



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



6  
24

**“EVALUACION DE LA CALIDAD DE ALGUNOS SUEROS  
HEMOTIPIFICADORES COMERCIALES SANGUINEOS”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**CARMEN BUSTOS VALERO**

**ASESOR: Q.F.B. IDALIA AVILA MIYAZAWA**



## **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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME FELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

" Evaluación de la Calidad de Algunos Sueros  
Hemostáticos Comerciales Sanguíneos "

que presenta la pasante: Carmen Bustos Valero.

con número de cuenta: 8041755-6 para obtener el TITULO de:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 07 de Diciembre de 1994

PRESIDENTE Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez

VOCAL Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa

SECRETARIO Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Patricia Campos Peón

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Victor M. Zendejas Buitrón

Agradezco a la Profra. Idalia Avila M. de manera especial, haber -  
aceptado ser mi Asesora de Tesis y además todas sus atenciones, -  
su apoyo e interés, que ha tenido para que concluyera esta investi-  
gación.

Gracias al Banco de Sangre del I.M.S.S. Centro Médico la Raza, por  
haber permitido que realizara la parte experimental de esta inves-  
tigación..

Agradezco a Dios, su infinita bondad; por la salud, el trabajo, el cariño de mi Madre, de mis hermanos, mis tíos, primos y amigos; -- por todos los momentos de mi vida, por la fuerza de voluntad que me ha dado para terminar este Trabajo de Tesis y alcanzar una de las metas que me propuse siempre.

A mi Mamita Carmelita, gracias por su apoyo tan grande que siempre me brindó, su Amor y Bendiciones que han llegado a mí y por haber logrado que terminara mi carrera. Aunque ya no está conmigo físicamente Siempre vivirá en mis recuerdos y en el enorme cariño que siento por Ella.

Por eso este Trabajo de Tesis lo dedico en su Memoria.

Gracias a mis Hermanos:

Martha Elvia

Alfonso

Jose Juan

Samuel

Por su apoyo, su comprensión y cariño que me ayudaron durante mi -- carrera y para poder terminar este Trabajo de Tesis.

Dios y las oraciones de mi Madre los bendigan siempre.

Agradezco a mi Tío Rosendo:

Por su cariño y por apoyarme en todo momento especialmente en que yo terminara la Tesis.

Gracias:

A mis Tíos, Primos y Amistades por su cariño y atenciones que me han brindado incondicionalmente y que han servido de apoyo para lograr una de las metas que me propuse.

Gracias a mis Profesores:

Por su dedicación a la Docencia, por compartir sus conocimientos y experiencias y por el interés que han tenido por nuestra superación profesional.

Gracias a los Profesores Sinodales:

Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez

Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa

Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega

Q.F.B. Patricia Campos Peón

Q.F.B. Victor Zendejas Buitrón

Por regalarme parte de su valioso tiempo para revisar este Trabajo de Tesis así como sus consejos, observaciones y su interés que -- mostraron para el mismo.

Gracias al Dr. Jaime Sanabria y a la Profra. Q.F.B. Idalia Avila M.:  
Por sus consejos, su apoyo y amistad que me han brindado incondicio-  
nalmente, así como su colaboración para concluir este Trabajo de --  
Tesis.

Al Q.B.P. Raúl Nieto Camacho a quien agradezco su colaboración y ase-  
sorías para la elaboración y el desarrollo de este Trabajo de Tesis.

A la Q.F.B. Virginia Lara agradezco sus asesorías en la parte esta-  
dística para la elaboración del presente Trabajo.

Gracias a la Q.F.B. Bertha Rueda Bautista:

Por sus asesorías en la parte experimental, por sus observaciones, -  
consejos, interés y su ayuda incondicional en la elaboración del ---  
presente Trabajo de Tesis; así como también agradezco la amistad que  
me ha brindado.



# I N D I C E

HOJA

RESUMEN .....	1
1.- INTRODUCCION .....	2
2.- GENERALIDADES .....	4
2.1.- DESCRIPCION DE LOS ANTIGENOS .....	4
2.2.- SISTEMAS SANGUINEOS .....	9
2.2.1.- ANTECEDENTES .....	9
2.2.2.- IMPORTANCIA .....	12
2.3.- SISTEMA SANGUINEO ABO .....	16
2.3.1.- HISTORIA Y CARACTERISTICAS .....	16
2.3.2.- CONTROL GENETICO .....	18
2.3.3.- CARACTERISTICAS DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO .....	22
2.3.4.- ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS Y SU LOCALIZACION .....	26
2.3.5.- IDENTIFICACION DE LOS GRUPOS SANGUINEOS .....	29
2.4.- DESCRIPCION DE LOS ANTICUERPOS .....	30
2.5.- ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES .....	37
2.5.1.- ANTECEDENTES .....	37
2.5.2.- ANTICUERPOS POLICLONALES .....	40
2.5.2.1.- DESCRIPCION .....	40
2.5.2.2.- FUENTES DE OBTENCION .....	43
2.5.2.3.- CONTROLES EN LA OBTENCION DE SUEROS HEMOTIPIFICADORES - PARA GRUPOS SANGUINEOS .....	45
2.5.3.- ANTICUERPOS MONOCLONALES .....	46
2.5.3.1.- DESCUBRIMIENTO .....	46
2.5.3.2.- CARACTERISTICAS .....	48
2.5.3.3.- OBTENCION .....	50
2.5.4.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES .....	52

2.5.4.1.- VENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES .....	52
2.5.4.2.- DESVENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES .....	53
2.5.4.3.- VENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES .....	54
2.5.4.4.- DESVENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES .....	54
2.6.- REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO .....	55
2.6.1.- CARACTERISTICAS DE LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO .....	55
2.6.2.- IMPORTANCIA DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO .....	60
2.6.3.- DESCRIPCION DE LA REACCION DE AGLUTINACION .....	64
2.6.4.- IMPORTANCIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS IgG e IgM EN LAS REACCIONES DE AGLUTINACION .....	65
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	69
3.- OBJETIVOS .....	70
4.- MATERIALES Y METODOS .....	71
4.1.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS .....	71
4.2.- METODO DE AGLUTINACION .....	72
4.2.1.- POTENCIA .....	73
4.2.2.- AVIDEZ .....	78
4.2.3.- ESPECIFICIDAD .....	81
5.- RESULTADOS .....	83
5.1.- RESULTADOS DE LA POTENCIA .....	83
5.2.- RESULTADOS DE LA AVIDEZ .....	95
5.3.- RESULTADOS DE LA ESPECIFICIDAD .....	108
6.- DISCUSION .....	109
7.- CONCLUSIONES .....	113
A N E X O .....	115
8.- BIBLIOGRAFIA .....	118

## INDICE DE TABLAS

	HOJA
TABLA 1.- Cálculo Aproximado del Número de Sitios Antigénicos en Células Eritrocíticas de los Diferentes Fenotipos de Adultos y Recién Nacidos .....	6
TABLA 2.- Clases de Antígenos .....	8
TABLA 3.- Descubrimiento de los Diversos Grupos Sanguíneos .....	10
TABLA 4.- Antígenos y Anticuerpos de los Grupos Sanguíneos en el Sistema ABO .....	17
TABLA 5.- Fenotipos y Genotipos del Sistema de Grupos Sanguíneos ABO .....	21
TABLA 6.- Estructuras Bioquímicas de los Antígenos ABH .....	27
TABLA 7.- Determinantes Antigénicos de Estructuras A, B y H, y los Productos Enzimáticos de los Genes de los Grupos Sanguíneos .....	28
TABLA 8.- Determinación del Grupo Sanguíneo ABO en Células y Suero .....	29
TABLA 9.- Métodos de Aislamiento de las Inmunoglobulinas .....	32
TABLA 10.- Propiedades de las Inmunoglobulinas Humanas .....	36

## I N D I C E D E F I G U R A S

	HOJA
FIGURA I.- Herencia de los Grupos Sanguíneos ABO .....	19
FIGURA II.- Diagrama de la Bicapa Lipídica de la Membrana del Eritrocito .....	25
FIGURA III.- Separación Electroforética de las Proteínas del Suero Humano .....	31
FIGURA IV.- Esquema de la Molécula IgG .....	34
FIGURA V.- Producción de Anticuerpos Policlonales .....	41
FIGURA VI.- Producción de Anticuerpos Monoclonales .....	49
FIGURA VII.- Obtención de los Anticuerpos Monoclonales .....	51
FIGURA VIII.- Representación Esquemática de las Cargas Eléctricas que Rodean a una Partícula en Suspensión .....	63
FIGURA IX.- Aglutinación de Eritrocitos por Anticuerpos IgG e IgM .....	66
FIGURA X.- Esquema de la Interpretación de la Reacción Antígeno - Anticuerpo .....	76

## INDICE DE GRAFICAS

HOJA

GRAFICA I.-	Promedio del Cómputo Contra los Diferentes Sueros Hemotipificadores Anti-A Frente a Células Tipo - A .....	87
GRAFICA Ia.-	Promedio del Cómputo Contra los Diferentes Sueros Hemotipificadores Anti-A frente a Células Tipo - AB .....	88
GRAFICA II.-	Promedio del Cómputo contra los Diferentes Sueros Hemotipificadores Anti-B Frente a Células Tipo - B .....	89
GRAFICA IIa.-	Promedio del Cómputo Contra los Diferentes Sueros Hemotipificadores Anti- B Frente a Células Tipo - AB .....	90
GRAFICA VIIIA <sub>1</sub> .-	Avidez de los Sueros Analizados Anti-A, a una Concentración - del 100 % Frente a Células Tipo-A .....	97
GRAFICA VIIIA <sub>2</sub> .-	Avidez de los Sueros Analizados Anti-A a una Concentración -- del 50 % Frente a Células Tipo - A .....	98
GRAFICA VIIIB <sub>1</sub> .-	Avidez de los Sueros Analizados Anti-A, a una Concentración - del 100 % Frente a Células Tipo-AB .....	100
GRAFICA VIIIB <sub>2</sub> .-	Avidez de los Sueros Analizados Anti-A, a una Concentración - del 50 % Frente a Células Tipo- AB. ....	101
GRAFICA IXa <sub>1</sub> .-	Avidez de los Sueros Analizados Anti-B, a una Concentración - del 100 % Frente a Células Tipo - B .....	103
GRAFICA IXa <sub>2</sub> .-	Avidez de los Sueros Analizados Anti-B, a una Concentración - del 50 % Frente a Células Tipo -B .....	104
GRAFICA IXb <sub>1</sub> .-	Avidez de los Sueros Analizados Anti-B a una Concentración - a una Concentración del 100 % Frente a Células Tipo - AB....	106
GRAFICA IXb <sub>2</sub> .-	Avidez de los Sueros Analizados Anti-B, a una Concentración - del 50 % Frente a Células Tipo - AB .....	107

## R E S U M E N

En el Area Clínica el uso de los Sueros Hemotipificadores para Grupos Sanguíneos es frecuente, sobre todo por las aplicaciones de tipo ---- transfusional.

En el presente trabajo se lleva a cabo la evaluación de algunos Sueros Hemotipificadores provenientes de 5 diferentes fabricantes para los Grupos Sanguíneos A y B; los cuales se agruparon de la siguiente manera: 1) Anti-sueros Policlonales: Suero I, Suero II y Suero III; Sueros con anticuerpos Monoclonales: Suero IV y Suero V.

Para evaluar la Calidad de estos Antisueros se utilizaron los parámetros de Potencia, Aidez y Especificidad, cuyas especificaciones estan establecidas por la Secretaría de Salud. (6)

En el parámetro de la Potencia se espera que todos los sueros tengan un Título mínimo de 1:256 y un Cómputo mínimo de 50; para la Aidez - un tiempo menor a 15 segundos (para los sueros Anti-A, Anti-B y Anti-AB), y la Especificidad que se refiere a la capacidad de reconocer al antígeno correspondiente en la identificación de los Grupos Sanguíneos. Se aplica el método de Aglutinación Directa utilizando la Técnica en-Tubo para evaluar la Potencia y la Especificidad, y en Placa para la Aidez.

Por los resultados obtenidos se llega a la conclusión de que los Sueros Anti-A I y V tienen una Potencia con Títulos de 1:1024 y 1:512, - un Cómputo Promedio de 98 y 89; una Aidez de 3.5-4.5, y de 6-12 respectivamente y una Especificidad confiable. Los Sueros Anti-B I y V - tienen una Potencia de 1:256, un Cómputo de 80 y 74.5, una Aidez de 5-9 y 6-10 segundos respectivamente y una Especificidad confiable. -- Por lo tanto cumplen con los parámetros de Calidad establecidos.

## 1.- I N T R O D U C C I O N .

El empleo de Sueros Hemotipificadores para la determinación de Grupos Sanguíneos en el Area Clínica, es de suma importancia, por su aplicación en Banco de Sangre.

La superficie del eritrocito contiene un gran número de determinantes antigénicos, los cuales son productos directos o indirectos de los genes y precisamente estos determinantes, son los que permitieron clasificar a los Grupos Sanguíneos. (26,27,28,30)

Los Grupos Sanguíneos son sistemas que tienen implicaciones: genéticas, bioquímicas, inmunitarias y antropológicas. (32)

Las transfusiones sanguíneas se practicaron a partir de 1900, después de que Karl Landsteiner patólogo vienés, descubriera la existencia de los Grupos Sanguíneos ABO y se pudiera establecer la compatibilidad entre paciente y donador. (38)

En 1902, discípulos de Landsteiner: von Decastello y Sturli, descubren al cuarto Grupo Sanguíneo: el AB. (3)

En 1927, Landsteiner y Levine descubren que al inyectar eritrocitos humanos en diversas especies de animales se producen anticuerpos, los cuales permitirían diferenciar entre los grupos sanguíneos puesto que éstos mismos son específicos para cada grupo. (5,32,38)

Tiempo después se dan cuenta de la regularidad en la distribución de los Grupos ABO y el hecho de que fueran permanentes, los llevó a la interrogante de la posibilidad de ser hereditarios, por lo -- que notables estudios realizados por Durgern y Hirszfild llegan a la conclusión de que las estructuras sanguíneas específicas se heredan de acuerdo a las Leyes Mendelianas. (3,7,26,30,36)

En los Bancos de Sangre, es fundamental identificar en forma preci

sa los antígenos del Sistema ABO, de las sangres que se usan para efectuar una transfusión, evitando así el riesgo de una reacción hemolítica post-transfusional. (18)



## 2.- GENERALIDADES.

### 2.1.- DESCRIPCION DE LOS ANTIGENOS.

El término antígeno o inmunógeno se define tradicionalmente como una sustancia extraña (o exógena), capaz de inducir una respuesta inmunitaria cuando es introducida en un individuo. (5,21,31)

Los antígenos son mezcla complejas con un peso molecular elevado. Las respuestas inmunitarias son de una gran diversidad, de modo que ocurre una selección de determinantes antigénicos que inducen la formación de anticuerpos específicos y actúan como determinantes inmunodominantes. (31)

Los determinantes antigénicos (sitios antigénicos o epítopes), son zonas del antígeno que determinan la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo. El número de determinantes diferentes en la molécula de un antígeno varía por lo general con su tamaño y complejidad química. Un ejemplo de ello lo encontramos en el Sistema del Grupo Sanguíneo ABO, precisamente las sustancias químicamente asociadas con la especificidad son las glucoproteínas (compuestas por carbohidratos y un esqueleto peptídico), aunque la especificidad está determinada por los azúcares. Se tiene un cálculo aproximado del número de sitios antigénicos en las células eritrocíticas para los fenotipos del Sistema del Grupo Sanguíneo ABO, (Ver Tabla 1). (29)

El término inmunogenicidad se ha propuesto para indicar la capacidad de inducir una respuesta, y el término de antígeno está relacionado con la capacidad de exhibir especificidad antigénica y de reaccionar con el anticuerpo. Resulta posible distinguir entre ---

**FALTA PAGINA**

**No. 5 a la.....**

TABLA 1.- CALCULO APROXIMADO DEL NUMERO DE SITIOS ANTIGENICOS  
 EN CELULAS ERITROCITICAS DE LOS DIFERENTES FENOTI--  
 POS DE ADULTOS Y RECIEN NACIDOS. ( 21 )

F E N O T I P O S	SITIOS ANTIGENICOS POR CELULA	REFERENCIA*
SITIOS DE A <sup>+</sup>		
A <sub>1</sub> adultos	830 000	(1)
A <sub>1</sub> adultos	810 000-11700 000	(2)
A <sub>1</sub> adultos	850 000	(3)
recién nacidos	250 000-370 000	(2)
A <sub>2</sub> adultos	240 000-290 000	(2)
A <sub>2</sub> adultos	240 000	(3)
recién nacidos	140 000	(2)
A <sub>1</sub> B adultos	460 000-850 000	(2)
recién nacidos	220 000	(2)
A <sub>2</sub> B adultos	140 000	(2)
SITIOS DE B <sup>+</sup>		
B adultos	750 000	(2)
recién nacidos	200 000-320 000	(4)
A <sub>1</sub> B adultos	430 000	(2)
SITIOS DE H		
O adultos	1 700 000	(5)
recién nacidos	350 000	(5)
A, B, AB recién nacidos	70 000	(5)

\* (1) Greenbury, et. al. (1963); (2) Economidou et. al. (1967a);  
 (3) Cartron et. al. (1974); (4) E.L. Romano; (5) Schenkel---  
 Brunner (1980a,b).

+ Se realiza el enlace de la molécula de anticuerpo a su sitio-  
 antigénico; el verdadero número de sitios de A y B puede ser-  
 lo doble de lo calculado.

las áreas de la molécula, las necesarias para inducir una respuesta inmunitaria y aquellas que participan en su especificidad antigénica. (7,22,31,32)

Algunas sustancias tienen la capacidad de reaccionar con los anticuerpos pero no de estimular la formación de los mismos. Por ejemplo cuando se toma como antígeno al Bacillus anthracis, éste al ser inoculado, el individuo produce anticuerpos contra todo el bacilo. En la cápsula del bacilo se ha encontrado un polímero de tipo ácido poli-D-glutámico, el cual es antigénico pero no es inmunógeno, esto quiere decir que no estimula in vivo, la producción de anticuerpos pero reacciona con ellos, o sea que no es un inmunógeno pero tiene especificidad antigénica. (31)

Algunos factores importantes que participan en la inmunogenicidad de los natígenos son: la composición, la vía de administración, la dosis del antígeno, edad y sexo del receptor; el tamaño y metabolismo del antígeno, el uso de adyuvantes y el estado físico del antígeno. (21)

Los antígenos se clasificaron de acuerdo a su naturaleza química como: proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas o polisacáridos; sin embargo a través de técnicas químicas y bioquímicas para su aislamiento, purificación y síntesis de sustancias antigénicas se logró un avance en el descubrimiento de la naturaleza de los antígenos. (Ver Tabla 2) .(39)

- a).- Antígenos Naturales: plantas, bacterias y animales.
- b).- Antígenos Artificiales: Antígenos naturales modificados químicamente.
- c).- Antígenos Sintéticos: Son los que se sintetizan químicamente.

TABLA 2.- CLASES DE ANTIGENOS. (39)

CLASES DE ANTIGENOS	ORIGEN	EJEMPLOS
Naturales	Plantas, Bacterias, Animales.	Específicos: Células sanguíneas, bacterias y virus.
Artificiales	Antígenos Naturales modificados químicamente.	Proteínas yodadas; -haptenos conjugados. Ej.- Prot. Azo & DNF* proteínas.
Sintéticas	Moléculas Químicamente Sintetizadas.	Polipéptidos, poli-- aminoácidos, multicadenas aminoácidos-co polímeros.

DNF\* = Dinitrofenilo.

## 2.2.- SISTEMAS SANGUINEOS.

### 2.2.1.- ANTECEDENTES DE LOS SISTEMAS SANGUINEOS.

La tipificación de los Grupos sanguíneos y sus técnicas son importantes en el Area Clínica para: compatibilización de donadores y receptores en transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos; identificación y protección contra la aloinmunización de mujeres expuestas al Rho D, durante el embarazo o parto; pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Hemolítica del recién nacido, debido a aloanticuerpos; diagnóstico e investigación de enfermedades hemolíticas provocadas por anticuerpos; en estudios antropológicos y en casos de disputa sobre la paternidad. (26,30)

El término tipo sanguíneo o grupo sanguíneo podría ser aplicado a todos los marcadores genéticos de la sangre; incluyendo proteínas del suero y las enzimas de los eritrocitos; sin embargo el término se reserva para los antígenos hereditarios, detectados en la superficie de los eritrocitos por anticuerpos específicos. (5,23)

La superficie del eritrocito tiene un gran número de determinantes antigénicos, los cuales son productos directos o indirectos de los genes, precisamente éstos determinantes, son los que permitieron clasificar a los Grupos Sanguíneos. Dentro de cada sistema de Grupos Sanguíneos, los antígenos son heredados al parecer como productos de un gen sencillo o de un conjunto de genes estrechamente ligados. (7,26)

A continuación se presenta una tabla en la cual se menciona el descubrimiento de los diferentes Sistemas Sanguíneos y su clasificación, (Tabla 3). (21)

TABLA 3.- DESCUBRIMIENTO DE LOS DIVERSOS GRUPOS SANGUINEOS\*. (21)

PRIMEROS EJEMPLOS DE ANTICUERPOS DE SISTEMAS DEFINIDOS:				
SISTEMA DE GRUPOS SANGUINEOS.			DETECTADO POR:	
NOMBRE (ABREVIATURA)	AÑO DE DESCUBRIMIENTO	ENCONTRADOS EN SUERO DE:	AGLUTINACION DE CELULAS ROJAS EN MEDIO SALINO.	PRUEBAS ANTI- GLOBULINA.
ABO	1901	Sujetos Normales	Sí	-
LEWIS	1946			
MN	1927	Inoculación a conejos	Sí	-
P	1927	con eritrocitos humanos.		
LW	1930s	Conejos y cerdos guinea inoculados con eritrocitos de mono Rhesus.	Sí	-
RHESUS (Rh)	1939	i) Madre de infante nacido muerto.	Sí <sup>+</sup>	- **
	1940	ii) Pacientes transfundidos.	Sí <sup>+</sup>	- **
LUTHERAN (Lu)	1945	Pacientes transfundidos.	Sí	-
KELL (K)	1946			
DUFFY (Fy)	1950			
KIDD (Jk)	1951	Pacientes transfundidos o madres de infantes --	⊙	Sí
DIEGO (Di)	1955	con enfermedad hemolítica del recién nacido.	No	
CARTWRIGHT (Yt)	1956			
Xg	1962			
DOMBROCK (Do)	1965			
COLTON (Co)	1967			

\*Sistemas omitidos en la Tabla, incluyen: SC, Chido/Rodgers, Hh, Kx, Gerbich y Cromer.

