune aun cuando no se piense que ésta se encuentra presente, o no se considere en el diagnóstico previo.

La característica anterior se puede basar principalmente en la diferencia de sensibilidades, aunque también en la objetividad de la prueba de la mancha, ya que es más sencillo observar la presencia de una mancha que la presencia de aglutinación cuando ésta es mínima.

Con respecto al caso inverso, donde la prueba directa de antiglobulina es positiva y la prueba de la mancha es negativa, pudiera pensarse que se debe a una sobreinterpretación de la PDA (falso positivo) o por una falla en la realización de la PdM. En este caso, ya que el frotis presenta esferocitosis sería necesario realizar la prueba de fragilidad osmótica.

Si se toman en cuenta los resultados de todas las muestras probadas, los valores calculados varían poco y se tiene:

Índice de concordancia absoluta: 0.79

Coefficiente Kappa: 0.59

Fuerza de concordancia: moderada

Probabilidad máxima de coincidencia de los resultados de ambas pruebas: 0.85

Un poco más baja que la calculada con solo parte de los datos.

En lo discutido arriba, se ha intentado mostrar que ambas pruebas pueden darnos resultados similares. Sin embargo, también se necesita indicar las diferencias entre estas dos pruebas, tanto en la realización como en la interpretación que ocasionan diferencias con respecto a las ventajas y desventajas que presentan ambos métodos.

1. Tiempo de realización

La rapidez es similar entre ambas ya que el número de lavados realizados es el mismo, la diferencia consiste en el tratamiento

posterior de los eritrocitos. Para la PDA se necesita preparar una suspensión y llevar a cabo una reacción de aglutinación. Para la PdM se necesita humectar el papel y posteriormente incubar cinco minutos una gota de eritrocitos sobre el mismo. Así pues, el tiempo de realización es semejante.

2. Número de muestras probadas al mismo tiempo

La prueba de la mancha no puede realizarse sobre más de tres muestras en serie, ya que el tiempo de lectura es importante, si se deja incubar por más tiempo del necesario ocurre sequedad del papel y hay enlace inespecífico de los eritrocitos, los cuales no se desprenden al lavar y el papel se muestra completamente rojo por lo cual hay que repetir la prueba.

La prueba directa de antiglobulina, al contrario, se puede realizar sobre varias muestras a la vez ya que la lectura se lleva a cabo agitando los tubos para observar la aglutinación y no existe un tiempo máximo de lectura. Aunque ésta no debe retardarse.

3- Lectura de las pruebas.

La prueba de la mancha es positiva si existe mancha y negativa si no la hay.

La prueba directa de antiglobulina es positiva si hay aglutinación aun microscópica, siempre que el observador considere que hay aglutinación y negativa si no la hay. En este caso, a veces es posible que exista duda de la presencia de aglutinación cuando ésta es mínima, y en la prueba de la mancha por el contrario no se presenta esto.

4. Grado de positividad de las pruebas.

La prueba directa de antiglobulina puede dar resultados que se expresen en forma semicuantitativa en cruces según la aglutinación observada bajo una escala ya establecida. Lo cual da un indicio de la gravedad del padecimiento de la respuesta a un tratamiento determinado.

La prueba de la mancha, por el contrario, no puede expresarse de esa forma. Se pensó que tal vez podría leerse la intensidad del color de la mancha con un densitómetro, pero esto presenta varios problemas a saber:

a) La intensidad del color depende del grado de lavado, para quitar el fondo (eritrocitos no unidos a los anticuerpos

antigammaglobulina humana) a veces se necesita un lavado enérgico y otras veces es suficiente con un lavado suave.

b) La mancha se absorbe en el papel cuando este se seca, y se hace más grande y menos definida. A su vez, el tiempo que tarda el papel en secarse depende de la temperatura entre otras cosas.

c) El fondo depende del grado de secado que haya sufrido el papel durante la incubación, si el papel se seca en exceso ocurre unión inespecífica de los eritrocitos, si el papel aun se encuentra humedo el fondo se quitará facilmente.

Por los motivos anteriores, no se puede expresar el resultado de la prueba de la mancha en forma semicuantitativa.

5. Errores en la lectura.

a) Falsos positivos.

La prueba directa de antiglobulina puede dar falsos positivos por muchas razones³⁴ por ejemplo: presencia de polvo u otras partículas en la solución salina, contaminación bacteriana de cualquiera de los reactivos, ciertas enfermedades o medicamentos, etc.

La prueba de la mancha no tiene estos problemas ya que no se basa en la presencia de aglutinación.

b) Falsos negativos.

La prueba directa de antiglobulina puede dar falsos negativos³⁵ por la presencia de proteínas del plasma o el suero, si los eritrocitos no son suficientemente frescos, si se deja que los eritrocitos sensibilizados estén en contacto con el suero antiglobulina durante demasiado tiempo, etc.