- Pruebas que no se realizaron.

+ Los anticuerpos Rh no se detectan aglutinando eritrocitos en medio salino a menos que la respuesta inmunitaria haya sido provocada, como en los casos señalados.

\*\* La prueba de antiglobulina fué introducida en trabajos clínicos hasta 1945.

⊙ Anticuerpos que no aglutinan en medio salino por lo tanto son anticuerpos incompletos (11G).

La estructura química de la mayoría de los antígenos no se conoce, aunque se estableció la naturaleza de algunas proteínas de la membrana del eritrocito. La investigación se enfoca principalmente a las sustancias denominadas sialoglicoproteínas o glucoforinas. De éstas, la  $\alpha$ -glucoproteína (glucoforina A), porta los antígenos sanguíneos de los grupos M y N y la  $\beta$ -glucoproteína (glucoforina-B), los antígenos Ss y U. Otras glucoproteínas tienen actividad A y B. (32)

La importancia clínica de un sistema de grupos sanguíneos depende de dos factores: la frecuencia de los anticuerpos en la población, (por ejemplo: el Sistema ABO), y su potencia relativa como en el caso de las inmunoglobulinas IgG con su habilidad para activar al complemento. (21,32)



## 2.2.2.- IMPORTANCIA DE LOS SISTEMAS SANGUINEOS.

En el Sistema ABO, los antígenos A y B están contruídos por carbohidratos. La especificidad antigénica está en los azúcares terminales de un oligosacárido. En la membrana celular, la mayor parte de los antígenos A y B son glucoproteínas aunque algunos de los carbohidratos se unen a los lípidos de la membrana. Los grupos sanguíneos ABO están determinados por los genes alélicos A, B y O. Los antígenos A y B pueden aparecer también en los líquidos corporales como glucoproteínas solubles. Sustancias derivadas de bacterias intestinales y algunos vegetales ingeridos, pueden desencadenar una respuesta inmunitaria en el individuo. Se considera que ésta estimulación sirve para producir anti-A y anti-B en las personas A, B y O. Los anti-A y anti-B, por lo general son IgM, pero un estímulo inmunológico suficiente puede provocar la formación de IgG anti-A y anti-B. (3,17)

Los anticuerpos anti-A y anti-B, pueden ser hemolizantes si son transfundidas células rojas incompatibles y son más potentes en las personas con grupo O que en los individuos A o B. (21,32)

Los genes que regulan el Sistema de los Grupos Sanguíneos Lewis (L<sub>a</sub>) no está ligado al ABO pero sí están estrechamente relacionados con las sustancias ABH por su estructura. El carbohidrato precursor esencialmente es el mismo en ABH y en Le. Las sustancias Lewis solubles están en la saliva y en el plasma. De hecho, los antígenos adheridos a los eritrocitos han sido adsorbidos pasivamente del plasma circulante. Los anticuerpos Lewis pueden existir naturalmente sin estímulos antigénicos por los eritrocitos de otras personas. Los anticuerpos por lo general son débiles y casi exclusivamente de la clase IgM. (32)

Con el descubrimiento de anticuerpos y antígenos, la inmunología y la genética de los grupos Rh se ha vuelto muy complicada pues se han encontrado más de 30 especificidades diferentes, aunque no se conoce aún la naturaleza química de éstos antígenos. (32)

El antígeno Rh es llamado antígeno D, y se acompaña por los productos genéticos de los loci Cc y Ee. Probablemente el complemento de D no sea antigénico, puesto que nunca se han encontrado anticuerpos contra "d". El genotipo se describe por dos conjuntos de letras por ejemplo: Cdc/cDE (Fisher-Rice), o en forma más común, por el uso de sólo dos letras, por ejemplo  $R_1R_2$  (Weiner). De los diversos antígenos Rh, el D es el inmunógeno más potente y por lo tanto el más importante. Provoca respuesta del anticuerpo con una frecuencia 50 veces mayor que los antígenos c y E. Si una unidad de sangre D positiva es transfundida a un receptor Rh negativo se producirá anti-D en 60-80% de los casos; se formarán anti-c y anti-E en menos en menos de 2% de las transfusiones incompatibles, por ésta causa, en la rutina de los Bancos de Sangre sólo se determina el antígeno D y su presencia delimita la designación de Rh positivo o Rh negativo. El antígeno D puede aparecer en la membrana de los eritrocitos en formas débiles, las cuales complican la tipificación del Rh. Estas variantes se denominan  $D^u$  y difieren de D "normal" en que tienen un número menor de sitios antigénicos. La detección de  $D^u$  requiere un antisuero potente y la Técnica de Coombs. Si se localiza el  $D^u$ , la sangre se considera Rh positiva. (32)

Puesto que los antígenos Rh sólo existen en los eritrocitos, no hay anticuerpos Rh "naturales". La respuesta inmunitaria sólo es provocada después de exposición a sangre incompatible ya sea por -

embarazo o por transfusión. Como excepción está el anti-e, que puede existir como autoanticuerpo. El Sistema Rh le sigue en importancia el Sistema Sanguíneo ABO. (3,21,32)

Al antígeno Kell original se le ha dado el símbolo K y su duplicado alélico es k (en algunas ocasiones se llama Cellano). El antígeno K existe aproximadamente en 8% de la población blanca. Hay cierto número de antígenos que pertenecen al Sistema Kell ( $Kp^a$ ,  $Kp^b$ ,  $Js^a$ ,  $Js^b$ ,  $U1^a$ , etc.), pero es raro encontrar otros anticuerpos diferentes al anti-K. El anti-K es aproximadamente tan común como los anticuerpos anti-c y anti-E del sistema Rh y puede producir reacciones hemolíticas en las transfusiones e isoinmunización durante el embarazo. Si el anticuerpo está presente por lo general es potente y puede detectarse fácilmente por la técnica de Coombs. (21,32)

Aproximadamente dos tercios de la población blanca tienen el antígeno Duffy ( $Fy^a$ ). Este antígeno es destruido en el tratamiento convencional enzimático y los anticuerpos solo pueden demostrarse por la técnica de Coombs. Comparado con los anticuerpos de otros grupos sanguíneos, el anti- $Fy^a$ , es una causa relativamente común de reacciones hemolíticas en las transfusiones. En el laboratorio el anticuerpo con frecuencia es débil y puede pasarse por alto en las pruebas de compatibilidad. (32)

Los anticuerpos para los antígenos Kidd,  $Jk^a$  y  $Jk^b$ , no son muy comunes, pero activan el complemento produciendo in vivo hemólisis rápida de los eritrocitos incompatibles. El anti- $Jk^a$  puede ser muy débil in vitro y la detección de éste anticuerpo es la razón principal para la inclusión del anti-complemento en los reactivos

de Coombs que se emplean para las pruebas de compatibilidad. Algunas veces, los antígenos del HLA, pueden estar presentes en la membrana del eritrocito, pero siempre son débiles; como por ejemplo el caso de los antígenos Bg (relacionados con los antígenos HLA-B7), éstos son absorbidos tal vez en forma pasiva sobre la membrana del eritrocito en pacientes sanos, pero son más reactivos en pacientes con leucemia, linfoma, policitemia, anemia megaloblástica y anemia hemolítica. Cabe mencionar que los anticuerpos del HLA no destruyen a los eritrocitos, aunque sean positivos en la prueba de los antisueros anti-Bg. (21,32)

## 2.3.- SISTEMA SANGUINEO.

### 2.3.1.- HISTORIA Y CARACTERISTICAS.

Las transfusiones sanguíneas llegaron a practicarse a partir de -- 1900, después de que Karl Landsteiner, un patólogo vienés, descu- brierá la existencia de los Grupos Sanguíneos del Sistema Sanguí- neo ABO y se pudiera establecer la compatibilidad entre paciente- y donador. (3,7,11,30,38)

El descubrimiento por Karl Landsteiner de los Grupos Sanguíneos A, B y O sirvió de base a toda una nueva área de exploración cientí- fica, pues ésto provocó que en 1902 dos de sus discípulos: ----- von de Castello y Sturli descubrieran el cuarto y menos frecuente Grupo Sanguíneo AB. (3,7)

La existencia de estos cuatro grupos sanguíneos pueden explicarse puesto que es el único sistema en el que el suero contiene agluti- ninas (anticuerpos) dirigidos contra el antígeno que no posee, - que reaccionan con los correspondientes aglutinógenos (antígenos), presentes en los glóbulos rojos, por lo que se obtuvieron cuatro- patrones diferentes de reacción. La presencia "natural" de las -- aglutininas, el tipo de éstas, la distribución y el número de --- aglutinógenos, el tiempo y la temperatura de reacción fueron fac- tores determinantes de éste descubrimiento. En 1927, Landsteiner y Levine pensaron que podría ser benéfico inyectar eritrocitos - humanos en diversas especies de animales con la esperanza de que pudieran producirse heteroanticuerpos, los cuales revelarían di- ferencias entre los miembros de la especie humana. Sin embargo, - éste descubrimiento provocó la inquietud de otros investigadores que los condujo a preguntarse si éstos grupos podrían ser heredi- tarios debido a que había una regularidad en su distribución y es

cuando von Durgern y Heirszfeld, a través de sus notables trabajos llegan a la conclusión de que las estructuras sanguíneas se heredan con las Leyes Mendelianas. (7,30)

La primera indicación de que existen formas debilitadas de A se debe a von Durgern y Heirszfeld quienes describen experimentos que muestran que el anti-A de personas del grupo B tienen más de una especificidad y que reacciona con casi todas las células del grupo A aunque existen formas más débiles del antígeno A que no se reconocen. Estas especificidades se conocen hoy como anti-A<sub>1</sub> y anti-A común. El anti-B de individuos del grupo A no parece tener más de una especificidad. Como su equivalente anti-A, no reconoce formas muy débiles del antígeno-B. (Ver Tabla 4). (30,32)

TABLA 4.- ANTIGENOS Y ANTICUERPOS DE LOS GRUPOS SANGUINEOS EN EL SISTEMA ABO. (32)

GRUPO SANGUINEO	ANTIGENOS EN LOS ERITROCITOS	ANTICUERPOS EN EL PLASMA
A <sub>1</sub>	A + A <sub>1</sub>	ANTI-B
A <sub>2</sub>	A + H	ANTI-B
B	B (+H)	ANTI-A
O	H	ANTI-A ANTI-B
A <sub>1</sub> B	A + A <sub>1</sub> + B	ANTI-A <sub>1</sub>
A <sub>2</sub> B	A + B (+H)	ANTI-A <sub>1</sub>

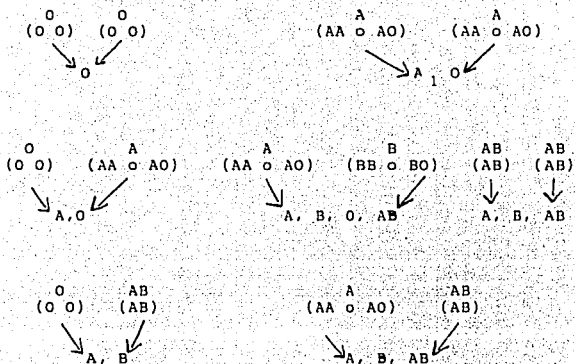
### 2.3.2.- CONTROL GENETICO.

Los Grupos Sanguíneos ABO están determinados por los genes alélicos A, B y O. Estos genes producen enzimas transferasas también llamadas estructuras activas que conjugan los azúcares a un carbohidrato precursor y son específicos para sus sustratos: la transferasa A -- para la N-Acetilgalactosamina y la transferasa B para la Galactosa. El gen O sólo tiene a la sustancia precursora que es el antígeno H. (32,38)

El antígeno H es un determinante antigénico precursor de la síntesis de A y B, es producido por el gen H cuyo producto es la fucosiltransferasa que convierte a la sustancia precursora en sustancia H. El Sistema ABO está controlado por lo menos de tres grupos de genes: H y h; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O; Se y se. Cada grupo es independiente de los demás y se puede suponer que cada cual tiene su locus. El gen H se hereda en forma independiente del Sistema ABO. Existen -- unas cuantas personas a quienes faltan los genes H (genotipo hh), por lo que son incapaces de sintetizar una cadena precursora completa. Este fenotipo se llama Oh o tipo Bombay. A causa de la deficiencia de la cadena precursora, las sustancias A y B no pueden -- ser formadas a pesar de existir transferasas funcionales A y B. (32,33)

Los tres alelos comunes A, B y O se localizan en el locus ABO del cromosoma 9 (citado en la referencia 21). El grupo sanguíneo A puede subdividirse en los subgrupos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, en base al número de sitios antigénicos de A sobre el eritrocito. (Ver Figura I). (3,35,40)

FIGURA I.- HERENCIA DE LOS GRUPOS ABO. ( 32 )



Herencia de los Grupos ABO. El genotipo de los grupos -  
sanguíneos está escrito entre paréntesis y el fenotipo -  
fuera del paréntesis.



Aproximadamente 80% de las personas A y AB pertenecen al subgrupo  $A_1$ . La elevada densidad antigénica sobre los eritrocitos  $A_1$ , -- se traduce en la formación de una especificidad antigénica nueva- pero relativamente débil, tal vez como consecuencia de interac- -- ción de dos oligosacáridos A estrechamente adyacentes. Las perso- nas  $A_2$  y en especial las  $A_2B$  pueden tener anticuerpos para  $A_1$ . -- Existen unos cuantos subtipos de A que tienen una cantidad mucho- menor del compuesto A que los eritrocitos  $A_2$ . Los eritrocitos  $A_3$ , reaccionan en forma característica con una aglutinación muy esca- sa frente a anti-A rodeada por un mayor número de eritrocitos no aglutinados. Los eritrocitos A no son aglutinados por anticuerpos anti-A derivados de personas del grupo B; s embargo el suero de individuos del grupo O puede producir una reacción débil. Para es- tar en posibilidad de detectar al  $A_x$  y algunos otros subgrupos ra- ros de A, laboratorios especializados en la determinación de gru- pos sanguíneos emplean el suero O (llamado anti-AB), además de -- anti-A y anti-B. El grupo B no se puede subdividir, pero hay algu- nas formas muy raras de B débil (Ver Tabla 5). (26,30,32)

Debido a que los anticuerpos  $A_1$  son débiles, no son prácticos pa- ra diferenciar entre  $A_1$  y  $A_2$ . Para realizar ésta distinción se -- emplean sustancias llamadas lectinas. Estas sustancias son extrac- tos de semillas de plantas que reaccionan selectivamente con algu- nos antígenos del grupo sanguíneo que son carbohidratos. La lecti- na de Dolichus biflorus, en dilución apropiada, aglutina sólo a - células  $A_1$ . Con frecuencia se emplea en forma simultánea con la - lectina de Ulex europeus, la cual reacciona con la sustancia H, - puesto que los eritrocitos  $A_2$  están llenos de sustancia H en com- paración con los eritrocitos  $A_1$ . (21)

TABLA 5.- FENOTIPOS Y GENOTIPOS DEL SISTEMA DE GRUPOS SANGUINEOS ABO. (26)

FENOTIPOS	GENOTIPOS
O	O/O
A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> /A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> /O
A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> /O
B	B / B B / O
A <sub>1</sub> B	A <sub>1</sub> /B
A <sub>2</sub> B	A <sub>2</sub> /B

### 2.3.3.- CARACTERISTICAS DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO.

Es de interés fundamental conocer las características de la Membrana del Eritrocito, pues en ella se localizan los determinantes antigénicos (epitopes), que permiten diferenciar a los grupos sanguíneos entre sí.

La membrana del eritrocito ha sido estudiada mediante una gran variedad de técnicas como: Campo Oscuro, Microscopía Electrónica de Barrido y Técnicas de Congelación. Los resultados revelan la presencia de lo que se conoce como: "Membrana Unitaria", común en todas las células eucarióticas. (3)

La composición química de la membrana está constituida por un 40% de lípidos y un 60% de proteínas. Teniendo en cuenta los pesos moleculares medios de los componentes hallados, se calcula que existe una molécula proteica por cada 75 moléculas de lípidos. Los lípidos contienen en su mayor parte fosfolípidos (60%), colesterol-- (30%) y glicolípidos (10%). Los constituyentes mayores de los fosfolípidos son la esfingomielina, la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina que en conjunto superan el 95% total de fosfolípidos. Considerando el peso molecular de cada tipo de componente sobresale el alto contenido de colesterol (casi la mitad del componente lipídico), cuando se compara con otros tipos de membranas. (18,21)

Estudios experimentales sobre agregados lipídicos en bicapas han demostrado las propiedades fluidificantes y el aumento de flexibilidad por la presencia de colesterol. (3, 21)

Los fosfolípidos de la membrana se encuentran tanto en la lámina -

que contacta hacia el exterior, como la que mira hacia el hialoplasma (cara interna de la célula eritrocítica). (21, 33)

Los fosfolípidos de la bicapa "estabilizan" las proteínas intrínsecas de la membrana. En algunos casos no es posible obtener proteínas de membrana sin fosfolípidos adicionales, y en muchos más casos la función de la proteína no puede demostrarse más que adicionando lípidos que mantienen su configuración espacial. (21)

Los glicolípidos (o esfingolípidos), tienen un polo lipófilo (con un ácido graso y un aminoalcohol) y un polo hidrófilo de naturaleza glucídica. Algunos de los glicolípidos llevan el marcador antigénico del grupo sanguíneo al que pertenece el individuo. Esta bicapa lipídica forma la estructura básica de la membrana y varias proteínas, como son la banda 3 glicoprotéica, el anión transportador, sialoglicoproteína (SGP), y la proteína acarreadora que se adhiere directamente al citoesqueleto, estructura en la cual se ha comparado con una redcilla; los nudos de la redcilla son la unión de complejos compuestos de una actina oligomérica, las proteínas 4.1, 4.9 (demantina), aducina y tropomiosina. En adición a este sitio la espectrina enrejada, constituida de  $\alpha$ - $\beta$ -heterodímeros, formada principalmente de hexágonos con algunos pentágonos y heptágonos, están enlazados a una proteína transmembranal: glucoforina C ( $\beta$ -SGP) y tal vez a una glucoforina A o  $\alpha$ -SGP (Nagel, 1990). (21, 33)

La proteína transmembranal banda 3 está asegurada al citoesqueleto a través de las bandas 2.1 (ankirina) o 4.1. (Figura 11). (21)

La proteína acarreadora del antígeno D se cree estar adherida al citoesqueleto pero aún no se conoce. (21, 33)

La banda 3 proteica, la cual constituye cerca del 25% del total de

de la proteína de membrana, es una estructura filamentososa que atraviesa la bicapa lipídica (citado en la referencia 21), se presenta cerca de un millón de copias por eritrocito. La molécula completa, es un dímero con un conducto entre dos mitades las cuales son la ruta principal donde los aniones son transportados (citado en la referencia 21). La banda 3 es también un sitio de unión importante para las enzimas glicolíticas, Hb y hemicones o cuerpos de Heinz, (citado en la referencia 21). (21)

Las sialoglicoproteínas o glicoforinas tienen la mayor parte de su masa en la superficie externa de la membrana del eritrocito o en la mayoría de la superficie incluye más de 75% de ácido siálico y por tanto más carga negativa de la superficie celular, es transportado por moléculas glicoprotéicas, sin embargo la mayor parte de la estructura Rho(D), está en la membrana. (21,33)

Los antígenos A, B y H se diferencian por los azúcares terminales los cuales se adhieren al menos a cuatro clases de la estructura en la superficie del eritrocito: la banda 3 (mencionada anteriormente); sialoglicoproteínas, poliglicosilceramidas y simples glicolípidos: el gran número de sitios antígenicos A, B y H están en la banda 3 glicoprotéica. (21,33)

Los antígenos Kell se transportan en glicoproteínas de peso molecular de 93 000 d y los antígenos Duffy a una proteína glicosilada pesada, de peso molecular cercano a 30 000 d. Los antígenos MN y Ss son transportados en  $\alpha$  y  $\delta$ -SGPs (glicoforinas A y B). (21,33)

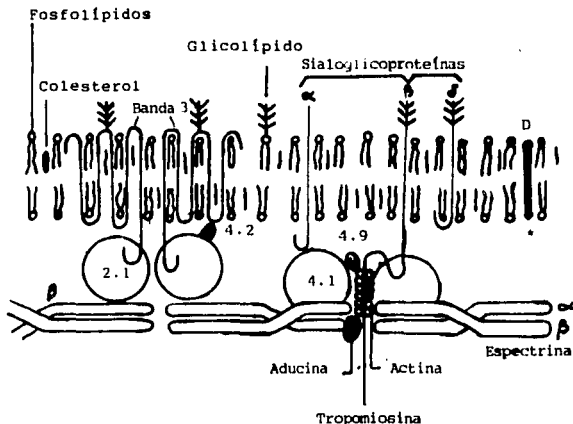


FIGURA II.- DIAGRAMA DE LA BICAPA LIPIDICA DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO. (21).- Algunas de las proteínas transmembranales, llamadas banda 3 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -sialoglicoproteínas (SGP), (glicoforinas A, C y B respectivamente), la proteína Rho (D) y el citoesqueleto. Las moléculas del carbohidrato cuyas cadenas se presentan como parte de la banda 3; glicolípidos y SGPs. Algunas de las proteínas del citoesqueleto en el interior de la membrana celular, por ejemplo: la banda 3 se adhiere a la banda 2.1 (ankirina) y la proteína 4.2, y  $\beta$ -SGP a la banda 4.1 (el término banda se aplica a la identificación de SDS-PAGE en la electroforesis), y a la actina. El heterodímero se agrega a los enlaces de la actina y la espectrina, y promueve el enlace de los mismos.

\* indica que la proteína Rho(D), es adherida al citoesqueleto pero que el sitio de la adherencia no se ha establecido.

#### 2.3.4.- ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS ABH Y SU LOCALIZACION.

La investigación de los Grupos Sanguíneos principió con las sustancias halladas en forma hidrosoluble en los líquidos corporales. El trabajo se facilitó con el hallazgo del líquido de los quistes -- ováricos, el cual constituía una fuente rica de sustancias ABH. Los antígenos ABH se encuentran en plasma y secreciones particularmente en saliva en algunos individuos; también están presentes en las secreciones del tubo gastrointestinal superior, el líquido seminal, el líquido amniótico y calostro; en las excreciones como la orina y las heces (por ejemplo: el meconio); en las bacterias y en algunos animales, como en el caso de las células de cerdo ( $A^P$ ), las cuales se han utilizado para diferenciar los anti-A "inmunes" y "naturales"; sólo las aglutininas anti-A (inmunes) son adsorbidas por las células  $A^P$ . (21,28)

Los determinantes antigénicos A, B y H son estructuras de carbohidratos que están compuestas por las cadenas de oligosacáridos extensas y complejas que conforman a las glicoproteínas y a los glicolípidos. Los determinantes antigénicos fueron primeramente aislados e identificados de la degradación de productos ácidos y alcalinos que provienen de glicoproteínas específicas de los grupos -- sanguíneos y de estructuras que asignan la especificidad de A, B y H en los glicolípidos y oligosacáridos. (21,32,38,28)

La especificidad antigénica está en los azúcares terminales de un oligosacárido. Las moléculas glicolípídicas se encuentran unidas a las esfingolisinas y a los ácidos grasos, mientras que las glicoproteínas están unidas a estructuras peptídicas. (21,33,38)

Los antígenos ABH en los glicoesfingolípidos y glicoproteínas sintetizadas por precursores de los eritrocitos son comúnmente parejas de cadenas tipo 2 (Gal-( $\beta$ -1-4)GlcNAc-R); los mismos antígenos glicoesfingolípidos en plasma y saliva son parejas de tipo 1 ----- (Gal( $\beta$ -1-3)GlcNAc-R, (Ver Tabla 6). (21,35)

TABLA 6.- ESTRUCTURAS BIOQUIMICAS DE LOS ANTIGENOS ABH. (27)

GRUPOS SANGUINEOS	SECRECIONES (CADENAS TIPO 1)	CELULAS SANGUINEAS (CADENAS TIPO 2)
H	Gal( $\beta$ -1-3)GlcNAc-R Fuc( $\alpha$ -1-2)	Gal( $\beta$ -1-4)GlcNAc-R Fuc( $\alpha$ -1-2)
A	GalNAc( $\alpha$ -1-3) Fuc( $\alpha$ -1-2) \diagup Gal( $\beta$ -1-3)GlcNAc-R	GalNAc( $\alpha$ -1-3) Fuc( $\alpha$ -1-2) \diagup Gal( $\beta$ -1-4)GlcNAc-R
B	Gal( $\beta$ -1-3) Fuc( $\alpha$ -1-2) \diagup Gal( $\beta$ -1-3)GlcNAc-R	Gal( $\alpha$ -1-3) Fuc( $\alpha$ -1-2) \diagup Gal( $\beta$ -1-4)GlcNAc-R

GlcNAc = N-Acetilglucosamina.

Las estructuras activas (enzimas transferasas), que conjugan los azúcares a un carbohidrato precursor (sustancia H) son la N-Acetilgalactosamina en el grupo sanguíneo A y la galactosa en el grupo sanguíneo B. la sustancia precursora que es el antígeno H, lo tiene el grupo sanguíneo O y su estructura activa es la fucosa que forma parte de los grupos sanguíneos A y B. Los azúcares terminales están unidos por una  $\alpha$ -ligasa en la posición C-3 del resto de la galactosa subterminal, el cual es también sustituido en C-2 con la fucosa  $\alpha$ -ligasa. (Ver Tabla 7). (38)



TABLA 7.- DETERMINANTES ANTIGENICOS DE ESTRUCTURAS A, B y H  
Y LOS PRODUCTOS ENZIMICOS DE LOS GENES DE LOS ---  
GRUPOS SANGUINEOS. (38)

ESPECIFICIDAD	ESTRUCTURA	PRODUCTO DEL GENE (TRANSFERASAS)
A	$\text{GalNAc}\alpha\text{-1}\rightarrow\text{3Gal}\beta\text{-R}$ $\uparrow$ 1,2 $\text{Fuc}\text{-}\alpha$	$\alpha$ -3Nacetilgalactosami niltransferasa.
B	$\text{Gal}\alpha\text{1}\rightarrow\text{3Gal}\beta\text{-R}$ $\uparrow$ 1,2 $\text{Fuc}\text{-}\alpha$	$\alpha$ -3Galactosiltransfe- rasa.
H	$\text{Gal}\beta\text{-R}$ $\uparrow$ 1,2 $\text{Fuc}\text{-}\alpha$	$\alpha$ -2-Fucosiltransfera sa.

GalNAc = NAcetil-D-Galactosamina; Gal = D-Galactosa; Fuc = Fucosa;  
R = Resto de la Molécula.

### 2.3.5.- IDENTIFICACION DE LOS GRUPOS SANGUINEOS.

En el experimento original de Landsteiner, el suero de cada individuo de lotes determinados fue probado contra sus propios eritrocitos y contra los eritrocitos de todos los demás; tres patrones diferentes de reacción se obtuvieron inicialmente, dos de ellos más comunes que el tercero. Las células que no reaccionaron, con ninguna de las muestras de suero fueron a las que se designaron como grupo O. Después a los eritrocitos más frecuentemente aglutinados se les denominó grupo "A" y los restantes grupo "B"; por lo que esto significa que para identificar a los Grupos Sanguíneos se realiza una -- reacción de aglutinación. Las reacciones de aglutinación de los eritrocitos con sueros anti-A y anti-B, cuyos sueros provienen en el caso de los sueros anti-A, de individuos con células sanguíneas --- tipo "B", y en relación a los sueros anti-B, de individuos con células sanguíneas tipo A, lo que permite que se lleve a cabo la reactividad de los sueros sanguíneos con eritrocitos conocidos y además la identificación de Grupos Sanguíneos, donde las Técnicas de Aglutinación, son aplicables en la actualidad principalmente en Bancos de Sangre para éste tipo de determinaciones, (Ver Tabla 8).(26)

TABLA 8.- DETERMINACION DEL GRUPO SANGUINEO ABO EN CELULAS Y SUERO.  
(26)

FENOTIPOS (GRUPOS SANGUINEOS)	REACCIONES DE ERITROCITOS CON SUEROS		REACCIONES DEL SUERO CON ERITROCITOS		
	ANTI-A	ANTI-B	CELULAS A	CELULAS B	CELULAS O
O	-	-	+	+	-
A	+	-	-	+	-
B	-	+	+	-	-
AB	+	+	-	-	-

(-)= Aglutinación ausente; (+)= Aglutinación presente; Pruebas a Temp. Ambiente.

#### 2.4.- DESCRIPCIÓN DE LOS ANTICUERPOS.

Los anticuerpos se definen como moléculas protéicas séricas específicas producidas en el tejido linfóide, los cuales son el resultado de la estimulación provocada por la presencia de un antígeno.

Los anticuerpos son capaces de unirse tanto in vivo como in vitro con los antígenos responsables de su producción. (22,32,39)

Aunque el trabajo de von Behring y colaboradores (1890), demuestra la presencia de anticuerpos (o antitoxinas), en el suero de animales inmunizados, no es sino hasta 1938 cuando Tiselius y Kabat descubren que la actividad del anticuerpo está asociado con la fracción gama-globulina, gracias a la Técnica de Electroforesis elaborada por Tiselius en 1937, ésta Técnica había demostrado que las proteínas plasmáticas podían separarse con base a su movilidad en un campo eléctrico. (7,22,31,39)

Las gama globulinas son un grupo heterogéneo de proteínas que se subdividen en clases en base a la diferencia que existe en sus estructuras moleculares y de acuerdo a su comportamiento fisicoquímico, inmunológico y biológico. (7,31,32,39)

Encontramos que hay cinco clases de proteínas que actúan como anticuerpos, conocidos también como inmunoglobulinas (Ig) término que se decidió en 1964: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. (7,22,31,32)

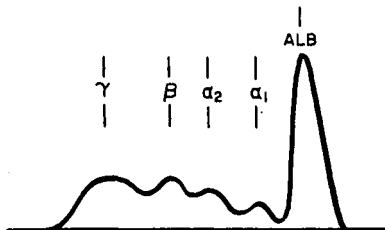
Poblaciones diferentes de inmunoglobulinas se hallan también en proporción variable en los líquidos extravasculares, en las secreciones exócrinas y sobre la superficie de algunos linfocitos. (31)

Los anticuerpos de los Grupos Sanguíneos, pertenecen a las tres --

primeras clases, pero en la práctica de las más importantes son las inmunoglobulinas IgG e IgM. ( 32,39)

En la siguiente figura se muestra la posición de las inmunoglobulinas después de su separación por Electroforesis, (Figura III).(39)

BANDAS DE ACETATO  
DE CELULOSA



INMUNOELECTROFORESIS

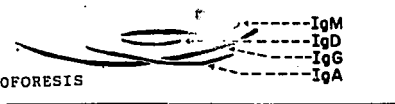


FIGURA III.- La separación electroforética de las proteínas de suero humano. Se observa el amplio número de inmunoglobulinas antigénicamente diferentes que se encuentran en el área de la región gama.( 39 )

Los métodos utilizados para el aislamiento de las inmunoglobulinas se refieren básicamente a su naturaleza proteica; a la diferencia, en cuanto a su solubilidad en varios solventes. Ejemplos de Métodos de Aislamiento lo encontramos en la Tabla 9. (31)

TABLA 9.- METODOS DE AISLAMIENTO DE LAS INMUNOGLOBULINAS. (31)

M E T O D O S	E J E M P L O S
<p>A).- Precipitación Fraccional:</p> <p>i).- Sales Neutras.</p> <p>ii).- Solventes Orgánicos</p> <p>iii).- Iones Metálicos</p> <p>iv).- Cationes Orgánicos</p>	<p>Sulfato de Amonio</p> <p>Sulfato de Sodio.</p> <p>Etanol.</p> <p>Zinc.</p> <p>Rivanol</p> <p>(2-Etoxi-6,9,Diamino- acridina Lactato)</p>
<p>B).- Separación Electroforética:</p> <p>Soporte Sólido</p>	<p>Zona electrónica en celulosa, acrilamida, gel de almidón, Pevikón.</p>
<p>C).- Cromatografía de Intercambio Iónico.</p>	<p>Diethylaminoetilcelulosa.</p> <p>Carboximetilcelulosa.</p>
<p>D).- Filtración en Gel.</p>	<p>Sephadex G-200</p>
<p>E).- Ultracentrifugación.</p>	<p>Ultracentrifugación preparada en gradientes de sales o azúcares.</p>

Dos descubrimientos importantes inician el estudio estructural detallado de los anticuerpos. El primer hallazgo se refiere a las enzimas realizado por Porter en la década de 1950 con la papaína y el segundo por Edelman y Poulik en 1961 con agentes reductores con -- mercaptanol t alquilación con urea 8M.; éstos dos descubrimientos podían ser empleados para digerir y disociar las moléculas de inmunoglobulinas en componentes más pequeños. Con éste tratamiento fué posible separar y caracterizar por electroforesis dos bandas: una correspondiente a las cadenas pesadas denominadas H (del inglés -- heavy), que contenían cerca de 420 aminoácidos y la otra correspondiente a las cadenas ligeras denominadas L (del inglés light) y de aproximadamente 210 aminoácidos cada una. (21,22,32)

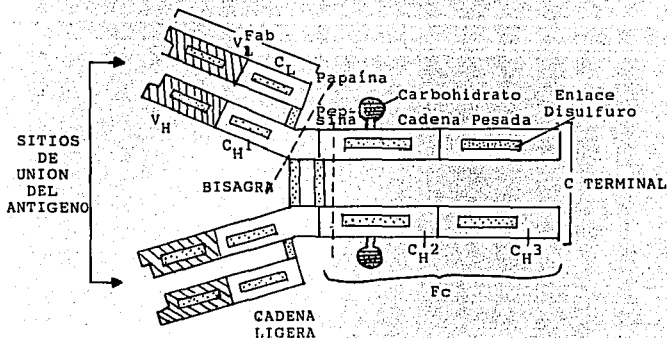
En todas las inmunoglobulinas, las dos cadenas ligeras son idénticas entre sí en todos los aspectos, al igual que las dos cadenas pesadas y pueden representarse con la fórmula general:  $(H_2L_2)_n$ .

La región (V), conocida como la región variable es una cadena polipeptídica que contiene una porción amino terminal y la región constante (C) con una porción carboxilo terminal. Estos términos denotan la variabilidad de los aminoácidos residuales en la región V en comparación con la región C. La región V es la que está implicada en la combinación con el antígeno a través de unos cuantos aminoácidos de la cadena H y L (región hipervariable). (21,22,32)

Las cadenas polipeptídicas de las inmunoglobulinas están dobladas, con una conformación definida en parte por enlaces disulfuro intra cadena, en regiones globulares llamadas dominios. En las cadenas pesadas, éstos dominios se designan  $V_H$  y  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , y  $C_{H4}$ ; y en las cadenas ligeras:  $V_L$  y  $C_L$ . (21,22)

Las cadenas ligeras que constituyen las inmunoglobulinas son de dos tipos: Kapa ( $\kappa$ ) y Lambda ( $\lambda$ ). (21,22,32)

La estructura básica de la inmunoglobulina es una molécula de cuatro cadenas bilateralmente simétrica (FIG. IV) (21, 37)



**FIG.- IV:** ESQUEMA DE LA MOLECULA IgG. Los dominios constante (C) y variable (V) de las Cadenas Pesadas (H) y ligeras (L) se presentan junto con las cadenas, las uniones disulfuro intra e intercadena las cuales están sujetas entre ellas. Los sitios de unión del antígeno están situados en los surcos entre las partes terminales de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Los sitios de unión de las cadenas de carbohidratos se representan como: (●), aunque todavía no se conoce su función, lo que sí es que cuando no están presentes disminuyen la actividad funcional de las Ig. Después del tratamiento con papaína la molécula IgG se divide en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc; después de tratar con pepsina, los dos fragmentos Fab, se quedan unidos por enlaces disulfuro como un fragmento (Fab)<sub>2</sub> y el fragmento Fc se desintegra. (21,26,32)

Se ha encontrado que las cadenas ligeras K y  $\lambda$  están presentes en el hombre en una proporción de 2:1 respectivamente.

Los fragmentos Fab y Fc son producidos por la enzima papaína en donde Fab es conocido como fijadores del antígeno (antigen-binding) y el fragmento Fc como fragmento cristalizable. (7,22,31,32)

Los enlaces disulfuro son enlaces químicos (S-S), entre los residuos de cisteína, son esenciales para la estructura normal tridimensional de las inmunoglobulinas. Estos enlaces pueden ser intercadena (de cadena H a cadena H, de cadena H a cadena L, de cadena L a cadena L) o intercadena. (7,22,32)

Las cadenas H de una molécula de inmunoglobulina reciben la letra griega que corresponde a la letra de cada clase. La cadena H de la IgA alfa ( $\alpha$ ), IgG gama ( $\gamma$ ), IgD delta ( $\delta$ ), IgE epsilon ( $\epsilon$ ) e IgM mu ( $\mu$ ). (Ver Tabla 10). (22,32,39)



TABLA 10.- PROPIEDADES DE LAS INMUNOGLOBULINAS HUMANAS. (32)

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Clase de cadenas H	$\gamma$	$\alpha$	$\mu$	$\delta$	$\epsilon$
Subclase de cadenas H	$\delta_1, \delta_2, \delta_3, \delta_4$	$\alpha_1, \alpha_2$	$A_1, A_2$		
Tipo de cadenas L	$K, \lambda$	$K, \lambda$	$K, \lambda$	$K, \lambda$	$K, \lambda$
Fórmula molecular	$\delta_2 L_2$	$\alpha_2 L_2 6$ $(\alpha_2 L_2)_2 CS^* J^\bullet$	$(\mu_2 L_2)_5 J^\bullet$	$\delta_2 L_2$	$\epsilon_2 L_2$
Coefficiente de Sedimentación (S)	6 - 7	7	19	7 - 8	8
Peso Molecular (aproximado)	150 000	160 000 * 400 000 ♦	900 000	180 000	190 000
Movilidad electroforética (promedio)	$\gamma$	$\delta$ rápida a $\beta$	$\delta$ rápida a $\beta$	$\delta$ rápida	$\delta$ rápida
Fijación del complemento (clásico)	+	0	+++	0	0
Concentración sérica (aprox. $\frac{mg}{100 ml}$ )	1 000	200	120	3	0.05
Vida media en el suero (días)	23	6	5	2 - 8	1 - 5
Transferencia placentaria	+	0	0	0	0
Actividad reagínica	?	0	0	0	+++
Lisis antibacteriana	+	+	+++	?	?
Actividad antiviral	+	+++	+	?	?

\* Para IgA Sérica monomérica.

♦ Para IgA secretoria

▲ Componente secretorio

■ Cadena J

## 2.5.- ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES.

### 2.5.1.- ANTECEDENTES DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES.

Para la identificación de los diferentes grupos sanguíneos en ---- Banco de Sangre y en alguna otra Area Clínica, ha sido importante - emplear sueros hemotipificadores. La mayoría de ellos son específicos y se pueden adquirir comercialmente. Para obtenerlos es indispensable estimular la producción de anticuerpos, en un individuo -- que ha sido inmunizado contra un determinado antígeno (polipéptidos, polisacáridos, etc.), y contra distintos determinantes antigénicos (epítopes) de cada uno de esos componentes. Cada determinante antigénico podrá a su vez ser reconocido por más de un anticuerpo con - diferentes afinidades. (11,18,19,21)

En base a la especificidad y obtención de los sueros hemotipifica-- dores se han clasificado como sueros monoclonales y sueros policlo-- nales (éstos últimos conocidos en bibliografía como antisueros).--- (17,21,40)

Para poder comprender la producción de los anticuerpos es necesario tomar en cuenta los aspectos celulares de la respuesta inmunitaria. Los linfocitos son muy importantes para iniciar la producción de -- anticuerpos y existen dos poblaciones de ellos. Ambas provienen de los hemocitoblastos de la médula ósea, pero una población conocida, como los linfocitos "T", son procesados a través del timo, mientras que los otros linfocitos llamados "B", provienen de la Bolsa de Fabricio (órgano linfoide de la parte posterior del intestino en las aves), y en los mamíferos producidas en el hígado fetal cuando las células madre hematopoyéticas migran desde el saco vitelino (ésto - durante la octava semana de gestación). (7,19,32)

Ambas poblaciones de linfocitos proliferan cuando aparece el estímulo del antígeno y muestran cambios morfológicos.

Los linfocitos T son necesarios para diferentes tipos de reacciones como regular la producción de inmunoglobulinas, mediar la hipersensibilidad tardía y destruir células infectadas por virus. Estos linfocitos no producen anticuerpos circulantes, ni dan origen a células secretoras de anticuerpos. (32)

Los linfocitos B se transforman en células plasmáticas, las cuales sintetizan y secretan anticuerpos. Se piensa que cada linfocito B está genéticamente preparado para sintetizar un anticuerpo específico y que las moléculas del anticuerpo son sintetizadas dentro de la superficie celular como receptores. Estamos hablando de linfocitos diferentes, por lo tanto, de diferentes anticuerpos que al ser sintetizados en el interior de la superficie celular, existe potencial para la producción de un amplio espectro de especificidades. Cualquier antígeno se combinará con aquellos linfocitos que tengan el anticuerpo mejor dotado. En esta forma los linfocitos son estimulados a dividirse finalmente, formando clonas de células plasmáticas que sintetizan anticuerpos de la misma especificidad como el sintetizado en la célula progenitora. Algunas de las células producidas, revierten a linfocitos pequeños y actúan como células de memoria. Estas células con memoria toman parte en la respuesta inmunitaria secundaria. (7,32)

Es posible la situación en la que después del primer encuentro con el antígeno, la respuesta inmunitaria se detiene en el punto de producción clonal y ya no llega hasta la producción de anticuerpos circulantes localizables. Las células que se han formado pero que

no han madurado, son células conocidas como "células primarias". - Este tipo de respuesta primaria se observa en la isoimmunización - con el antígeno Rh. Si la complementariedad de la unión del sitio - del receptor original con el antígeno es cercana, la clona final - de células producirá moléculas de anticuerpos con una elevada capa - cidad de combinación para dicho antígeno. Si la unión es de menor - calidad, se producirán anticuerpos con una menor capacidad de com - binación. Para cualquier estímulo aislado emergerá una gama de an - ticuerpos con una gran variedad de capacidades combinatorias. Esto es debido a que la clonación y la producción de anticuerpos pueden ser iniciados por "numerosas uniones", entre el receptor original - y el antígeno estimulante. (7,32)

## 2.5.2.- ANTICUERPOS POLICLONALES.

### 2.5.2.1.- DESCRIPCION DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.

Como ya se ha mencionado la producción de anticuerpos se lleva a cabo cuando una sustancia extraña penetra o se inyecta en el cuerpo de un individuo. Estos anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina con sitios de combinación que reconocen la forma de los determinantes (epítopes), situados en la superficie de la sustancia extraña o antígeno. (18,19,21)

La reacción Ag-Ac desencadena ciertos procesos capaces de neutralizar y eliminar la sustancia extraña. Los anticuerpos han constituido una herramienta importante para los investigadores que han aprovechado su especificidad para identificar y marcar determinadas células o moléculas y separarlas luego de una mezcla. (19)

La respuesta del anticuerpo a un antígeno es muy heterogénea. En el bazo de un ratón o un hombre hay hasta  $10^6$  de estirpes celulares distintas de linfocitos B (células precursoras de las células plasmáticas). Aunque todas derivan de un tronco celular común cada estirpe adquiere la capacidad de fabricar un anticuerpo de manera autónoma que reconoce a un determinante antigénico diferente; ésto es, cuando se inocula un agente inmunizante a un individuo, éste responde elaborando anticuerpos dirigidos contra las diferentes moléculas antigénicas del material inoculado y los distintos determinantes de un sólo antígeno y produce también diferentes anticuerpos que se acoplan más o menos bien a un mismo determinante, (Figura V). (19)

El conjunto de los anticuerpos producidos, secretados hacia el suero del individuo inmunizado constituye el antisuero; es pues una mezcla heterogénea de anticuerpos capaces de reaccionar con --

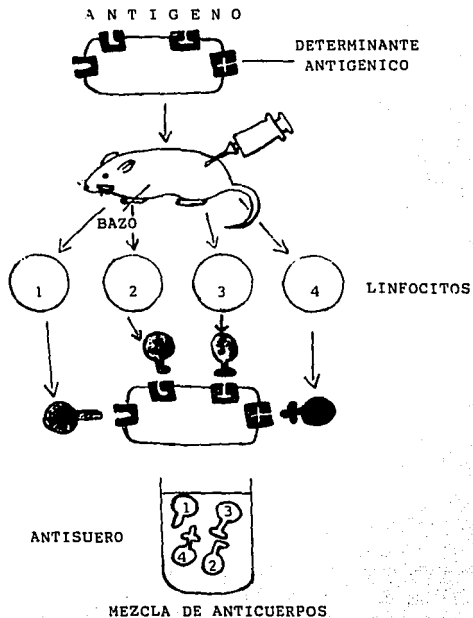


FIGURA V.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES.