La prueba de la mancha puede dar falsos negativos si después de humectar el papel y antes de colocar la gota de paquete globular no se lleva a cabo un secado suficiente ya que entonces las células no hacen un contacto óptimo con el anticuerpo antihumano inmovilizado en el papel.

Por tanto, parece haber mayor facilidad de obtener falsos positivos o falsos negativos en la prueba directa de antiglobulina.

Lo tratado anteriormente se resume en la tabla que se muestra a continuación.

Comparación de la prueba de la mancha con la prueba directa de antiglobulina

Característica	Prueba de la Mancha	Prueba directa de antiglobulina
Tiempo de realización	Semejante en ambas	
Núm. de muestras consecutivas	MÁXIMO 3	MÁS de 3
Grado de positividad	No se puede expresar	4 cruces hasta granziento
Sensibilidad	Positiva ≥ 500 moléc/UR	Positiva ≥ 300 moléc/UR
Objetividad en la lectura	Buena en todo momento	Baja cuando la aglutinación es mínima

Con respecto al costo de la prueba de la mancha puede decirse que es semejante al de la prueba directa de antiglobulina. Es verdad que se utilizan reactivos caros como el TRIS, la nitrocelulosa y la glicina, pero la cantidad empleada es pequeña y por lo tanto no se eleva el costo total. Por ejemplo, el costo de un paquete de nitrocelulosa BIO-RAD de poro de 0.45μ que contiene cinco hojas de 15×15 cm es de 12 dólares de modo que cada centimetro cuadrado tiene un costo de 0.037dolares. .

Las tiras de nitrocelulosa ya preparadas se conservan en buen estado por al menos seis meses a temperatura ambiente alejadas de la humedad.

VII CONCLUSIONES

Se presentan dos pruebas para realizar el diagnóstico confirmativo de anemia hemolítica autoinmune. En base a lo tratado con anterioridad puede concluirse que:

a) La prueba de la mancha es más sensible que la prueba directa de antiglobulina. Claro que la sensibilidad depende de la antigammaglobulina utilizada en la preparación del papel, ya que el uso de otro tipo de anticuerpo puede variar la sensibilidad disminuyendola.³⁶

b) Dado que la correlación entre ambas pruebas es buena y por las ventajas que presenta la prueba de la mancha, ésta puede utilizarse en forma rutinaria para el diagnóstico de anemia hemolítica autoinmune.

Considerando que el número de muestras consecutivas, que se pueden tratar con la prueba de la mancha, es pequeño; tal vez resulte engorrosa su utilización cuando hay muchas muestras. En esta situación es recomendable usarla en los casos que presentan dificultades, como en pacientes con sintomatología y hallazgos de laboratorio típicos de anemia hemolítica autoinmune y con prueba directa de antiglobulina negativa, o cuando existan dudas en la interpretación de la PDA.

c) El uso de la prueba de la mancha en muestras de pacientes con otros padecimientos hematológicos puede demostrar la presencia de anemia hemolítica inmune y tal vez ser de utilidad para el seguimiento del paciente.

Finalmente, el uso de la prueba de la mancha de manera rutinaria mejoraría la calidad del diagnóstico de anemia hemolítica autoinmune y aunado esto al desarrollo de nuevos tratamientos el resultado sería en beneficio de los pacientes, lo cual es el objetivo de quienes trabajan en el área de la salud.

VIII BIBLIOGRAFIA

- ¹ Ruiz-Argüelles, Alejandro y Pietris Langhoiz-Scholz. "Detección inmunoenzimática de anticuerpos en la membrana eritrocitaria de pacientes politransfundidos". *La Rev. Invest. Clin.* (México). 39:1987:35-40.
- ² Plapp, Fred V., Jane M. Rachel and Lyle T. Siner. "The Dot Blot Direct Antiglobulin Test". *Am. J. Clin. Pathol.* 88(6)1987:733-738.
- ³ Roitt, Ivan M; Jonathan Brostoff and David Male; *Immunology*, St. Louis, C. V. Mosby, 1985 (reimp 1987), p. 51.
- ⁴ *Ibid*
- ⁵ Hood, Leroy; Irving Weisman; William Wood; *et. al. Immunology*, 2^a ed, California, Benjamin/Cummings, 1984, p. 339.
- ⁶ *Ibidem*, p. 339-343.
- ⁷ Roitt, Ivan M., *op. cit.* p. 17.
- ⁸ Stites, Daniel; John Stobo; Hugh Fudenberg; *et. al. Inmunología Básica Clínica* (Ma. del Rosario Carralio trad.), México, El manual moderno, 1983 p. 825.
- ⁹ Rybicki, Anne; Russell Heath; Jeffrey Wolf; *et. al.* "Deficiency of protein 4.1 in erythrocytes from a patient with a coombs negative hemolytic anemia". *J. Clin. Invest.*, 81(3) 1988: 893-901.
- ¹⁰ Wakui, Hideki; Hirokazu Imai; Ryoji Kabayashi; *et. al.* "Autoantibody against erythrocyte protein 4.1 in a patient with autoimmune Hemolytic Anemia". *Blood* 72(2) 1988: 408-412.
- ¹¹ Allen, Nancy K. *Manual Hyland de Inmunohematología*, Los Angeles, Hyland Laboratories, 1963. p. 3.
- ¹² Wintrobe, Maxwell; Richard Lee; Dane Rogge; *et. al. Clinical Hematology*, Philadelphia, Lea and Febiger, 1981, p. 926