La respuesta inmune se inicia cuando una molécula de antígeno, portadora de varios determinantes antigénicos diferentes, penetra en el cuerpo del animal. La respuesta del sistema inmune implica una proliferación de estirpes de linfocitos B. Cada estirpe segrega moléculas de inmunoglobulinas que se acoplan a un único determinante antigénico, o a una parte del mismo. El antisuero convencional contiene una mezcla de anticuerpos. (18;19)

el antígeno. También al antisuero se le puede dar el nombre de suero hemotipificador policlonal; suero hemotipificador porque nos permite identificar los determinantes antigénicos que se quieran conocer, y policlonal por la heterogeneidad de los anticuerpos. (18)

Dada la naturaleza dinámica del Sistema Inmune, la composición del antisuero o suero hemotipificador está sometida a un cambio continuo en el individuo inmunizado, lo cual sumado a las diferencias propias entre individuos, hace que dicha mezcla sea además de heterogénea irreproducible. (18)

Si el individuo no ha sido estimulado por un determinado antígeno, como en el caso de los grupos sanguíneos ABO, la primera dosis del mismo inicia una respuesta primaria, que no es observable de inmediato. Es necesario que transcurran de 5 a 10 días, o hasta 6 meses para hallar anticuerpos en el suero; pero pudieran no parecer. Si se administra una segunda dosis o un mayor número de los mismos, el anticuerpo se produce con mayor rapidez, se alcanzan cifras elevadas en el suero las cuales se sostienen por periodos prolongados; el nivel de anticuerpos se eleva lentamente hasta alcanzar una cima o meseta y después declina, si no aparece un estímulo subsiguiente desaparecerá, aunque esta cifra de anticuerpos, permancene por meses o hasta años. Se requiere de una dosis menor de antígeno para iniciar la respuesta secundaria. (7,21)

También la naturaleza de la población de anticuerpos cambia. Sabemos que los anticuerpos IgM, son producto de la respuesta primaria en forma predominante, y que después en la respuesta secundaria aparecen los anticuerpos IgG, para el caso del Sistema Rh, la capacidad de combinación del anticuerpo con el antígeno aumenta y existe mayor com

plementariedad entre el antígeno y el anticuerpo. Los estímulos antigénicos repetidos pueden ampliar la especificidad del suero, en particular si el antígeno es una molécula compleja con numerosos grupos químicos, cada uno actuando como un determinante. (7)

#### 2.5.2.2.- FUENTES DE OBTENCION.

La importancia de inmunizar a un individuo ha tenido una gran aplicación para la producción de los antisueros o sueros hemotípicos, y éste es fundamental a nivel de Bancos de Sangre, precisamente porque su aplicación se basa en la identificación de los diferentes grupos sanguíneos que existen en la actualidad.

El plasma utilizado se obtiene de donadores hiperinmunizados, sanos a los cuales se les sensibiliza con sustancias específicas. Estos donadores deben ser negativos a los antígenos del virus de la Hepatitis B y a los anticuerpos del virus del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida o virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). (6)

El anti-A se obtiene de voluntarios tipo B que han respondido a --inoculaciones de sustancia A porcina, la cual se obtiene de la mucosa del estómago del puerco, para estimular la producción de anticuerpos de existencia "natural". Se sabe que algunos centros europeos de transfusión sanguínea utilizan un anti-A preparado a partir de glándulas albuminoideas y huevos de un caracol (Helix pomatia); la adición de un huevo de H. pomatia a 100 ml. de solución --al inocularlo al individuo produce un potente reactivo anti-A. (21)

El anti-B se obtiene de voluntarios tipo A que han respondido a inyecciones de sustancia B equina la cual proviene de la mucosa del estómago del caballo. (21)



El anti-AB, se obtiene de voluntarios tipo 0 que han respondido a - inoculaciones de las sustancias A porcina y B equina. El suero debe aglutinar los subtipos débiles de A (por ejemplo: A<sub>3</sub> y A<sub>x</sub>), como - también las células A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y B. (32)

La lectina anti-H, se obtiene de las semillas de Dolichos biflorus. El extracto convenientemente diluido, aglutina células A<sub>1</sub>, pero no a las células A<sub>2</sub>, B ó 0. Se tiene conocimiento que la lectina anti h, también se obtiene de las semillas Ulex europeus (aulaga europea común); ésta lectina se utiliza en las pruebas de inhibición - de hemaglutinación para detectar antígeno H en saliva (21,32)

El anti-Rho (D) se obtiene de individuos Rho(D) negativos inmuniza dos por transfusión o embarazo o de voluntarios varones que respon den a inoculaciones de pequeños volúmenes de células Rho(D) positi vas. (32)

Los reactivos antiglobulina se preparan a partir de sueros de ani males (conejos, cabras u ovejas), inmunizados con IgG humana o con componentes del complemento (por ejemplo C<sub>3</sub>). El reactivo debe es tar libre de heteroaglutininas contra eritrocitos humanos normales. El suero antiglobulina proporcionado para uso en otras técnicas -- (por ejemplo inmunolectroforesis), contiene usualmente hemaglu ti ninas potentes, por lo tanto debe ser adsorbido con eritrocitos - humanos normales o bien diluido de tal manera que no reaccione con células normales. (21,32)

Para nuestro estudio en particular, los sueros hemotipificadores - policlonales son sueros humanos que contienen uno o más anticuer -- pos contra los Grupos Sangüíneos A, B y AB. Las características de éstos sueros es que deben estar en estado líquido, ser transparentes y estar libres de bacterias, partículas extrañas y otras ----

características que permitan identificar a cada uno de los sueros, del Sistema ABO. (32):

El suero Anti-A, es de color azul, libre de partículas extrañas y translúcido. El suero Anti-B es de color amarillo, libre de partículas y translúcido. El suero Anti-AB es translúcido y libre de -- partículas. Estas características también se encuentran presentes en los sueros hemotipificadores monoclonales del Sistema Sanguíneo ABO. (6,16)

#### 2.5.2.3.- CONTROLES EN LA OBTENCIÓN DE SUEROS HEMOTIPIFICADORES PARA GRUPOS SANGUÍNEOS. (26)

En todas las determinaciones de grupos sanguíneos, se deben incluir controles para demostrar que las células y sueros hemotipificadores estándar dan las reacciones esperadas y que las células y sueros -- desconocidos no dan reacciones falsas.

Por ejemplo en el caso de las células antigénicas tipo B, se requieren tres controles:

- 1).- Células conocidas tipo B frente al suero anti-B.
- 2).- Células cuyo resultado sea negativo como en el caso de las células tipo O frente al suero anti-B.
- 3).- Células por tipificar en su propio suero anti-B.

Para los sueros hemotipificadores se tienen sueros de referencia -- (liofilizados), establecidos por el National Institutes of Health - Food and Drug Administration, que permiten evaluar la calidad del suero obtenido.

### 2.5.3.- ANTICUERPOS MONOCLONALES.

#### 2.5.3.1.- DESCUBRIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS.

La fusión de células somáticas fué observado por primera vez a fines del siglo pasado, y el primer aislamiento de una célula somática híbrida se produjo a principios de la década de los sesentas. - El desarrollo de medios selectivos por Littlefield y el uso de nuevos agentes de fusión aumentaron la frecuencia de formación de híbridos y facilitaron su producción. (15,18,19)

La Teoría de la Selección Clonal presentada por Burnet en 1959, -- plantea que cada célula produce sólo un anticuerpo en respuesta a su estimulación, teoría en la que se propone la idea de la Monoclonalidad. Esta idea permitió comprender la naturaleza del mieloma múltiple, enfermedad provocada por la proliferación de un clon celular en la que todas las células producen una misma inmunoglobulina. La paraproteína (anticuerpos de Bence Jones), del suero de pacientes de ésta enfermedad fue la primera fuente de inmunoglobulinas monoclonales. Los mielomas son tumores malignos del sistema inmune. -- (15,18,19,40)

Por lo anterior en 1972, Potter indujo la aparición de mielomas en ratones, lo que permitió disponer de líneas celulares productoras de anticuerpos químicamente homogéneos. Estos mielomas produjeron grandes cantidades de inmunoglobulinas monoclonales, pero no se logró inducir tumores que sintetizaran anticuerpos contra un antígeno inyectado específicamente. (15,18,19,40)

Algunos investigadores intentaron obtener anticuerpos homogéneos -- mediante la transformación de linfocitos B con virus tales como: -- Epstein-Barr, SV-40 y Moloney, lo que permitió el establecimiento de algunas líneas productoras de anticuerpos específicos que secre

tan muy pequeñas cantidades de anticuerpos. Leo Sachs, Kenko Horibata Edwin S. Lenox y Melvin Cohn, consiguieron mantener en cultivo una-estirpe celular de mieloma de ratón pero ésta se perdió. Posteriormente Horibata y A.W. Harris establecieron varias estirpes que distribuyeron otros laboratorios. (18,19,29)

Se intentó también la inmortalización y el clonado de células productoras de anticuerpos mediante la proliferación in vivo. La técnica desarrollada por Askonas y Williamson, consiste en obtener trozos de bazo de animales inmunizados que contengan en promedio una sola célula productora de anticuerpos contra el antígeno inmunizante; cada uno de los trozos es transfundido a un huésped irradiado--junto con el antígeno, tras sucesivos pases, y se logran preparaciones monoclonales pero no ha dado resultado una verdadera inmortalización por éste método. (18,19,29)

En 1975 Köler y Milstein consiguen fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos de bazo de ratones inmunizados con eritrocitos de carnero. Las células del mieloma híbrido resultante o "hibridoma" expresaban tanto la propiedad del linfocito de producir anticuerpos específicos como el carácter inmortal de las células mielómicas. -- Estas células híbridas pueden trabajarse mediante técnicas aplicables a los cultivos permanentes de células mielómicas. Cada célula-híbrida puede clonarse, y cada clona produce grandes cantidades de un anticuerpo específico para un solo determinante antigénico. A su vez las clonas pueden conservarse indefinidamente y en cualquier momento pueden tomarse muestras de ellos para su cultivo o inyección en animales a fin de obtener un anticuerpo monoclonal a gran escala. Por el desarrollo de ésta metodología, en 1984 Köler y Milstein reciben el Premio Nobel de Medicina. (19,40)

### 2.5.3.2.- CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Milstein y Köler, mencionan que la síntesis de anticuerpos está -- regulada por dos conjuntos de genes; uno de ellos codifica la re-- gión variable de las cadenas ligera y pesada de la molécula de an-- ticuerpo, región responsable de su especificidad; y el otro deter-- mina la región constante, de la que dependen funciones realizado-- ras tales como el enlace del complemento (un complejo de proteínas del plasma sanguíneo implicado en la respuesta inmune), el trans-- porte de la molécula de anticuerpo a través de las membranas y su-- unión a ellas. Cada linfocito sintetiza un anticuerpo codificado -- por un único par de genes V (de variable) y C (de constante); de -- entre el gran repertorio de tales genes que hay en la célula. Cuan-- do existen diferentes alelos, formas variables de los genes V o C, en cada uno de los cromosomas de la célula, solo el alelo de un -- cromosoma se muestra activo; el otro queda excluido. (2,19)

Los orígenes de los hibridomas productores de anticuerpos se reali-- zan para estudiar la expresión genética y la regulación de la pro-- ducción de inmunoglobulinas en células de mieloma, lo que permitió la realización de importantes observaciones para afirmar la metodo-- logía entre ellas: a) la fusión de dos células productoras de anti-- cuerpos (linfocitos B y células de mieloma), conduce a la formación de células de mieloma híbrido por asociación al azar de cadenas pe-- sadas y ligeras; b) no se producen nuevas cadenas de inmunoglobuli-- nas, lo que indica la estabilidad en la expresión de las mismas y control independiente de la expresión de los genes de las células-- productoras de los anticuerpos específicos, y c) una variante de -- mieloma que no expresa cadenas ligeras, ni pesadas no suprime en --

las células de mieloma híbrido la producción de la inmunoglobulina codificada por el linfocito B, (Figura VI). ( 18,19,40)

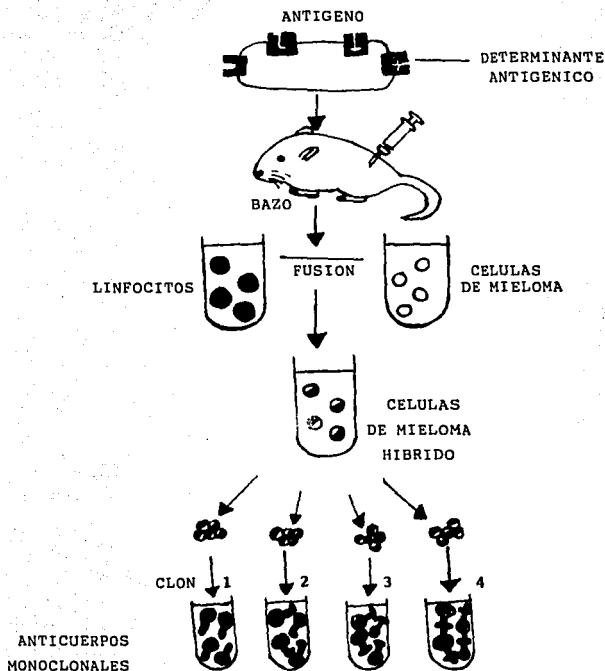


FIGURA VI.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES. Los anticuerpos monoclonales proceden de linfocitos de bazo fusionados con células de mieloma maligno. Se clonan las células híbridas individuales; cada clon segrega un anticuerpo monoclonal, que se acopla específicamente a un único determinante antigénico. ( 19,40)

### 2.5.3.3.- OBTENCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL.

Un anticuerpo monoclonal se define como un reactivo altamente específico, de características homogéneas químicas, físicas e inmunológicas; que pueden reproducirse a voluntad. son anticuerpos específicos porque van dirigidos hacia determinados epítopes en el antígeno. (19,24,40)

La formación de hibridomas se debe a la fusión de células en una suspensión que contiene células esplénicas (esplenocitos), extraídas del ratón o rata inmunizados y células tumorales en división continua como los de mielomas o los de linfomas. La línea celular en división activa se selecciona de acuerdo a dos propiedades distintas: (1) falta de producción o de secreción de inmunoglobulina y (2) carencia de actividad de la hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT). Las células se fusionan por exposición rápida al polietilenglicol por lo que finalmente encontraremos tres poblaciones celulares: esplenocitos, células de mieloma e híbridos. Los híbridos tienen el genoma combinado de las dos líneas celulares paternas y finalmente dejan salir cromosomas y adquieren un estado diploide. La selección para los híbridos se realiza después de la muerte natural de los esplenocitos. La línea de células del mieloma se destruye en el medio HAT (hipoxantina aminopterina timidina), debido a que éstas células que carecen de HPRT no pueden usar hipoxantina exógena para producir purinas. La aminopterina bloquea la síntesis endógena de purinas y pirimidinas y las células mueren. Los híbridos comienzan a duplicarse cada 24 a 48 horas y las colonias se forman con rapidez. (Figura VII). (18,19,32,40)

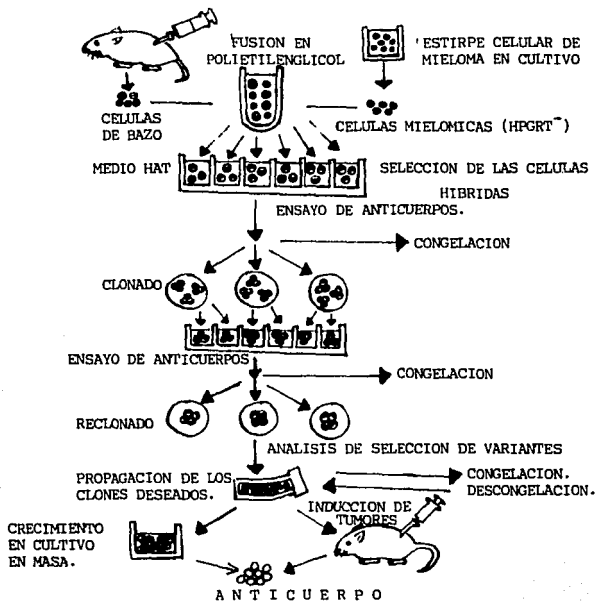


FIGURA VII.- OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.- Comienza con la fusión mediada por el polietilenglicol, de células de bazo de un ratón (o rata) inmunizado, y células mielómicas de ratón (o rata). Los híbridos se seleccionan en HAT, se ensaya el medio para la secreción de anticuerpos y como precaución, se congela una porción de cada cultivo positivo. Se clonan los cultivos positivos y se someten a ensayo los clones. Los que nuevamente resultan positivos se congelan, se reponen y se analiza la presencia de variantes de inmunoglobulina. Por último los clones elegidos pueden conservarse congelados. Al descongelarlos, las muestras pueden bien cultivarse para la producción del anticuerpo o bien inyectarse en animales para inducir mielomas que segreguen el anticuerpo deseado. (18,19,24,29)



## 2.5.4.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES.

### 2.5.4.1.- VENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales tienen varias ventajas sobre los anticuerpos policlonales: (21,32,40)

- 1).- Proporcionan un ilimitado abastecimiento de material idéntico.
- 2).- Es difícil obtener anticuerpos monoclonales no deseados como por ejemplo anticuerpos HLA y anticuerpos de baja frecuencia antigénica; por lo que las pruebas y el control de calidad son remotas.
- 3).- Son independientes de anticuerpos naturales ocurrentes tales como anti-T, por lo que no se obtienen resultados falsos positivos.
- 4).- Son independientes del virus de la hepatitis y del HIV.
- 5).- Su uso evita la necesidad de inmunizar a donadores humanos y plasmaferizados.
- 6).- Son específicos por dirigirse hacia un determinado epítoto antigénico.

\*Anti-T.- Estos anticuerpos se activan en presencia del antígeno T que se encuentra oculto en células rojas humanas y pueden estar expuestos por la acción de la neuraminidasa viral o bacterial. El anti-T está presente en el suero de todos los individuos excepto en recién nacidos. El antígeno T puede ser identificado por los sueros policlonales anti-A y anti-B.

#### 2.5.4.2.- DESVENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

- 1).- Por su alta especificidad pueden variar a diferentes concentraciones, por lo que las pruebas para su estandarización deben ser cuidadosamente empleadas.
- 2).- Se ha mencionado al pH como uno de los factores que alteran la afinidad de enlace en los anticuerpos. Mosmann y colaboradores encontraron que el factor afecta particularmente a los anticuerpos monoclonales y señalan que pueden tener un profundo efecto sobre su aparente especificidad como sucede en el caso de las pruebas HLA, en los cuales envuelven muchas semejanzas pero no con antígenos idénticos. Dos anticuerpos monoclonales dan reacciones no específicas a pH's normales, pudiendo estar hechos monoespecíficamente por pH's muy bajos hasta 6.0.
- 3).- Un problema asociado con algunos anticuerpos monoclonales de alta afinidad son las reacciones cruzadas. Parece contradictorio que ésto suceda en un anticuerpo aparentemente específico, sin embargo las moléculas de anticuerpos no son específicos para un epítope en particular. Los sitios de combinación al final de la región Fab, es capaz de unirse con un número aproximado de diferentes configuraciones epitópicas. Se presume que las combinaciones más fuertes de un anticuerpo con varios determinantes particulares es estar unido a una extensión relacionada con los determinantes antigénicos. Las afinidades de los anticuerpos monoclonales son similares a las de los anticuerpos policlonales, aunque todos los anticuerpos de una simple clona tienen la misma afinidad, mientras que los anticuerpos de una población policlonal tienen una variación de afinidades. (21,32,40)

#### 2.5.4.3.- VENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.

La preparación del anticuerpo policlonal por tener una variedad de inmunoglobulinas que presentan diferentes isotipos permiten:

- 1).- Que actúen contra la molécula antigénica y por consecuencia -- contra la mayoría de sus epítopes antigénicas.
- 2).- Que tengan un rango de diferentes afinidades para el antígeno, ésto permite que forme con más facilidad la red antígeno-anticuerpo.
- 3).- Por la heterogeneidad que presentan éstos anticuerpos los hace ser más ávidos.

#### 2.5.4.4.- DESVENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.

- 1).- Existe un riesgo de obtener anticuerpos no deseados y por lo mismo la posibilidad de que formen reacciones cruzadas.
- 2).- Riesgo de obtener sueros contaminados por virus de HIV y hepatitis B; o por Sífilis y Brucella.
- 3).- Para su obtención es necesario inmunizar donadores humanos.

## 2.6.- REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO.

### 2.6.1.- CARACTERISTICAS DE LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO.

Una de las características más importantes de la reacción antígeno anticuerpo es su especificidad, ésta propiedad permitió a Erlich -- comparar dicha reacción en el ejemplo de la llave y la cerradura.-- La reacción Ag-Ac ocurre en dos etapas:

a).- El sitio de combinación del anticuerpo encuentra a su determinante antigénico específico y se forman enlaces Ag-Ac.

b).- Se forma una red y la reacción se vuelve visible.

En la combinación Ag-Ac aunque intervienen las moléculas integradas de los dos, el sitio a través del cual se combinan es relativamente pequeño ya que del anticuerpo reaccionan solamente el 2% de la superficie total de la inmunoglobulina y la parte del antígeno que se combina con el sitio activo del anticuerpo, es también muy pequeño y es complementario del sitio activo, a ésta pequeña fracción se le denomina: determinante antigénico. (5, 21, 23)

Arrhenius quien observó que la reacción Ag-Ac sigue la Ley de Acción de Masas, la cual se interpreta como la cantidad de los productos es directamente proporcional a la concentración de los reagentes esto es:



Obteniéndose para cada reacción específica una K de asociación --- (Ka) determinada y puesto que se trata de reacciones reversibles - se ve involucrado también una K de disociación (Kd). (12, 21, 39)

Si el Ag y el Ac se ponen en contacto en condiciones óptimas para que reaccionen, la reacción en el sentido de asociación será rápida al principio debido a la actividad relativamente alta de los reactivos a medida que la reacción progresa la actividad de los reactivos irá disminuyendo para irse transformando en complejo Ag-Ac y la velocidad inicial de disociación que es 0 (por no existir el complejo) se irá incrementando hasta que llega un momento en que las velocidades de asociación y disociación son iguales ( $K_a = K_d$ ) y el sistema habrá alcanzado una situación de equilibrio.

$$K_a (Ac) (Ag) = K_d (Ac-Ag)$$

Teniendo en cuenta que la razón de dos constantes es también constante que recibe el nombre de Constante de Equilibrio de la Reacción:

$$\frac{K_a}{K_d} = K_{eq} \quad K_{eq} = \frac{(Ac-Ag)}{(Ac) (Ag)}$$

por otra parte la afinidad del anticuerpo se refiere a la fuerza de interacción entre un determinante antigénico y el sitio de enlacedel anticuerpo. Una alta afinidad del anticuerpo es una unión fuerte con el determinante antigénico para dar un complejo Ag-Ac. Con una baja tendencia de disociarse, y a la inversa una baja afinidad del anticuerpo forma un complejo con el antígeno que requiere menor energía para disociarse. Una manera de medir energía es a partir de K.

La unión Ag-Ac no es tan simple como la representaba Erlich con el ejemplo de la llave y la cerradura, sino que en dicha unión parti-

pan fuerzas moleculares muy variadas.

Las fuerzas intermoleculares contribuyen a la estabilidad del complejo Ag-Ac, pues son las mismas que se encuentran involucradas en la estabilidad de la configuración de proteínas y otras macromoléculas.

Estas fuerzas intermoleculares son fundamentales en la interacción Ag-Ac para su especificidad, como son: Puentes de Hidrógeno, Interacción Apolar o Hidrofóbica, Interacción Iónica o Coulombica, Fuerzas de Van der Waals y Factores Estéricos de Atracción y Repulsión.

( 31 )

#### PUNTES DE HIDROGENO

Se forman de la interacción de un átomo de H covalente enlazado -- a un átomo electronegativo (N, O) por ser tan electronegativos el átomo de H solo comparte en muy pequeña escala el par electrónico del enlace covalente, comportándose como un simple protón ejerciendo una considerable atracción sobre los átomos negativos vecinos.

(Hidróxido) O-H ....O<sup>-</sup>

(Amino) N-H ....O<sup>-</sup>

( " ) N-H ....N<sup>-</sup>

Este tipo de enlaces es predominante exotérmico (Anticuerpos fríos)

#### INTERACCION APOLAR O HIDROFOBICA.

Ciertas cadenas de aminoácidos tales como la Leucina, Isoleucina-- Valina o Fenilalanina no forman puentes de hidrógeno (H), con el agua así que en medio acuoso tales grupos prefieren actuar con cualquier otro grupo que no sea agua. La estabilización de éstos enlaces, es debido a interacciones estructurales de éstos grupos que expulsan agua, ganando así entropía, resultando una fuerte atracción--

entre ellos. Están asociados con anticuerpos calientes.

#### INTERACCION IONICA O COULOMBICA.

Esta interacción es el resultado de atracción entre grupos de cargas opuestas.



#### FUERZAS DE VAN der WAALS.

Quando dos puntos polares se encuentran sumamente cercanos su nube electrónica interactúa induciendo la formación de dipolos oscilantes en las dos moléculas de lo cual resulta una fuerza de atracción.

#### FACTORES ESTERICOS DE ATRACCION Y REPULSION.

Resulta de la complementariedad de la forma de nube electrónica. --  
Un antígeno diferente no tiene una nube electrónica complementaria por lo cual el enlace con el anticuerpo no se realiza y además participan fuerzas de repulsión (por sus nubes).

Quando la nube electrónica del antígeno y anticuerpo son complementarias, la atracción ocurre dando una alta afinidad del anticuerpo.

Estas son las fuerzas que participan en la reacción y son éstas -- quienes condicionan la afinidad y estabilidad de una reacción ---  
Ag-Ac.

Por lo que se refiere al estudio de dicha reacción desde un punto de vista más aplicativo, ésta se ha estudiado observando el efecto que produce un anticuerpo sobre un antígeno específico, algunos anticuerpos precipitan al entrar en contacto con su antígeno, otros se aglutinan, otras hemolizan y en base a ésta acción se les denomina: precipitinas, aglutinina, hemolizinas, etc.

La afinidad es una expresión termodinámica de la energía de unión primaria del anticuerpo por un determinante antigénico, experimentalmente éste término es aplicable a sistemas de hapteno-antihapteno, y existe otro término que aparentemente se ha usado como un sinónimo de la afinidad que se conoce como: avidéz. (31)

La avidéz aunque depende en parte de la afinidad, también involucra factores tales como: valencia del anticuerpo, valencia del antígeno y otros factores no específicos relacionados con la unión Antígeno-Anticuerpo. Por el anticuerpo IgM multivalente, es más ávido por sus múltiples sitios de unión dado a su gran habilidad para unirse al antígeno multivalente, mientras que un IgG, aunque tuviera la misma afinidad por el antígeno disminuiría su avidéz por ser un anticuerpo bivalente, lo que nos lleva a la conclusión de que los términos afinidad no se podrían usar como sinónimos y esto es muy evidente en las Técnicas de Agluctinación. (31)



## 2.6.2.- IMPORTANCIA DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO.

La constante de equilibrio es importante como una medida de compmentariedad de enlace entre el antígeno y el anticuerpo; cuando se eleva, los enlaces entre los dos serán difícilmente rotos.

Factores como el pH, la concentración iónica y la temperatura, --- afectan a la constante de equilibrio, por lo que el efecto que pudieran provocar cualquiera de éstos factores es útil para encontrar las condiciones óptimas para que se lleve a cabo la reacción Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac). ( 5,12,13,21,31)

Esta reacción Ag-Ac, se ha demostrado a través de técnicas como -- son: precipitación, aglutinación y hemólisis.(7,31)

Debido a que las reacciones de aglutinación son las que más se utilizan en Banco de Sangre, en nuestra investigación nos referimos - particularmente a ellas.

La reacción entre un antígeno (eritrocito) y su correspondiente -- anticuerpo, es comúnmente detectado por Reacciones de Aglutinación. Actualmente constituye el fenómeno más observado en la identificación de los Grupos Sanguíneos. Como ya se mencionó anteriormente - se lleva a cabo en dos etapas: Primero los anticuerpos combinan su sitio receptor antigénico específico sobre la superficie de la célula (eritrocito). Durante la segunda etapa los anticuerpos que -- pueden ser moléculas sensibilizadas o recubiertas, se acercan y -- combinan sus sitios receptores antigénicos adicionales a otras células unidas a ellas en amplios agregados formando así una red.

( 7.39)

La primera etapa se ha explicado anteriormente con las reacciones Ag-Ac, así como también se ha mencionado que éstas reacciones sue-

len ser reversibles y que se puede eludir a los anticuerpos de la superficie de los eritrocitos después de que se ha llevado a cabo la aglutinación. ) (31)

La segunda etapa ha sido estudiada por Pollack (1965), se explica los mecanismos fundamentales del fenómeno de aglutinación de los eritrocitos por anticuerpos incompletos ante la presencia de coloides (albúmina bovina más utilizada), y después de un tratamiento con enzimas (por ejemplo la papaína). (23)

Las condiciones normales de los eritrocitos en suspensión tienen carga neta negativa en su superficie, por lo que las cargas se repelen unas a otras, las células normalmente quedan separadas a una cierta distancia, gobernadas por una densidad de cargas netas en su superficie. (39)

Cuando las células son suspendidas en un medio salino los iones en solución se orientan cerca de la superficie de la célula. Como las células flotan a través del medio algunos de éstos iones viajan con él. Se dice que las células están rodeadas por una doble capa difusa o "nube iónica". El margen exterior de la nube se conoce como la superficie trasquiladora. Estas nubes se presentan en la figura (39)

Hay una diferencia entre el potencial electrostático, entre la carga neta negativa en la membrana de la célula y la carga en la superficie trasquiladora, así es que el potencial electrostático que existe entre esos dos puntos es conocido como potencial zeta. (5,39)

El potencial zeta postulado por Pollack es un factor determinante en las fuerzas de repulsión y depende de la carga neta de la superficie de la membrana celular y de la constante dieléctrica que ro-

dea al medio. ( 23,39)

La formación de agregados durante la segunda etapa de aglutinación requiere de la adhesión del anticuerpo con la célula hacia su superficie teniendo que aprovechar otra célula suficientemente cercana para permitir un puente en la molécula del anticuerpo y combinarse con el sitio receptor antigénico en la segunda célula. (31,39)

La distancia exacta que se requiere para la aglutinación óptima -- varía con respecto al sistema que envuelve al complejo Ag-Ac. La distancia depende no solo del tamaño de la molécula producida (Ac) sino también de la localización particular del sitio receptor antigénico. (39)

De lo anterior nos damos cuenta que el número de sitios antigénicos de la molécula son muy importantes para que se lleve a cabo la aglutinación. (39)

A través de experimentos en los cuales un hapteno es covalentemente unido a células eritrocíticas en diferentes cantidades, se encontró que un hapteno de altas densidad es requerido para la aglutinación por anticuerpos IgG que para anticuerpos IgM. Cuando la densidad del hapteno es baja los anticuerpos IgG actúan como anticuerpos incompletos y no aglutinarán a los eritrocitos no tratados.

( 39)

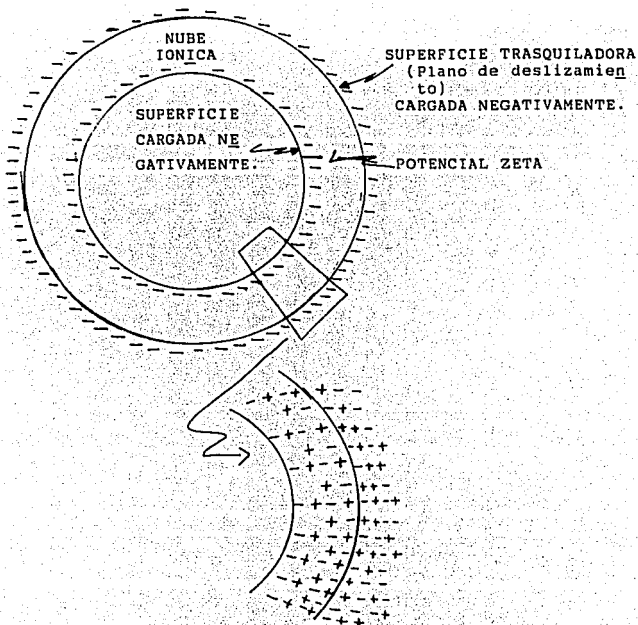


FIGURA VIII. Representación esquemática de las cargas eléctricas que rodean a una partícula en suspensión. (Adaptado por Pollack y colaboradores) ( 39 )

### 2.6.3.- DESCRIPCION DE LA REACCION DE AGLUTINACION.

Una de las ventajas importantes de las Reacciones de Aglutinación son su alto grado de sensibilidad y enorme variedad de sustancias, identificables a través del uso de partículas recubiertas por antígeno o por anticuerpo. (30)

Según Coombs, los tres requerimientos principales en las pruebas de aglutinación son: la disponibilidad de una suspensión estable de células o de partículas, la presencia de uno o más antígenos cercanos a la superficie y el conocimiento de que los anticuerpos "incompletos" o no aglutinables no son localizables sin modificación por ejemplo las reacciones de antiglobulina. (32)

Las reacciones de aglutinación se pueden clasificar en directas e indirectas (pasivas). (30,32)

En la técnica directa simple, un antígeno celular o de partículas insolubles es aglutinado directamente por el anticuerpo. Un ejemplo es la aglutinación de eritrocitos A por sueros anti-A.

La técnica pasiva o indirecta se refiere a la aglutinación de las células recubiertas de antígeno o a las partes inertes que son portadoras pasivas de antígenos solubles, un ejemplo es la fijación del látex para descubrir el factor reumatoide. (32,35)

#### 2.6.4.- IMPORTANCIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS IgM E IgG EN LAS REACCIONES DE AGLUTINACION.

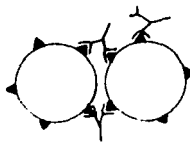
Las aglutininas IgM, están capacitadas para aglutinar eritrocitos en suspensión salina, porque son de mayor tamaño y porque tienen un mayor número de sitios combinantes que las moléculas IgG (Fig.(IX)-1e). Sin embargo, algunos de los anticuerpos (IgG) anti-A y anti-B son de individuos hiperinmunes, también aglutininas. Se cree que el número de sitios antigénicos sobre el eritrocito desempeña alguna parte que facilite a las IgG anti-A y anti-B, a que aglutinen a dichas células suspendidas en solución salina (Fig.(IX)-1c). (7)

En el caso del antígeno Rho(d) para el cual los sitios sobre los eritrocitos para su combinación con el anticuerpo son algunos cientos de veces menores que para A, hasta IgG anti-D potente fracasa y no aglutina a los eritrocitos D positivos que están suspendidos en solución salina, si es que no se le agregó un medio albuminoso. Sin embargo, hay un subtipo Rh raro (D--), en el cual las células carecen de cualquier traza de los productos del gen de todos los antígenos del Rh excepto para D.

Los anticuerpos IgG son aglutinantes muy eficaces si se toman las medidas necesarias para reducir la distancia entre los eritrocitos individuales; debido a que los eritrocitos tienen una carga negativa sobre su superficie, que los mantiene separados y también se encuentran rodeados por una "nube iónica", se ha visto que diversos coloides como la albúmina bovina son efectivos para reducir la repulsión eléctrica entre las células y aumenta así su constante dieléctrica, para favorecer la aglutinación (Fig.(IX)-1). (7)



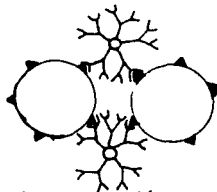
a) No hay aglutinación



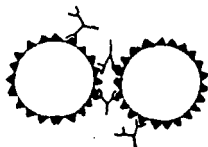
d).- Aglutinación



b) Aglutinación



e) Aglutinación



c) Aglutinación

Sitios antigénicos  
sobre la superfi--  
cie celular.

IgG

IgM

Globulina  
antihumana (GAH)

FIG.IX-1- Aglutinación de los eritrocitos por anticuerpos IgG  
e IgM. (7)

Comparando con la Fig.(IX)-1a, en donde están unidos los anticuerpos incompletos con células sensibilizantes suspendidas en solución salina, con la Fig. (IX)-1d en la cual el suero que contiene albúmina atrae a los eritrocitos con la suficiente cercanía para el enlace entre las células y por lo tanto produciéndose la aglutinación. (7)

El uso de la antiglobulina para ayudar a los anticuerpos incompletos para combinarse en forma específica con el antígeno adecuado sobre los eritrocitos produce la aglutinación. Por lo tanto, el empleo de la antiglobulina no depende del intento de aproximar a los eritrocitos uno del otro, sino de construir puentes que unan la separación Fig. (IX)-1b, hallándose los eritrocitos a la misma distancia de separación como la Fig.(IX)-1a, pero las moléculas de antiglobulina servirán como eslabones entre las moléculas IgG circunvecinas efectuándose la aglutinación.(7)

La aglutinación por los anticuerpos IgG puede intensificarse en tres maneras: 1) mediante el uso de antisuero contra IgG (Técnica de Coombs); 2) por la adición de albúmina sérica bovina (BSA) y 3) mediante el tratamiento de los eritrocitos con una enzima proteolítica (por ejemplo: papaína o bromelaína). (7)

El efecto de la temperatura sobre la aglutinación de los eritrocitos, es un fenómeno importante en la reacción de aglutinación. En éste aspecto, los anticuerpos caen en dos categorías: fríos y calientes según su temperatura óptima de reactividad esté a 4°C o a 37°C. Los llamados anticuerpos de "ocurrencia" (IgM) son de tipo "frío", mientras aquellos que pueden rastrearse y averiguar que son producidos por estímulo antigénico son "calientes" (IgG). (7)



La diferencia principal es que la temperatura puede tener poco o nulo efecto sobre la constante de equilibrio de los anticuerpos -- calientes y tiene efecto considerable sobre la constante de equilibrio de los anticuerpos fríos.

Los anti-A y anti-B IgM (ocurrencia natural), reaccionan con máxima intensidad en medios fríos y su título a 0°C puede ser ocho --- veces mayor que a 37°C, pero la incubación a 4°C es evitada, debido a que a ésta temperatura pueden ocurrir reacciones frías que -- son indeseables. (7)

Después de un estímulo inmunológico suficiente se puede provocar la formación de IgG anti-A y anti-B. Los anticuerpos IgG (de tipo caliente), que han sido estudiados en detalle (como es el caso de anti-D), en donde el efecto de la temperatura afecta a la velocidad de reacción y no tanto a la constante (K) de equilibrio aunque la reacción Ag-Ac es exotérmica. Por ejemplo la disminución de la temperatura de 37°C a 4°C, aunque escasamente aumenta la constante de equilibrio, disminuye aproximadamente 20 veces la velocidad a la cual el antígeno se combina con el anticuerpo (Hughes Jones y - col. 1964). (7,13,21)

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El propósito de ésta investigación es conocer si los Sueros Hemotipificadores Comerciales de 5 fabricantes diferentes cumplen con -- las Normas de Calidad establecidas para los parámetros de: Potencia Avidéz y Especificidad de acuerdo a los requerimientos que pide la Secretaría de Salud. (6)

Durante el desarrollo de la investigación se explicarán cada uno - de ellos, su fundamento y sus Técnicas de Evaluación.

Creemos importante hacer del conocimiento, a nivel enseñanza, que para el uso y producción de los Sueros Hemotipificadores Comerciales, debe realizarse un Control de Calidad que está regido por una Asociación Internacional conocida: la Asociación Americana de Bancos de Sangre (A.A.B.B.), y al mismo tiempo difundir la Técnica para evaluar la Calidad de éstos reactivos biológicos que son de suma importancia en el Area Clínica y principalmente a nivel de Bancos de Sangre.

### 3.- O B J E T I V O S .

- i).- Conocer los parámetros que determinan la Calidad de los Sueros Hemotipificadores Comerciales, así como sus límites de confianza establecidos por la Secretaría de Salud, basada en la American Association of Blood Banks (A.A.B.B.) y por la Food and Drug Administration (F.D.A)
- ii).- Describir las Técnicas de Evaluación que conduzcan a conocer la Calidad de diferentes Sueros Hemotipificadores, de 5 marcas comerciales, para su uso clínico.
- iii).- Valorar la Calidad de los Sueros Comerciales en base a las Normas establecidas por la Secretaría de Salud.
- iv).- Comparar los resultados de las Evaluaciones obtenidas -- entre los diferentes Sueros Comerciales.

#### 4.- MATERIAL Y METODOS.

##### 4.1.- OBTENCION DE MUESTRAS.

Como Material Biológico de estudio, se solicitaron Sueros Hemotipificadores Anti-A y Anti-B y Sangre de Grupos Sanguíneos conocidos - A, B, AB y O.

- a).- Los Sueros Hemotipificadores Anti-A y Anti-B son frascos viales de 10 ml. cada uno donados por 5 diferentes Laboratorios Comerciales tres de ellos con características policlonales --- (Sueros: I, II, III) y los otros dos con características monoclonales (Sueros: IV y V).
- b).- Se emplearon sueros de estándares primarios para Anti-A y Anti B, provenientes de la F.D.A. (Food and Drug Administration).
- c).- La sangre que se empleó para obtener el paquete celular fue tratada con anticoagulante E.D.T.A. (Acido Etilendiamino Tetracético), e identificada como A, B, AB y O; proporcionada por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social.
- d).- Para formar un pool para cada uno de los grupos sanguíneos --- (A, B, AB y O), se seleccionaron las sangres correspondientes, más frescas centrifugándolas, para obtener el paquete celular, los cuales se lavaron tres veces con Solución Salina Fisiológica.

NOTA.- Se le ha dado el nombre de pool a la mezcla de células de cada uno de los grupos sanguíneos.

#### 4.2.- METODO DE AGLUTINACION.

El Método de Aglutinación Directa se aplicó para evaluar los parámetros de Potencia, Aidez y Especificidad, en nuestro estudio experimental.

##### FUNDAMENTO.

La aglutinación de eritrocitos con un suero hemotipificador específico da un resultado positivo que indica la presencia del correspondiente antígeno en la membrana del eritrocito. La ausencia de aglutinación indica un resultado negativo, es decir, el antígeno correspondiente, no se encuentra en la membrana del eritrocito.