- 13 Wakui, Hideki; *op. cit.*
- 14 Shuichi, Taniguchi; Tsunefumi Shibuya; Eiji Morioka; *et. al.*
 "Demonstration of three distinct immunological disorders on erythropoiesis in a patient with pure red cell aplasia and autoimmune hemolytic anemia' associated with thymoma". *British J. of Haematology*. 68(4)1988:473-477.
- 15 Salama, A. and Mueller-Eckhard "Autoimmune haemolytic anaemia in childhood associated with non-complement binding IgM autoantibodies". *British J. of Haematology*, 65(1):1987:67-71.
- 16 Wintrobe, Maxwell. *op. cit.* p. 926-943.
- 17 Salama, A.; H. Northoff; H. Burichard; *et. al.*
 "Carbimazole-induced immune haemolytic anaemia: role of drug-red blood cell complexes for immunization". *British J. of Haematology*, 68(4)1988:479-482.
- 18 Ahn, J. H.; R. E. Rosenfield; S. Kochva; "Low ionic antiglobulin tests" *Transfusion*. 27(2)1987:125-133.
- 19 Kennedy, M. S.; J. A. Lott; Gary Oilman; *et. al.* "Further improvement of the enzyme-linked antiglobin test (ELAT) for erythrocyte antibodies". *Am. J. Clin. Pathol* 77:1982:206-210.
- 20 Plapp, Fred V. *op. cit.*
- 21 Gorry, George; Sandra J. Nance; "Polyethylene glycol: as new potentiator of red blood cells antigen-antibody reactions". *Am. J. Clin. Pathol* 87, 1987:633-635.
- 22 Sinar, L. T.; M. S. Beck; J. M. Rachel; *et. al.* "A solid phase antiglobulin test". *transfusion* 25:1985:24-26.
- 23 Hilgartner, Margareit and James Bussell. "Use of intravenous gamma globulin for the treatment of Autoimmune Neutropenia of childhood and Autoimmune Hemolytic Anemia". *The American Journal of Medicine* 83(4a)1987:25-29.

- 24 Bessa, Emmanuel C. "Rapid transient Reversal of anemia and long-term effects for autoimmune hemolytic anemia in patients with lymphoproliferative disorders". *The American Journal of Medicine*, 84(4)1988:691-698.
- 25 Race R., R. and Ruth Sanger. *Blood Groups in Man*, 6 ed. London, Blackwell, 1975.
- 26 Rodensteiner, D; P. Brow; B. Skukne; et. al. "The enzyme-linked immunosorbent assay: Accurate detection of red blood cell antibodies in autoimmune hemolytic anemia" *Am. J. Clin. Pathol.* 79;1983:182-85.
- 27 Moreno Altamirano, Laura Y Fernando Cano Valle *Epidemiologia Clinica*, México, Fac. Med. UNAM, 1988 pag 68
- 28 *Ibidem*. 71-72
- 29 Conover, W. J. *Practical non - parametric statistics* 2nd ed, New York, Wiley, 1980. pp 96-99
- 30 Handman, E. and H. M. Jarvis "Nitrocellulose based assays for the detection of glycolipids and other antigens: mechanism of binding to nitrocellulose" *J. Immunol Methods* 83(1)1985:113-23.
- 31 Seehr, Bearelli. "Cell blotting: technique for staining and microscopical examination of cells blotted on nitrocellulose paper" *Anal. Biochem.* 157(2)1986:331-342
- 32 Sverdlow, Paul S; Daniel Finley; Alexander Varshausky "Enhancement of immunoblot sensitivity by heating of hydrated filter" *Anal. Biochem* 156(1)1986:147-53
- 33 Hawcer, Richard; Evelyn Niday; Julian Gordon. "A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies" *Anal. Biochem* 119(1)1982:142-147
- 34 Allen, Nancy K. *op. cit.* p.71
- 35 *Ibid*
- 36 Plapp, Fred V., *op. cit.*