Aplicando el fundamento de éste Método de Aglutinación nos encontramos con dos clases de Técnicas como son: Técnica en Tubo y la Técnica en Placa.

La Técnica en Tubo se empleó para la evaluación de la Potencia y la Especificidad de los sueros hemotipificadores y la Técnica en Placa para evaluar la Aidez. Estas Técnicas se explicarán en cada uno de los parámetros establecidos.

#### 4.2.1.- POTENCIA. (25)

Para evaluar la potencia se toman dos criterios : Título y Cómputo-  
de los anticuerpos. (suero).

##### FUNDAMENTO:

El Título establece la cantidad de anticuerpos que pueden ser medi-  
dos por la Prueba de Doble Dilución seriada; ésto es a partir de --  
una reacción de aglutinación que se realiza agregando un volumen --  
constante de una suspensión de partículas que tienen determinantes-  
antigénicos intrínsecos y un volumen constante de suero diluido se-  
riadamente.

El Cómputo es el valor numérico que se le dá a la intensidad de aglu-  
tinación en la serie de diluciones del suero analizado.

##### MATERIAL BIOLÓGICO:

- 1.- Sueros Hemotipificadores Comerciales Anti-A y Anti-B de marcas-  
diferentes.
- 2.- Estándar primario Anti-A y Estándar primario Anti-B provenientes  
de la F.D.A. (Food and Drug Administration).
- 3.- Células rojas (eritrocitos) de grupos sanguíneos conocidos A, -  
B y AB.

##### MATERIAL:

- Tubos de ensayo de 12 X 75 mm. y de 13 X 100 mm.
- Pipetas serológicas de 2.0 ml. (graduada 1/100).
- Gradillas para tubos de ensayo.

##### EQUIPO:

- Centrífuga

##### REACTIVOS:

- Solución Salina Fisiológica.

#### TECNICA EN TUBO.

- 1.- Las células rojas (eritrocitos), provenientes del paquete celular de las muestras de sangre tipificadas fueron lavadas de 3- a 5 veces con Solución Salina Fisiológica (SSF), en una centrifuga a 3500 rpm. para preparar pools de cada uno de los grupos sanguíneos A, B, y AB de la siguiente manera:
  - Pool de 10 muestras para tipo A (0.5 ml. de cada uno)
  - Pool de 10 muestras para tipo B (0.5 ml. de cada uno)
  - Pool de 10 muestras para tipo AB (0.5 ml. de cada uno)
- 2.- Preparar una suspensión de eritrocitos al 2% de cada uno de los pools con SSF.
- 3.- Preparar dilución de cada suero hemotipificador, identificar los tubos de ensayo de 12 X 75 mm. del 1 al 10 y a partir de los sueros hemotipificadores concentrados elaborar dilucionesdobles seriadas desde 1:2 hasta la dilución 1:1024, utilizando SSF.

4.- TABLA DE TITULACION DE UN SUERO HEMOTIPIFICADOR.

TUBO No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DILUCION DEL SUERO.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
VOLUMEN DE - CADA DILUCION (ml.)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
VOLUMEN DE LA SOLUCION DE - ERITROCITOS - AL 2% (ml.)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Centrifugar durante 30 seg. a 3000 rpm.										
Observar los botones que se forman hasta el fondo del tubo de ensayo y agitarlos muy ligeramente viendo hacia la luz.										

CRITERIO DE LECTURA.

El título obtenido es la máxima dilución del suero hemotipificador que presente hasta (1+) de aglutinación.

INTERPRETACION.

El título mínimo aceptado corresponde a la dilución 1:256. (Ver tabla de Grados de Aglutinación). (Figura X)

El cómputo mínimo aceptado de acuerdo a la Asociación Americana de Bancos de Sangre es de 50 puntos.



**FIGURA X.- ESQUEMA DE LA INTERPRETACION DE LA REACCION  
ANTIGENO - ANTICUERPO.**

En una prueba serológica, la hemólisis o aglutinación constituye el punto final de la Reacción Antígeno-Anticuerpo que se puede visualizar utilizando una fuente de luz y la sensibilidad de la ayuda óptica.

Si la hemólisis y la aglutinación son posibles se observa que en el sobrenadante, para el primer caso se presenta la hemólisis inmediatamente después de centrifugar el suero con las células antigénicas y en el segundo caso se observaría una ligera dispersión de las células rojas antigénicas.

La manera en la cual las células son despegadas del botón en el fondo del tubo, puede afectar la detección de la aglutinación, sin embargo para lograr detectar la aglutinación es importante que el tubo de ensayo esté sujeto en la posición de un ángulo agudo para que el fluido a través de un ligero movimiento rompa el agregado celular. Una sobre agitación al tubo puede romper los aglutinados prolongados o debilitar la unión de los agregados celulares.

A continuación se hace una descripción de las columnas ilustradas.(Figura X)

COLUMNA	COMPUTO	DESCRIPCION.
0	0	Sin aglutinación o hemólisis.
W+	2	Pequeños aglutinados fondo turbio
1+	5	Menudos aglutinados con fondo turbio.
2+	8	Aglutinación mediana con número moderado de células libres fondo claro.
3+	10	Grandes conglomerados con muy pocas células libres.
4+	12	Aglutinación total en un solo cúmulo grande.

NOTA.- La flecha del esquema indica que la reacción se puede presentar desde -- una reacción débil a una reacción intensa.

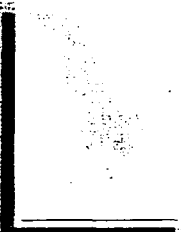
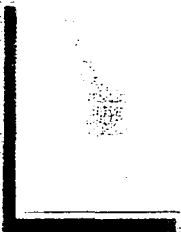


# RED CELL ANTIGEN-ANTIBODY REACTIONS INTERPRETATION SCHEME

## READING AND INTERPRETATION OF REACTIONS

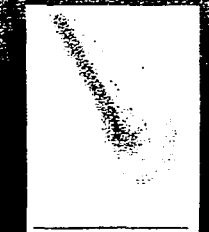
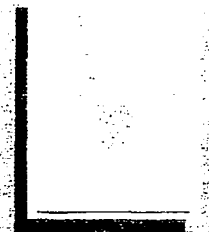
NO AGGLUTINATION OR HEMOLYSIS

SCORE: 0



TINY AGGLUTINATES TURBID BACKGROUND SCORE: 2

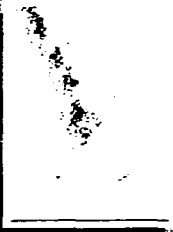
SMALL AGGLUTINATES TURBID BACKGROUND SCORE: 5



MEDIUM-SIZED AGGLUTINATES-CLEAR BACKGROUND SCORE: 8

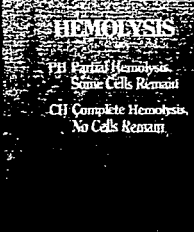
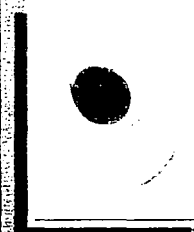
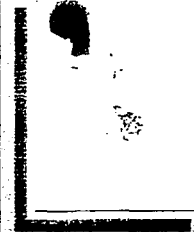


SEVERAL LARGE AGGLUTINATES-CLEAR BACKGROUND SCORE: 10



ONE SOLID AGGLUTINATE

SCORE: 12



WEAKER

The strength of agglutination reactions is measured in degrees of hemolysis. The strength of each cell suspension is determined as the test is read. All readings in laboratory should use the same interpretations and notations.

This chart is presented to assist in standardizing the interpretation of agglutination reactions by providing an accurately depicted point of reference for the technologist. Space is provided below each photograph to allow adaptation to any interpretation scheme unique to an individual Blood Bank laboratory. American Medical Ass'n, 141 Arlington St., Boston, Massachusetts. 1963

### HEMOLYSIS

- PH Partial Hemolysis Some Cells Remain
- CH Complete Hemolysis No Cells Remain

#### 4.2.2.- AVIDEZ. (25)

##### FUNDAMENTO.

La Avidéz es una medida de la capacidad de reactividad y rapidez - en donde un antígeno se combina con su correspondiente antígeno. - Para determinar la avidéz del suero hemotipificador se requiere de una suspensión apropiada de eritrocitos, así como una cantidad adecuada de suero, éstos son mezclados usando la Técnica de Placa. El tiempo de reacción se toma con un cronómetro desde el momento en que se mezclan los reactivos hasta la aparición del primer inicio de aglutinación. La reacción terminará con la formación de agregados celulares.

La avidéz de un anticuerpo está influenciada por:

- A.- Selección de los eritrocitos de prueba (fuerza antigénica).
- B.- Medio en el cual están suspendidos los eritrocitos.
- C.- La concentración de los eritrocitos en la suspensión celular.
- D.- Reactividad de los anticuerpos.
- E.- Temperatura.

##### MATERIAL BIOLÓGICO.

- Sueros hemotipificadores comerciales Anti-A y Anti-B de diferentes marcas.
- Celulas rojas (eritrocitos) de grupos sanguíneos conocidos A, B y AB.

##### MATERIAL:

- Aplicador de vidrio.
- Placa de porcelana o vidrio.
- Tubos de ensayo de 12 X 75 mm. y de 13 X 100 mm.

- Pipetas serológicas de 2.0 ml. (graduadas en 1/100)
- Gradilla para tubos de ensayo.

EQUIPO:

- Cronómetro
- Centrífuga.

REACTIVOS:

- Solución Salina Fisiológica.

TECNICA EN PLACA.

1.- PREPARACION DE LAS CELULAS.

- a) Se hace un lavado previo de los eritrocitos conocidos tipificados con los grupos sanguíneos A, B y AB, por lo menos - tres veces con SSF.
- b) Elaborar los pools de los eritrocitos conocidos con sus correspondientes grupos sanguíneos:
  - Pool de 6 muestras para sangre tipo A (0.5 ml. de cada uno)
  - Pool de 4 muestras para sangre tipo B (0.8 ml. de cada uno)
  - Pool de 2 muestras para sangre tipo AB (1.0 ml. cada uno)

Nota: Debido a que los grupos sanguíneos B y AB no son muy frecuentes; para determinar la avidéz encontramos pocas muestras y por lo tanto tuvimos que variar los volúmenes para preparar los pools.

- c) Preparar una suspensión de eritrocitos conocidos a partir - de los diferentes pools a diferentes concentraciones de : 2%, 10%, 25% y 50% con SSF.

2.- PREPARACION DE LOS SUEROS HEMOTIPIFICADORES.

Diluir los diferentes sueros hemotipificadores comerciales ---

Anti-A y Anti-B a diferentes concentraciones de: 50% y 100% - con SSF.

### 3.- PROCEDIMIENTO.

- a) En una placa de vidrio o de porcelana colocar una gota del suero hemotipificador y junto a ella agregar una gota de -- eritrocitos sin que se toquen.
- b) Mezclar con el aplicador de vidrio; en cuanto se mezclen en ése momento se pone en marcha el cronómetro y cuando aparece el primer indicio de aglutinación, se detiene el cronómetro, (el diámetro aproximado del círculo es de 25 mm.).(

### CRITERIO DE LECTURA.

Considerar el tiempo empleado desde la mezcla hasta la pequeña formación de aglutinaciones discretas y anotar el tiempo. El tamaño - de los cúmulos aglutinados no debe ser menor de 1.0 mm. de diámetro.

### INTERPRETACION.

La aglutinación de los eritrocitos correspondientes debe iniciar - dentro de los 15 segundos contados a partir del momento que se ponen en contacto el suero y los eritrocitos..(16)

#### 4.2.3.- ESPECIFICIDAD. ( 25 )

##### FUNDAMENTO.

La Especificidad es la reacción selectiva de un anticuerpo con su correspondiente antígeno. Reaccionan más fuertemente con aquellos antígenos que estimularon la producción de anticuerpos. Cuando las reacciones son más débiles, puede ser que se trate de antígenos -- relacionados. No ocurrirá ninguna reacción con aquellos antígenos con los cuales no hay reacción directa.

##### MATERIAL BIOLÓGICO.

- 1.- Sueros Hemotipificadores comerciales Anti-A y Anti-B de diferentes marcas.
- 2.- Células rojas (eritrocitos), de grupo sanguíneo conocido "O".

##### MATERIAL.

- Tubos de ensayo de 12 X 75 mm. y 10 X 75 mm.
- Pipetas serológicas de 2.0 ml. (graduada en 1/10)
- Gradilla para tubos de ensayo.

##### EQUIPO.

- Termómetro.
- Centrífuga
- Baño de incubación.

##### REACTIVOS.

- Solución Salina Fisiológica.
- Albúmina Bovina al 22%.

##### PREPARACION DE LAS CELULAS.

- 1.- Se hace un lavado previo de los eritrocitos conocidos tipificados con el grupo sanguíneo "O", por lo menos tres veces con-

Solución Salina Fisiológica.

2.- Elaborar un pool de eritrocitos conocidos:

Pool de 5 muestras para sangre tipo "O" (1.0 ml. de cada uno).

3.- Preparar una suspensión de eritrocitos conocidos a una concentración del 4% con SSF.

TECNICA EN TUBO.

- a) A un tubo de ensayo de 10 X 75 mm. agregar una gota de albúmina bovina al 22%.
- b) Agregar 0.1 ml. de suero hemotipificador al 100%
- c) Agregar 0.05 ml. de la suspensión de eritrocitos al 4.0%
- d) Incubar durante una hora a 37°C.
- e) Centrifugar 30 segundos a 3 500 rpm. y desprender el botón de eritrocitos del fondo del tubo de ensayo y leer el resultado.
- f) En caso de ser negativa la aglutinación lavar los eritrocitos 3 veces con SSF
- g) Agregar 0.05 ml. de suero de Coombs.
- h) Centrifugar a 3500 rpm 30 segundos, desprender el botón de eritrocitos del fondo del tubo y leer los resultados.

NOTA.- Por otro lado repetir la prueba desde el paso (b), es decir sin agregar albúmina.

CRITERIO DE LECTURA.

Presencia de aglutinación después de la primera centrifugación y -- presencia de aglutinación después del suero de Coombs.

INTERPRETACION.

Ausencia de aglutinación indica la especificidad adecuada del suero correspondiente. (Ver)

## 5.- R E S U L T A D O S .

Los resultados obtenidos están representados por Tablas y Gráficas, para cada uno de los parámetros evaluados: Potencia, Aidez y Especificidad, aplicando las Técnicas mencionadas en la sección 4.

El desarrollo experimental de nuestra investigación se llevó a cabo en el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional "La Raza".

### 5.1.- RESULTADOS DE LA POTENCIA.

Los resultados de la Potencia se basan en la determinación de un Título final, el cual se obtiene de máxima dilución de los Sueros - analizados de 5 marcas diferentes y además de un cómputo que se adquiere de la suma total de los valores numéricos que indican la intensidad de aglutinación en la serie de diluciones.



TABLA I.- RESULTADOS DE LA POTENCIA DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-A FRENTE A CELULAS TIPO A.

CELULAS TIPO A.	SUERO ESTANDAR TITULO COMPUTO	SUERO I TITULO COMPUTO	SUERO II TITULO COMPUTO	SUERO III TITULO COMPUTO	SUERO IV TITULO COMPUTO	SUERO V TITULO COMPUTO
POOL 1	1: 512 90	1: 512 95	1: 128 76	1: 128 67	1: 256 76	1: 512 89
POOL 2	1:1024 93	1:1024 102	1: 128 76	1: 128 71	1: 256 69	1: 512 95
POOL 3	1:1024 91	1:1024 93	1: 128 77	1: 64 69	1: 256 74	1: 512 92
POOL 4	1:1024 105	1:1024 104	1: 256 79	1: 64 66	1: 128 74	1: 512 98

TABLA Ia.- RESULTADOS DE LA POTENCIA DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-A FRENTE A CELULAS TIPO AB.

CELULAS TIPO AB	SUERO ESTANDAR TITULO COMPUTO	SUERO I TITULO COMPUTO	SUERO II TITULO COMPUTO	SUERO III TITULO COMPUTO	SUERO IV TITULO COMPUTO	SUERO V TITULO COMPUTO
POOL 1	1: 256 83	1: 512 102	1: 256 76	1: 128 69	1: 256 80	1: 512 93
POOL 2	1: 256 88	1: 256 94	1: 256 76	1: 32 58	1: 256 74	1: 256 85
POOL 3	1: 512 89	1: 512 96	1: 128 71	1: 128 71	1: 256 74	1: 256 76

TITULO.- Máxima dilución del suero analizado que presente hasta (1+) de aglutinación.

COMPUTO.- Valor numérico que nos indica la intensidad de aglutinación en la serie de diluciones del suero analizado.

TABLA II.- RESULTADOS DE LA POTENCIA DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-B FRENTE A CELULAS TIPO B.

CELULAS TIPO B.	SUERO ESTANDAR TITULO COMPUTO	SUERO I TITULO COMPUTO	SUERO II TITULO COMPUTO	SUERO III TITULO COMPUTO	SUERO IV TITULO COMPUTO	SUERO V TITULO COMPUTO
POOL 1	1: 256 81	1: 256 80	1: 128 75	1: 128 70	1: 64 55	1: 256 83
POOL 2	1: 256 80	1: 256 83	1: 128 73	1: 128 76	1: 32 47	1: 256 83
POOL 3	1: 256 83	1: 256 86	1: 256 81	1: 256 82	1: 32 54	1: 256 83
POOL 4	1: 256 81	1: 256 83	1: 256 79	1: 256 81	1: 64 39	1: 256 76

TABLA IIIa.- RESULTADOS DE LA POTENCIA DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-B FRENTE A CELULAS TIPO AB.

CELULAS TIPO AB	SUERO ESTANDAR TITULO COMPUTO	SUERO I TITULO COMPUTO	SUERO II TITULO COMPUTO	SUERO III TITULO COMPUTO	SUERO IV TITULO COMPUTO	SUERO V TITULO COMPUTO
POOL 1	1: 256 74	1: 256 78	1: 256 86	1: 128 78	1: 16 39	1: 256 76
POOL 2	1: 256 74	1: 256 76	1: 32 54	1: 128 71	1: 04 13	1: 64 61
POOL 3	1: 256 81	1: 256 79	1: 256 81	1: 256 76	1: 16 37	1: 256 67

TITULO.- Máxima dilución de suero analizado que presente hasta (1+) de aglutinación.

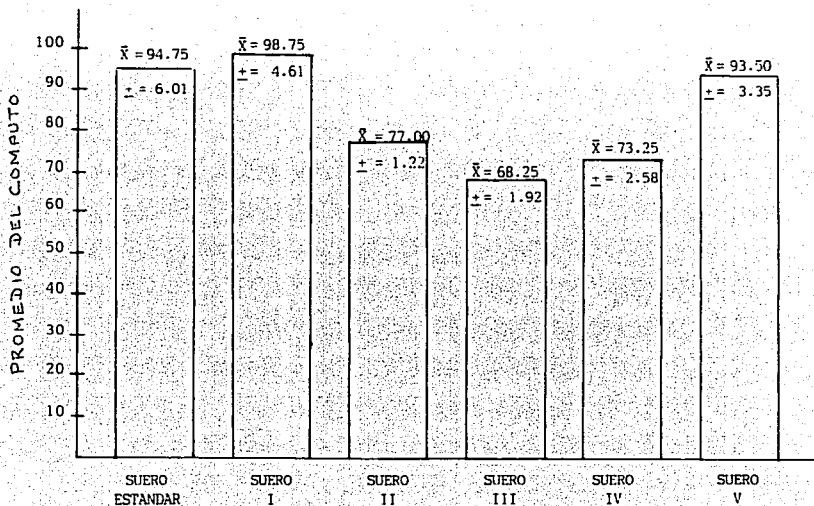
COMPUTO.- Valor numérico que nos indica la intensidad de aglutinación en la serie de diluciones del suero analizado.

Se calculó el promedio de los cómputos obtenidos de cada uno de los diferentes sueros con sus correspondientes desviaciones estándar.

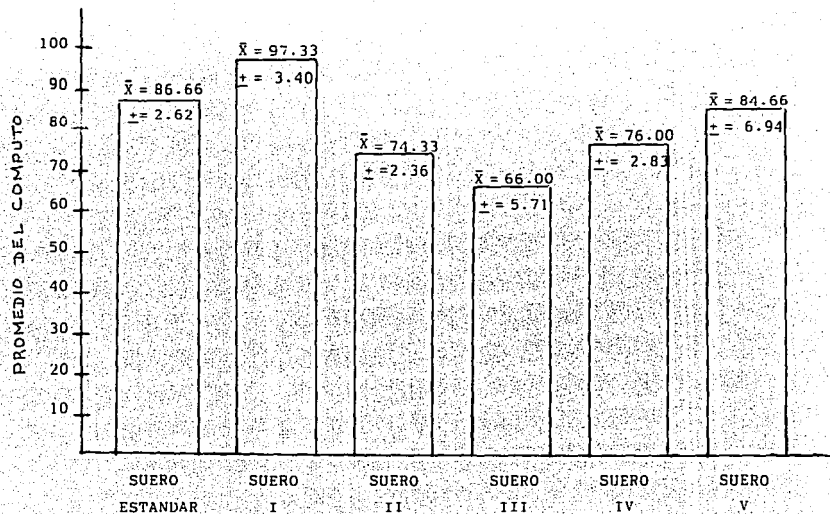
TABLA III. - TABLA DE RESULTADOS DE LOS COMPUTOS PROMEDIO Y DESVIACIONES ESTAN-  
DAR DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-A Y ANTI-B CONTRA CELULAS A y B  
RESPECTIVAMENTE Y CELULAS AB PARA AMBOS SUEROS.

SUEROS	ANTI-A CONTRA CELULAS TIPO A	ANTI-B CONTRA CELULAS TIPO B.	ANTI-A CONTRA CELULAS TIPO AB	ANTI-B CONTRA CELULAS TIPO AB.
ESTANDAR	94.75 ( $\pm$ 6.01)	81.25 ( $\pm$ 1.09)	86.66 ( $\pm$ 2.62)	76.33 ( $\pm$ 3.30)
I	98.75 ( $\pm$ 4.61)	83.00 ( $\pm$ 2.12)	97.33 ( $\pm$ 3.40)	77.66 ( $\pm$ 1.25)
II	77.00 ( $\pm$ 1.22)	77.00 ( $\pm$ 3.16)	74.33 ( $\pm$ 2.36)	73.66 ( $\pm$ 14.0)
III	68.25 ( $\pm$ 1.92)	77.25 ( $\pm$ 4.76)	66.00 ( $\pm$ 5.71)	75.00 ( $\pm$ 2.91)
IV	73.25 ( $\pm$ 2.58)	48.75 ( $\pm$ 6.42)	76.00 ( $\pm$ 2.83)	29.66 ( $\pm$ 11.8)
V	93.50 ( $\pm$ 3.35)	81.25 ( $\pm$ 3.03)	84.66 ( $\pm$ 6.94)	68.00 ( $\pm$ 6.16)

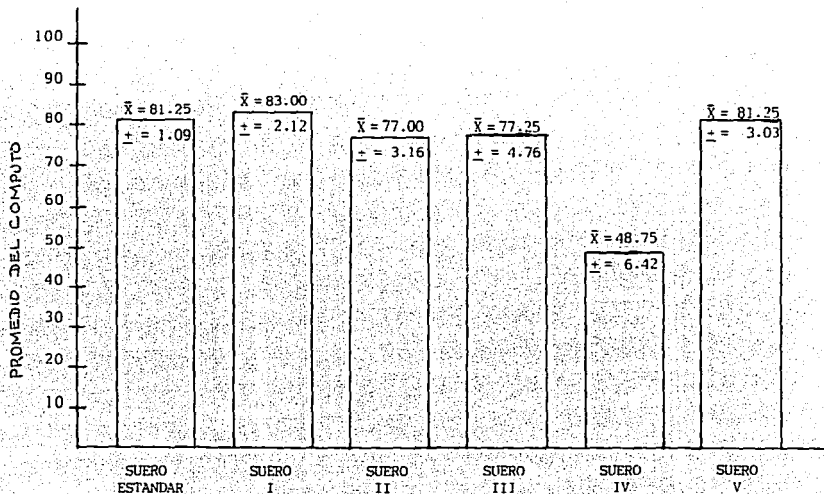
Para representar los resultados correspondientes a la Tabla III de los Sueros Hemotipificadores Anti-A y anti-B, se elaboraron gráficas de barras y así facilitar la comparación de los cómputos promedio con sus correspondientes desviaciones estándar.



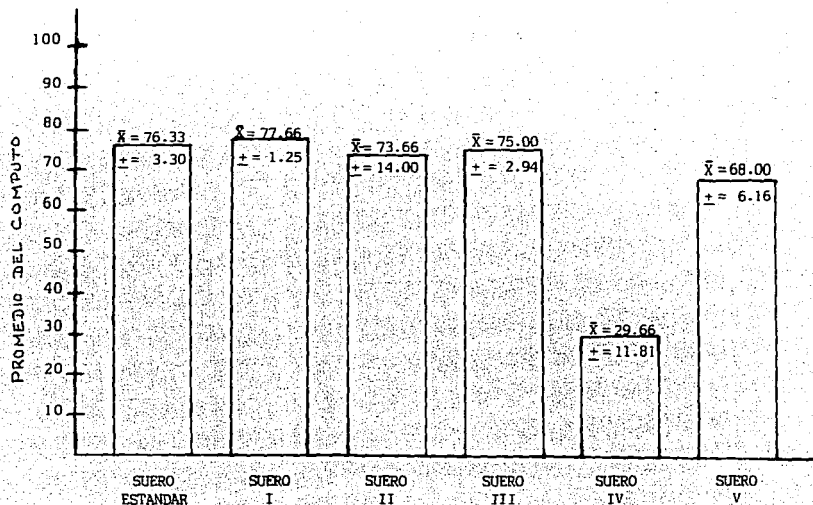
GRAFICA I.- PROMEDIO DEL COMPUTO CONTRA LOS DIFERENTES SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-A FRENTE A CELULAS TIPO A.



GRAFICA Ia.- PROMEDIO DEL COMPUTO CONTRA LOS DIFERENTES SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-A FRENTE A CELULAS TIPO AR.



GRAFICA II.- PROMEDIO DEL COMPUTO CONTRA LOS DIFERENTES SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-B FRENTE A CELULAS TIPO B.



GRAFICA IIa.- PROMEDIO DEL COMPUTO CONTRA LOS DIFERENTES SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-B FRENTE A CELULAS TIPO AB.

Para el análisis estadístico del parámetro de la Potencia se utilizó el Análisis de Varianza y para ello se elaboraron las siguientes tablas de resultados partiendo de los valores de los cómputos promedio. (8,10,37)

TABLA IV.- RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA CON UN NIVEL DE CONFIANZA DE 95 PARA SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-A CONTRA CELULAS TIPO A.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	RAZON DE VARIANZAS
ENTRE LOS GRUPOS	3313.7083	5	662.74167	37.019
DENTRO DE LOS GRUPOS	322.2500	18	17.90278	

TABLA IVa.- RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA CON UN NIVEL DE CONFIANZA DE 95 PARA SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-A CONTRA CELULAS TIPO AB.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	RAZON DE VARIANZAS
ENTRE LOS GRUPOS	1819.8333	5	363.96667	12.896
DENTRO DE LOS GRUPOS	338.6667	12	28.22222	



TABLA V. - RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA CON UN NIVEL DE CONFIANZA DE 95 PARA SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-B CONTRA CELULAS TIPO B.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	RAZON DE VARIANZAS
ENTRE LOS GRUPOS	3359.5000	5	671.9000	34.068
DENTRO DE LOS GRUPOS	355.0000	18	19.7222	

TABLA Va. - RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA CON UN NIVEL DE CONFIANZA DE 95 PARA SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-B CONTRA CELULAS TIPO AB.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	RAZON DE VARIANZAS
ENTRE LOS GRUPOS	5110.9444	5	1022.1889	10.319
DENTRO DE LOS GRUPOS	1188.6667	12	99.0556	

Para hacer una comparación específica de los cómputos promedio entre los sueros analizados y así formar grupos homogéneos, se elaboraron las siguientes tablas partiendo del Método de Tukey. (10)

TABLA VI.- RESULTADOS DE LOS COMPUTOS PROMEDIO PARA FORMAR GRUPOS HOMOGENEOS PARA SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-A CONTRA CELULAS A CON NIVELES DE CONFIANZA DEL 95 PORCIENTO.

S U E R O S	COMPUTO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
III	68.25	*
IV	73.25	*
II	77.00	*
V	93.50	*
STD	94.75	*
I	98.50	*

TABLA VIa.- RESULTADOS DE LOS COMPUTOS PROMEDIO PARA FORMAR GRUPOS HOMOGENEOS PARA SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-A CONTRA CELULAS AB CON NIVELES DE CONFIANZA DEL 95 PORCIENTO.

S U E R O S	COMPUTO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
III	66.00	*
II	74.33	**
IV	76.00	**
V	84.66	**
STD	86.66	**
I	97.33	*

TABLA VII.- RESULTADOS DE LOS COMPUTOS PROMEDIO PARA FORMAR GRUPOS HOMOGENEOS PARA SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-B CONTRA CELULAS B, CON NIVELES DE CONFIANZA DEL 95 PORCIENTO.

S U E R O S	COMPUTO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
IV	48.75	*
II	77.00	*
III	77.25	*
STD	81.25	*
V	81.25	*
I	83.00	*

TABLA VIIa.- RESULTADOS DE LOS COMPUTOS PROMEDIO PARA FORMAR GRUPOS HOMOGENEOS PARA SUEROS HEMOTIPIFICADORES ANTI-B CONTRA CELULAS AB, CON NIVELES DE CONFIANZA DEL 95 PORCIENTO.

S U E R O S	COMPUTO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
IV	29.66	*
V	68.00	*
II	73.66	*
III	75.00	*
STD	76.33	*
I	77.66	*

## 5.2.- RESULTADOS DE LA AVIDEZ.

A continuación se presentan las tablas de resultados obtenidos en la técnica de Aidez, con sus correspondientes gráficas, con la finalidad de comparar el grado de Aidez de los sueros hemotipificadores Monoclonales (Sueros: IV y V) y Policlonales (Sueros: I, II y III), tomando en cuenta las concentraciones de los sueros y de las células antigénicas (eritrocitos).

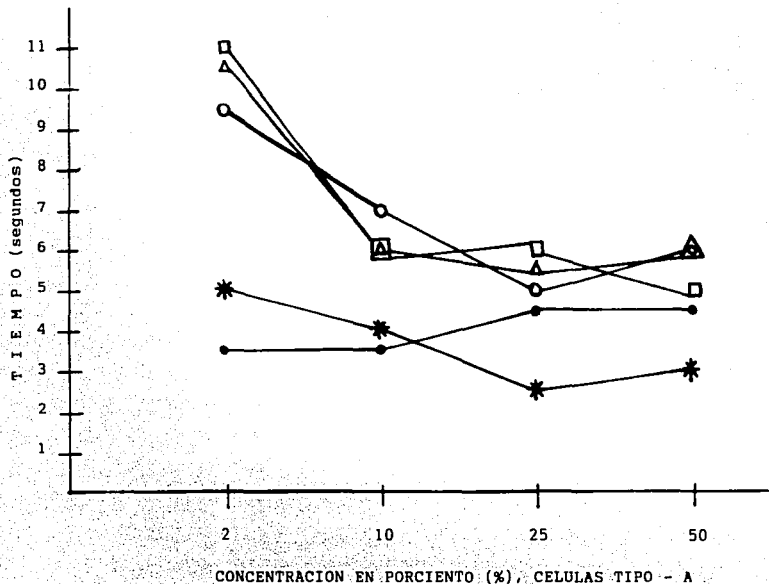
TABLA VIIIa.- RESULTADOS DE LA AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS  
ANTI-A, FRENTE A CELULAS TIPO A.

T I E M P O (segundos)

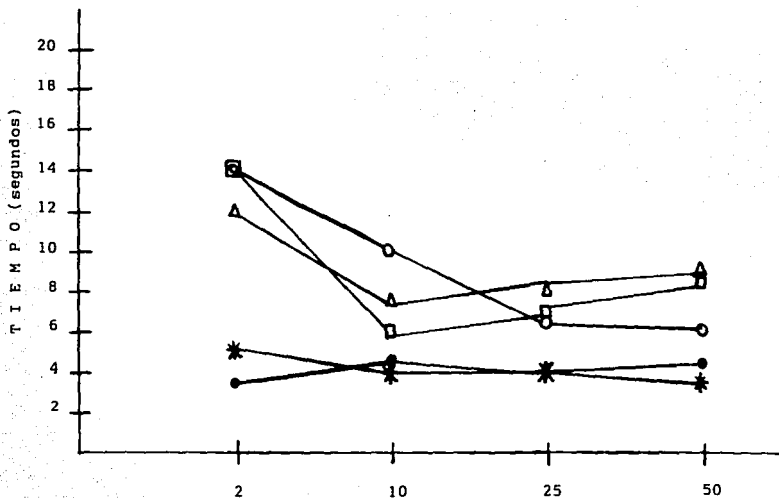
Ac %	Ag % CELULAS A	SUERO I	SUERO II	SUERO III	SUERO IV	SUERO V
100	2	3.5	9.5	10.5	5.0	11.0
	10	3.5	7.0	6.0	4.0	6.0
	25	4.5	5.0	5.5	2.5	6.0
	50	4.5	6.0	6.0	3.0	5.0
50	2	3.5	14.0	12.0	5.0	14.0
	10	4.5	10.0	7.5	4.0	6.0
	25	4.0	6.5	8.0	4.0	7.0
	50	4.5	6.0	9.0	3.5	8.5

Ac % = Concentración del anticuerpo (suero), representado en por ciento.

Ag % = Concentración del antígeno (células tipo A), representado en por ciento.



GRAFICA VIIIa<sub>1</sub>.- AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-A, A UNA CONCENTRACION DEL 100 %, FRENTE A CELULAS TIPO - A.



CONCENTRACION EN PORCIENTO (%), CELULAS TIPO - A.

SUERO I ○

SUERO II ●

SUERO III △

SUERO IV \*

SUERO V □

GRAFICA VIIIa<sub>2</sub>.- AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-A, A UNA CONCENTRACION DEL 50 %, FRENTE A CELULAS TIPO - A.

TABLA VIIIb.- RESULTADOS DE LA AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS  
ANTI-A, FRENTE A CELULAS TIPO AB.

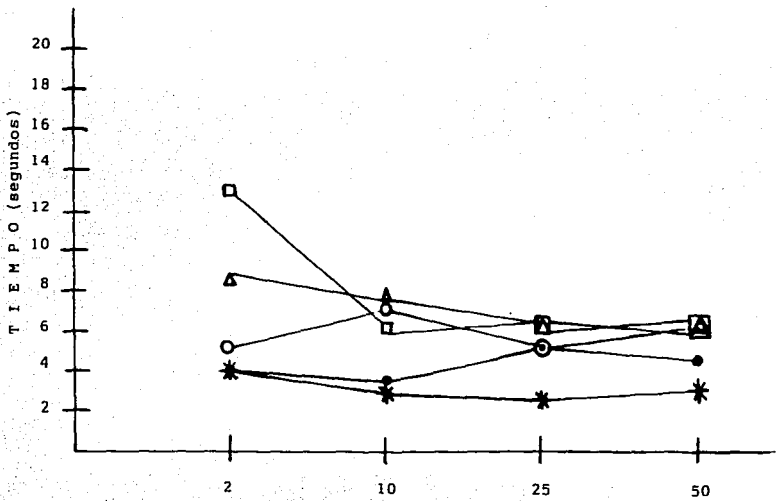
T I E M P O ( segundos )

Ac %	Ag % CELULAS AB	SUERO I	SUERO II	SUERO III	SUERO IV	SUERO V
100	2	4.0	5.0	8.5	4.0	13.0
	10	3.5	7.0	7.5	3.0	6.0
	25	5.0	5.0	6.0	2.5	6.0
	50	4.5	6.0	6.0	3.0	6.0
50	2	4.0	16.5	11.0	6.0	10.0
	10	4.5	10.5	10.0	4.0	7.0
	25	5.0	7.5	7.0	4.0	6.5
	50	4.0	6.0	NEG.	3.5	NEG.

Ac % = Concentración del anticuerpo (suero), representado en por ciento.

Ag % = Concentración del antígeno (células tipo AB), representado en por ciento.

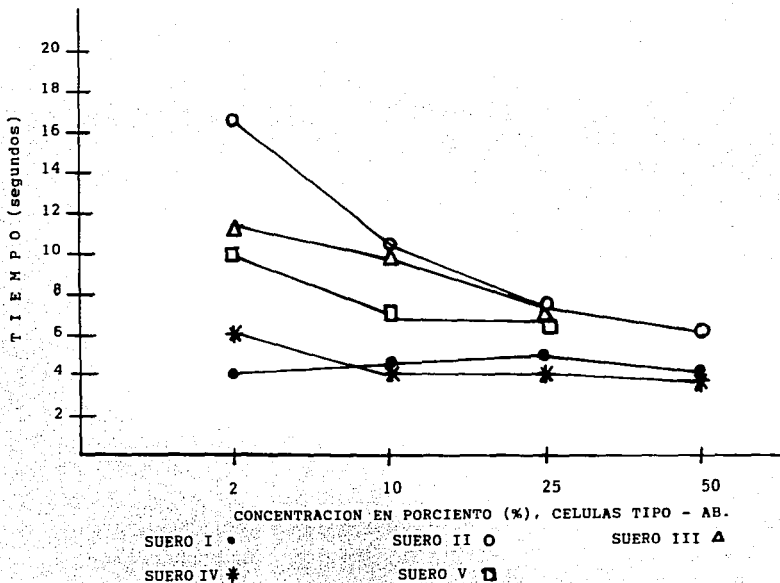




CONCENTRACION EN PORCIENTO (%), CELULAS TIPO - AB

SUERO I ●                      SUERO II ○                      SUERO III △  
 SUERO IV \*                      SUERO V □

GRAFICA VIIIb<sub>1</sub> - AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-A, A UNA CONCENTRACION DEL 100 %, FRENTE A CELULAS TIPO - AB.



GRAFICA VIIIb<sub>2</sub> - AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-A, A UNA CONCENTRACION DEL 50%, FRENTE A CELULAS TIPO-AB.

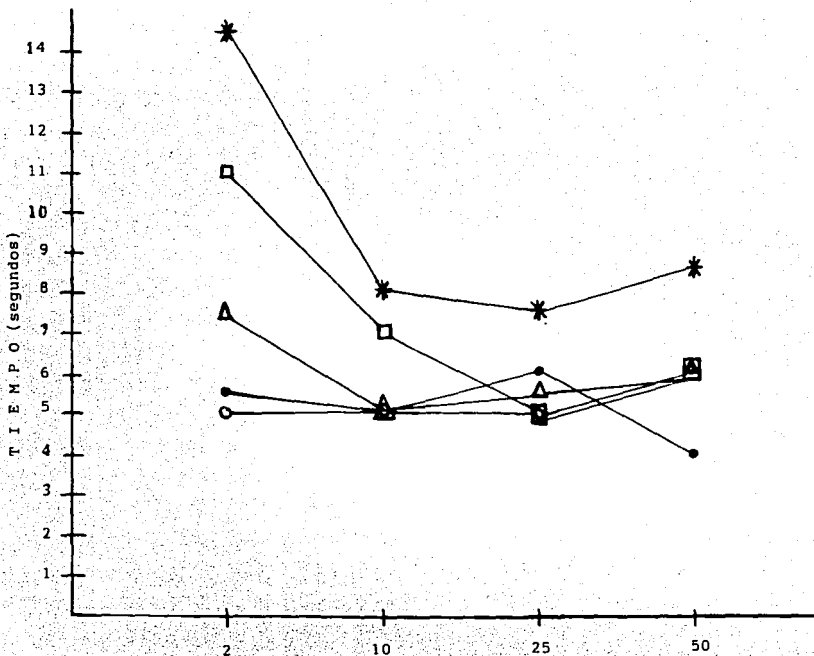
TABLA IXa.- RESULTADOS DE LA AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS  
ANTI-B, FRENTE A CELULAS TIPO B.

T I E M P O. (segundos)

Ag %	Ag % CELULAS B	SUERO I	SUERO II	SUERO III	SUERO IV	SUERO V
100	2	5.5	5.0	7.5	14.5	11.0
	10	5.0	5.0	5.0	8.0	7.0
	25	6.0	5.0	5.5	7.5	5.0
	50	4.0	6.0	6.0	8.5	6.0
50	2	5.0	6.0	7.0	NEG.	10.0
	10	6.0	5.0	6.0	NEG.	7.0
	25	8.0	6.0	6.0	NEG.	8.5
	50	9.5	6.0	7.5	NEG.	10.0

Ac % = Concentración del anticuerpo (suero), representado en por ciento.

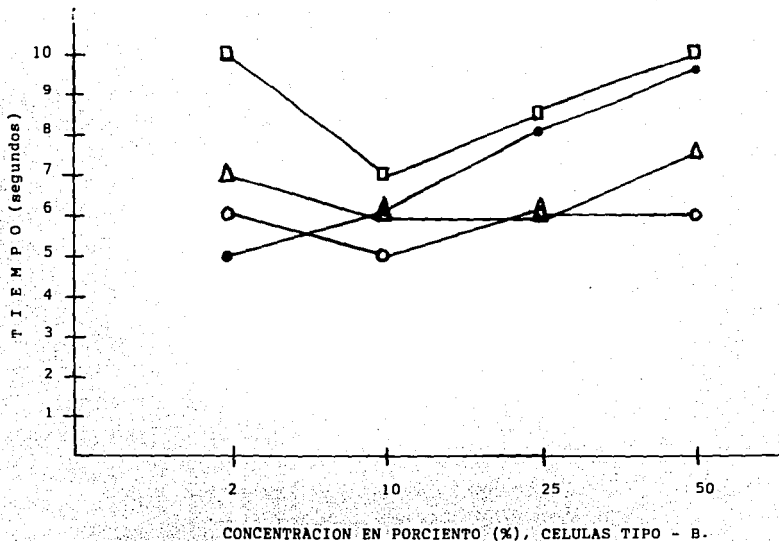
Ag % = Concentración del antígeno (células tipo B), representado en por ciento.



CONCENTRACION EN (%), CELULAS TIPO - B.

SUERO I ○ SUERO II ● SUERO III △ SUERO IV \* SUERO V □

GRAFICA IXa<sub>1</sub>.- AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-B, A UNA CONCENTRACION DEL 100%, FRENTE A CELULAS TIPO - B.



GRAFICA IXa<sub>2</sub>.-- AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-B, A UNA CONCENTRACION DEL 50%, FRENTE A CELULAS TIPO-B.

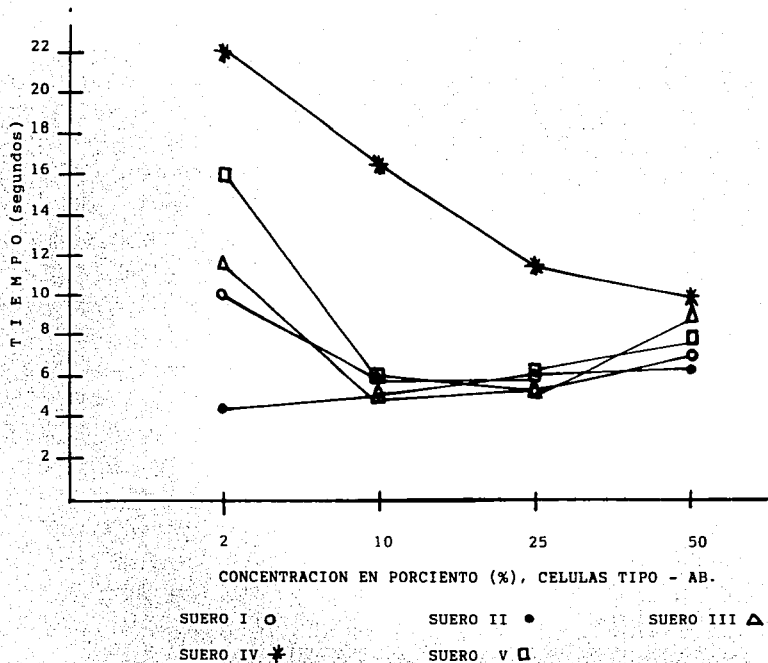
TABLA IXb.- RESULTADOS DE LA AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS  
ANTI-B, FRENTE A CELULAS TIPO AB.

T I E M P O (segundos)

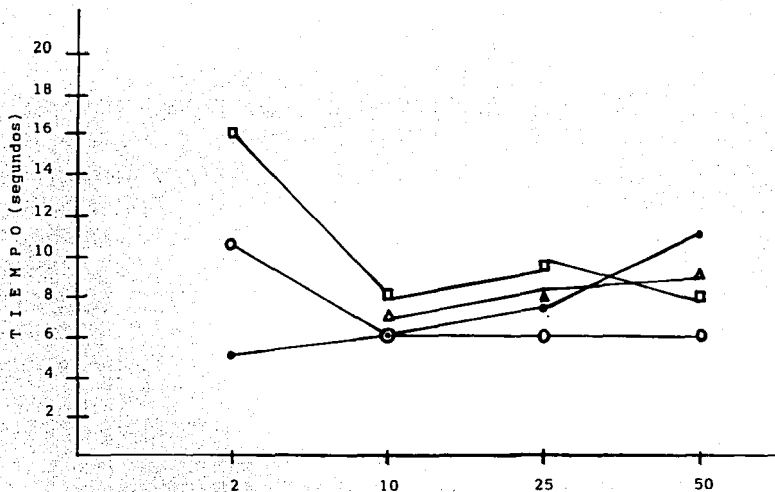
Ag %	Aj % CELULAS AB	SUERO I	SUERO II	SUERO III	SUERO IV	SUERO V
100	2	4.5	10.0	11.5	22.0	16.0
	10	5.0	6.0	6.0	16.5	6.0
	25	6.0	5.5	6.0	11.5	6.0
	50	6.5	7.0	9.0	10.0	8.0
50	2	5.0	10.5	NEG.	NEG.	16.0
	10	6.0	6.0	7.0	NEG.	8.0
	25	7.5	6.0	8.0	NEG.	9.5
	50	11.0	6.0	9.0	NEG.	8.0

Ac % =Concentración del anticuerpo (suero), representado en por-  
ciento.

Ag % =Concentración del antígeno (células tipo AB), representado  
en por ciento.



GRAFICA IX<sub>b</sub> - AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI-B, A UNA CONCENTRACION DEL 100 %, FRENTE A CELULAS TIPO-AB.



CONCENTRACION EN PORCIENTO (%), CELULAS TIPO - AB.

SUERO I ●

SUERO II ○

SUERO III △

SUERO IV ★

SUERO V □

GRAFICA IX<sub>2</sub>.- AVIDEZ DE LOS SUEROS ANALIZADOS ANTI - B, A UNA CONCENTRACION DEL 50%, FRENTE A CELULAS TIPO - AB.



5.3.- RESULTADOS DE LA ESPECIFICIDAD.

En la tabla de resultados que presentamos para la especificidad se toma en cuenta una característica importante: el medio en donde se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo; esto es se utilizan medios en donde se ponen en contacto el suero hemotipificador al 100% de concentración contra una solución de eritrocitos tipo 0 a una concentración del 4%, éstos medios se conocen como : Medio Salino y Medio Albuminoso.

TABLA X.- RESULTADOS DE LA ESPECIFICIDAD DE 5 SUEROS HEMOTIPIFICADORES COMERCIALES MONOCLONALES Y POLICLONALES AL 100% CONTRA ERITROCITOS TIPO "0" AL 4% EN MEDIO SALINO Y MEDIO ALBUMINOSO.

SUEROS HEMOTIPIFICADORES	SUERO + ERITROCITOS A 37°C EN UNA HORA CENTRIFUGAR A 3500 rpm 30 seg.		LAVAR 3 VECES CON SSF + UNA GOTTA SUERO DE - COOMBS; CENTRIFUGAR A 3500 rpm 30 seg.	
	MEDIO SALINO	MEDIO ALBUMINOSO	MEDIO SALINO	MEDIO ALBUMINOSO
ANTI-A				
I	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
II	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
III	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
IV	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
V	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
ANTI-B				
I	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
II	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
III	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
IV	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
V	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.

## 6.- D I S C U S I O N.

En éste trabajo experimental se evaluaron los parámetros que determinan la Calidad de 5 Sueros Hemotipificadores Comerciales. Esta evaluación consta de tres parámetros que son: Potencia, que incluye al título y cómputo; Avidéz y Especificidad.

Los Sueros Hemotipificadores solicitados para nuestro estudio se clasifican en dos: Monoclonales y Policlonales. Con éstas dos clases de sueros se puede realizar una comparación en base a sus parámetros y resultados. Y además en cuanto a las ventajas y desventajas que se tengan para utilizarlos en el Area Clínica y principalmente en Banco de Sangre.

Para evaluar la Potencia se elaboró un Análisis de Varianza Aleatorio basándose en la comparación del cómputo promedio de cada Suero Hemotipificador (10); con éstos datos se obtiene el cociente F experimental que consiste en la división de la estimación de la Varianza entre grupos entre, la estimación de la varianza dentro de los grupos que es comparable con el cociente F en tablas.

Al elaborar un análisis de varianza se plantea desde el inicio una Hipótesis nula ( $H_0$ ) que en nuestro caso se refiere a que todos los sueros hemotipificadores de marcas diferentes tienen el mismo cómputo promedio, así como una Hipótesis alterna ( $H_1$ ): no todos los sueros hemotipificadores tienen igual cómputo promedio.

Para realizar el Análisis de Varianza Aleatorio se elaboraron tablas de resultados de Potencia en donde se obtienen valores del Título y Cómputo de los sueros analizados anti-A frente a células tipo A (Tabla I); anti-A frente a células tipo AB (Tabla Ia); anti

B frente a células B (Tabla II) y anti-B frente a células AB (Tabla IIa). A partir de éstos resultados promediamos los cómputos -- que son los valores numéricos que nos indican la intensidad de --- aglutinación del título máximo obtenido (hasta 1+ de aglutinación) con sus correspondientes desviaciones estándar (Tabla III), de cada uno de los sueros hemotipificadores y que se representan a través de la gráficas de barras (I, Ia, II y IIa). (6)

Utilizando los datos de los cómputos promedio de los sueros hemotipificadores tanto anti-A como anti-B se continúa con el análisis de varianza aleatoria a la que representamos por medio de las tablas (IV, IVa, V y Va); donde se obtiene el cociente F experimental en cada uno de los sueros para anti-A contra las células A y AB -- (Tablas IV y IVa); para anti-B contra células B y AB (Tablas V y Va) y al compararlo con el cociente F de Tablas con un nivel de -- confianza de 95, encontramos que el cociente F experimental es significativo ya que se obtienen valores mucho mayores que en el cociente F de Tablas, para todos los sueros hemotipificadores analizados, por lo que se concluye que la Hipótesis nula se rechaza y se acepta la Hipótesis alterna. (8,10,37)

El Método de Tukey cuya prueba es conocida como Diferencia Significativa Honesta (DSH), se emplea cuando el cociente F es significativo y es una prueba a posteriori que nos permite hacer una comparación específica entre los cómputos promedio de los sueros analizados y formar grupos homogéneos entre los sueros y con ésto configurar si a pesar de las diferencias entre ellos exista una diferencia estadísticamente significativa al nivel  $= 0.05$  (Tabla VI, VIa y VII, VIIa). (8,10,37)

Tomando en cuenta que la avidéz es un parámetro que depende principalmente de la concentración del anticuerpo y de la concentración de su correspondiente antígeno, se enfrentaron diferentes concentraciones porcentuales de los 5 sueros hemotipificadores anti-A y anti-B así como de sus correspondientes células antigenicas de --- pools de grupos sanguíneos conocidos A, B y AB (2, 10, 25 y 50% de la concentración del antígeno).

Para los 5 sueros anti-A contra células A y AB encontramos que en las concentraciones de los sueros al 100% (que se usa como rutina para tipificar grupos sanguíneos) y al 50 % tenemos tiempos de aglutinación menores a los 15 segundos en las gráficas: VIIIa<sub>1</sub>, VIIIa<sub>2</sub>, VIIIB<sub>1</sub> y VIIIB<sub>2</sub>, aunque en ésta última nos encontramos con el suero II que rebasa el tiempo establecido al 2% de concentración del antígeno.

También observamos que en nuestras gráficas mencionadas encontramos una avidéz favorable de tiempo entre 2 y 8 segundos en todas las concentraciones de las células antigenicas exceptuando a los sueros II, III y V en la gráfica VIIIa<sub>1</sub>, VIIIa<sub>2</sub> y VIIIB<sub>2</sub> para la concentración del 2% de la dilución de células antigenicas.

Con respecto a los 5 sueros anti-B contra las células B y AB podemos decir que la avidéz es aceptable cuando observamos las gráficas IXa<sub>1</sub> y IXb<sub>1</sub> cuyas concentraciones de los sueros se encuentran al 100%. En el caso del suero IV para las gráficas mencionadas se aprecia que éste suero necesita más tiempo para mostrar su reactividad sobre todo cuando la concentración de las células antigenicas es del 2%. En los sueros anti-B se hace más evidente la diferencia entre la densidad antigenica que existe entre las células B

y AB caracterizándose a las primeras por un promedio de 750 000 --- sitios antigénicos/ eritrocito y las segundas por un promedio de -- 430 000 sitios antigénicos/eritrocito. (21)

Las gráficas IXa<sub>2</sub> y IXb<sub>2</sub>, observamos que el suero IV presenta avidez nula que se puede asociar a su bajo título 1:64 (Cuadro II y -- IIA), y como consecuencia a su bajo valor de cómputo. Para el suero III (Gráfica IXb<sub>2</sub>), la avidez es nula cuando éste se enfrenta a la concentración del 2% de las células antigénicas AB, esto pudiera estar provocado por la baja densidad antigénica de las células. Con respecto a la especificidad de los sueros hemotipificadores de los sueros hemotipificadores anti-A y anti-B tanto monoclonales como -- policlonales, es un parámetro que nos permite asegurarnos de que -- los sueros son confiables en la identificación de grupos sanguíneos específicos. Para nuestro estudio el uso de células antigénicas eritrocitos de grupo sanguíneo "0", nos garantiza la ausencia de determinantes antigénicos A y B que nos van a permitir medir la especificidad de los sueros hemotipificadores A y B; a través de esta prueba se busca identificar complejos inmunes donde el anticuerpo sea -- clase IgM y complejos inmunes donde el anticuerpo sea clase IgG, éstos últimos identificables por el uso de albúmina y suero de Coombs. Complejos inmunes que si se presentan indican inespecificidad del -- suero hemotipificador correspondiente. En la tabla VII, se aprecia que la especificidad es la esperada dada la ausencia de aglutinación.

## 7.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos concluimos lo siguiente:

- a).- Se evaluó la Potencia de todos los sueros hemotipificadores a través del Título y Cómputo en donde se obtiene una relación dependiente entre los mismos, esto quiere decir que en base a los resultados, encontramos que si el Título rebasa la dilución máxima establecida de 1:256 el Cómputo aumentará de manera directa y proporcional.
- b).- Se establece que la importancia del Cómputo, se debe a que -- nos permite cuantificar la Potencia de un suero hemotipificador.
- c).- A pesar de las diferencias que existen entre los sueros monoclonales y policlonales en cuanto a sus características particulares encontramos sueros con una Potencia aceptable como es el caso de los sueros IV y V monoclonales y I policlona para anti-A y los sueros V monoclonal y I, II policlona para anti B.
- d).- Constatamos que al determinar el Título y el Cómputo para evaluar a la Potencia, no siempre se va a relacionar con el parámetro de la Avidéz, porque se encontraron sueros de Potencia muy baja, pero con una mejor Avidéz.
- e).- En el parámetro de la Especificidad de acuerdo al método que se aplicó, se espera que no ocurra ninguna reacción de los sueros policlonales y monoclonales anti-A y anti-B con aquellos eritrocitos que no proporcionen el antígeno A y el antígeno B, correspondientes, por lo que al obtener resultados --

negativos, significa que nuestros sueros son específicos.

- f).- Se logró utilizar el mismo Método de Análisis para la evaluación de los parámetros de los dos tipos de Sueros Hemotipificadores, sabiendo que su forma de obtención es diferente.
- g).- Concluimos que los sueros I policlonal y IV, V monoclonal anti-A, y los sueros I policlonal y V monoclonal anti-B, cumplen con todos los parámetros que se evaluaron en nuestro estudio y por lo tanto con las Normas de Calidad establecidas.

1.- MEDIA ARITMETICA ( $\bar{X}$ ):

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

donde:

$n$  = # de valores en la muestra.

$\sum_{i=1}^n$  = sumatoria de todos los valores de la variable  $X_i$ , desde el -- primero hasta el último.

2.- DESVIACION ESTANDAR (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

3.- ANALISIS DE VARIANZA ALEATORIA.

a).- Planteamiento de la Hipótesis:

$$H_0 : \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 = \bar{X}_5$$

$$H_1 : \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2 \neq \bar{X}_3 \neq \bar{X}_4 \neq \bar{X}_5$$

donde:

$H_0$  = Hipótesis nula

$H_1$  = Hipótesis alterna

Para un valor significativo:  $\alpha = 0.05$

b).- Suma total de cuadrados ( $SC_t$ )

$$SC_t = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}$$

donde:

$N$  = # total de muestras para todos los grupos de sueros.

c).- Suma de cuadrados entre grupos ( $SC_{entre}$ )

$$SC_{entre} = \sum \frac{(\sum X_i)^2}{n_i} - \frac{(\sum X_t)^2}{N}$$

donde:

$X_t$  = Sumatoria total para todos los valores de  $X_i$ .

$n_i$  = # de muestras para cada grupos de sueros.



d).- Suma de cuadrados dentro de los grupos (SCdentro): Suma de cuadrados obtenida dentro de cada grupo.

$$SC_{dentro} = \sum x^2 - \frac{(\sum x^2)}{n}$$

e).- La suma de cuadrados entre grupos se puede obtener directamente restandole a la suma de cuadrados total, la suma de cuadrados dentro de los grupos:

$$SC_{entre} = SC_{total} - SC_{dentro}$$

#### 4.- ESTIMACIONES DE VARIANZA.

- Grados de libertad (g.l.)

g.l. total = # de casos en total (N) menos 1.

g.l. entre = # de grupos (K) menos 1.

g.l. dentro = suma del número de casos en cada grupo (N) menos k (número de grupos).

- Prueba F.

$$F = \frac{\hat{S}^2_{entre}}{\hat{S}^2_{dentro}}$$

donde:

$$\hat{S}^2_{dentro} = \frac{\sum x^2_{dentro}}{g.l. dentro}$$

$$\hat{S}^2_{entre} = \frac{\sum x^2_{entre}}{g.l. entre}$$

- Prueba de Tukey: (Prueba a posteriori para comparación de medias).

$$DSH = q_{\alpha} \sqrt{\frac{\hat{S}^2_{dentro}}{n}}$$

donde:

DSH = Diferencia Significativa Honesta.

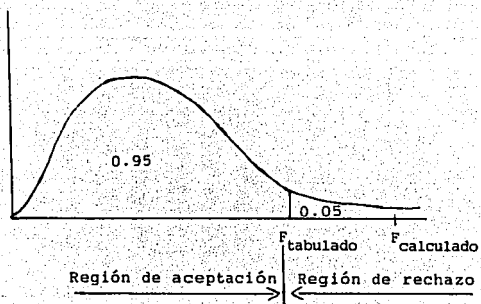
$\hat{S}^2_{dentro}$  = Varianza estimada - dentro de grupo.

n = # de valores en cada condición.

$q_{\alpha}$  = Valor tabulado de F de un determinado nivel en tablas para g.l. dentro.

k = # de medias.

- Región de Aceptación y rechazo resultantes del valor de  $F$  de tablas y el valor de  $F$  calculado.



## 9.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ballas, S.K. (1989): Spectrin Autoantibodies in Normal --- Human Serum and in Polyclonal Blood Grouping Sera. ----- Br. J. Haematol. 71:137-139.
- 2.- Beck, L. Malcolm; Yates D. Alan; Hardman, Jill; Kowalski, A. Mary. (1989): Identification of a Subset of Group B -- Donors Reactive with Monoclonal Anti-A Reagent. Am. J. -- Clin. Pathol. 92(5):625-629.
- 3.- Bick, L. Rodger; et. al.: Haematology: Clinical and Laboratory Practice. Ed. Mosby-Yer Book, Inc. United States- of America. 1993. Chapter 15 p.p. 231-236.
- 4.- Buchs, Jean-Paul; NYDEGGER<sup>o</sup> Urse. (1989): Development of - an ABO-ELISA for the Quantitation of Human Blood Group -- Anti-A and Anti-B IgM and IgG Antibodies. Immunol. Methods 118:37-46.
- 5.- Davis, D. Bernard; Bulbeco, Renato. Tratado de Microbiología. 2a. ed. Ed. Salvat. España. 1978. p.p. 376-386, 408 - 410.
- 6.- Diario Oficial. (1987): Sept. p.p. 18-21.
- 7.- Dodd, E. Barbara; LINCOLN<sup>o</sup> J. Patrick. Inmunología de los Grupos Sanguíneos. Ed. El Manual Moderno. México. 1976. -- p.p. 6-20.
- 8.- Downie, M. Norville; Heath, W. Robert. Métodos Estadísticos Aplicados. 5a. ed. Ed. Harla México. 1986. p.p.201-225.
- 9.- Food and Drug Administration 21. CFR. (Ch.1(4-1-86 ed.)--- p.p. 154-161.

- 10.- Haber, Audrex. Estadística General. 2a. ed. Ed. SITESA -- México. 1986. p.p. 88-104.
- 11.- Hechos y por Menores. Ed. Selecciones Reader's Digest --- México. 1986. p. 13
- 12.- Hughes-Jones, N.C. (1967): The Estimation of the Concen---  
tration and the Equilibrium Constant of Anti-D. Immunol. -  
12:565.
- 13.- Hughes-Jones, N.C.; Gardner, Brigitte. (1964a): -----  
The Effect of pH and Ionic Strength on the Reaction Between-  
Anti-D and Red Cells. Immunol. 7:72.
- 14.- Hughes-Jones, N.C.; Gorick, Barbara. (1984): IgG Pair ----  
Formation on one Antigenic Molecule is the Main Mechanism-  
of Synergy Between Antibodies in Complement-Mediated Lysis.  
Europ. J. Immunol. 14:974-978.
- 15.- Issitt, P.D. (1989): The Impact of Monoclonal Antibodies -  
in Blood Groups Serology. Transfusion. 29(1):58-64.
- 16.- Jaulmes, Ch; Jude, A. Práctica de Laboratorio. 2a. ed. -  
Toray-Masson. Barcelona, España. 1972. p.p. 730-738.
- 17.- Lutz, U. Hanz; Wipf, Gabrielle. (1982): Naturally -----  
Occurring Antibodies to Skeletal Proteins From Human Red -  
Blood Cells. J. Immunol. 128:1695-1699.
- 18.- Margni, A. Ricardo. Inmunología e Inmunología. 4a. ed.-  
Ed. Panamericana. Argentina. 1989. p.p.- 557-570.

- 19.- Milstein, César. (1980): Anticuerpos Monoclonales. -----  
Scientific American. dic.: 100-109.
- 20.- Mollicone, Rosella; Caillard, Thierry; Le Pendu, Jacques; -  
et. al. (1988): Expression of ABH and X (Le\*) Antigens on  
Platelets and Lymphocytes. Blood. 71(4):1113-1119.
- 21.- Mollison, P.L.; Engelfriet, C.P.: Blood Transfusion in --  
Clinical Medicine. 9a. ed. Ed. Blackwell Scientific -----  
Publication. United States of America. 1993. p.p. 77, 81,  
86, 90, 91, 104, 108, 114, 124-131, 149-153, 154-172, 175,  
330, 369-376.
- 22.- Ortiz, Ortiz Librado.: Inmunología. Ed. Panamericana. ---  
México. 1988. p.p.- 78-83, 104-115.
- 23.- Pollack, W.; Hager, H.J.; Reckel, R.; et.al. (1965): ----  
A Study of the Forces Involved in the Second Stage of the  
Haemaglutination. Transfusion. 5:158.
- 24.- Ritt, Ivan. (1984): Essential Immunology. 5a. ed. -----  
Ed. Blackwell Scientific Publications. United States of -  
America. p.p.- 91-97.
- 25.- Rojas, Zamora Silvano R. (1990): Identificación de Donado  
res Hiperinmunes Naturales para la Producción de Antisue-  
ros Hemoclasificadores ABO. Facultad de Química. UNAM ---  
México. p.p. 21-39.
- 26.- Rose, R. Noel; Friedman, Herman. El Laboratorio en Inmuno  
logía Clínica. 2a. ed. Ed. Medica Panamericana. 1984. ---  
Buenos Aires, Argentina. p.p.- 798-808.

**FALTA PAGINA**

**No. 121**

- 36.- van den Eijnden, H. Dirk; Koenderman, H.L. (1988): Biosynthesis of Blood Group i-active Polylactosaminoglycans. --- J. Am. Biol. Chem. 263(25):12461-12471.
- 37.- Wayne, W. Daniel. Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. LIMUSA. México 1980. ----- p.p. 193-241.
- 38.- Yates, D. Alan. Progress in Immunohematology. Ed. American Association of Blood Banks. 1990. Arlington, Virginia. --- p.p. 65-90.
- 39.- Zmijewski, M. Chester. Immunohematology. Ed. Appleton--- Century-Crofts. New York, U.S.A. 1968. p.p. 25, 29-38.
- 40.- Zola, Hedy. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techni--- ques. 4a. ed. Ed. C.R.C. Press Inc. U.S.A. 1991. p.p 1-11, 49-51.