

36
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EMPLEO DE ERITROCITOS DE FENOTIPO
CONOCIDO EN EL SISTEMA DE BANCOS DE
SANGRE DEL INSTITUTO MEXICANO DEL
SEGURO SOCIAL,
(INFORME DE LA PRACTICA PROFESIONAL)

INFORME DE LA PRACTICA PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MA. VICTORIA DOMINGUEZ GARCIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991





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.

INDICE GENERAL

	página
I. - INTRODUCCION	1
II. - GENERALIDADES	5
1. - Descripción y empleo de los paneles	6
- Panel 1. -Eritrocitos A ₁ , A ₂ , B y O	6
- Panel 2. -Eritrocitos Rho (D) positivo y eritrocitos Rho (D) negativo	14
- Panel 3. -Eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados	17
- Panel 4a y 4b. -Eritrocitos de fenotipo conocido para otros sistemas	19
2. - Cálculo de la probable especificidad de los anticuerpos	21
3. - Reacción Antígeno-Anticuerpo	27
4. - Búsqueda de Anticuerpos irregulares	33
- Técnicas salinas	34
- Técnica salina de baja fuerza iónica (Liss)	37
- Técnicas enzimáticas	37
- Técnicas de alta concentración proteica	39
- Consumo de la antiglobulina	40
- Muestra	40
- Procedimiento	41
III. - MATERIAL Y METODOS PARA LA PREPARACION DEL PANEL	50
IV. - MATERIAL Y METODOS PARA VALORACION DE LA ESTABILIDAD DEL PANEL	52

V. - MATERIAL Y METODOS PARA LA SELECCION DE LOS DONADORES DEL PANEL	53
VI. - MATERIAL Y METODOS DEL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO	54
VII. - RESULTADOS	56
VIII. - DISCUSION	56
IX. - CONCLUSIONES	68
X. - BIBLIOGRAFIA	69

INDICE DE LOS CUADROS

pagina

1. - TIPOS DE PANEL ENVIADOS A LOS DIFERENTES SERVICIOS	7
2. - CONTROL DEL PANEL DE CELULAS DE FENOTIPO CONOCIDO	8
3. - ANTIGENOS Y ANTICUERPOS DEL SISTEMA ABO	9
4. - GRUPO ABO, FACTOR Rho (D) Y ANTICUERPOS IRREGULARES	11
5. - CONTROL DE CALIDAD DIARIO	13
6. - CARTA DEL PANEL	20
7. - FRECUENCIA DE FENOTIPOS EN DONADORES DEL VALLE DE MEXICO	25
8. - CLASIFICACION DE LOS ANTICUERPOS	26
9. - CARACTERISTICAS <i>IN VITRO</i> DE LAS INMUNOGLOBULINAS	28
10. - VALOR DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO PARA DIFERENTES ANTICUERPOS	36
11. - EJEMPLO DE ANTICUERPO FRIO: ANTI-P	46
12. - EJEMPLO DE ANTICUERPO CALIENTE: ANTI-Fya	47
13. - EJEMPLO DE MEZCLAS DE ANTICUERPOS: ANTI-E + c	49
14. -EVALUACION DEL REPORTE DE CONTROL DE CALIDAD	55

INDICE DE LAS TABLAS

1. - RESULTADOS DEL PERIODO DE 1977 A 1981	57
2. - RESULTADOS DEL PERIODO DE 1987 A 1990	58
3. - IDENTIFICACION DEL ANTICUERPO ENVIADO (CALIENTES)	59
4. - IDENTIFICACION DEL ANTICUERPO ENVIADO (FRIOS)	61
5. - IDENTIFICACION DEL ANTICUERPO ENVIADO (NEGATIVO)	62
6. - IDENTIFICACION DEL ANTICUERPO ENVIADO (MEZCLAS)	63
7. - ANTICUERPOS COMUNES A LOS DOS PERIODOS	65

I.-INTRODUCCION

En la terapia transfusional se conjuga una serie de eventos que la encuadran dentro de un marco multidisciplinario: el médico que la prescribe, el técnico o enfermera que toma las muestras del paciente, el personal de laboratorio que realiza las pruebas pretransfusionales, el personal que aplica el producto y el médico nuevamente que evalúa el efecto de la transfusión.

Dentro de este cuadro el objetivo del laboratorio del Banco de Sangre es determinante: dar al paciente donde se encuentre, el producto o productos en cantidad suficiente, en el momento preciso y con los estudios pertinentes que avalen su casi inocuidad.

Dentro de estos estudios se encuentran las pruebas pretransfusionales que se llevan a cabo ya sea en el laboratorio del banco de sangre o del servicio de transfusión hospitalario. Estos aseguran de manera adecuada la compatibilidad eritrocitaria y del plasma:

1.- Grupo sanguíneo ABO

2.- Determinación del factor Rho (D)

Ratificación del Rho (D) del donador cuando el paciente es Rho (D) negativo.

3.-Investigación de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO y

4.- Pruebas cruzadas de compatibilidad.

Todos y cada uno de estos exámenes deben estar bajo control. Para este fin, el empleo de un grupo de células de perfil fenotípico conocido (panel) es no solo útil sino indispensable.

Debe recordarse que aún se informan reacciones hemolíticas post transfusionales severas y que el porcentaje de error en la

clasificación de los grupos sanguíneos es aún alto. por otro lado en el servicio del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social se encontró un grupo de pacientes que tienen hasta 12 veces más anticuerpos irregulares circulantes contra antígenos eritrocitarios que los individuos de una población testigo.

Pacientes que sufren de cirrosis hepática, lupus eritematoso sistémico y otros padecimientos autoinmunes, así como mujeres multíparas son otros grupos en donde el hallazgo de anticuerpos irregulares es alto; obviamente la omisión de pruebas pretransfusionales bajo control en todos estos casos produciría accidentes hemolíticos de consecuencias variables para la vida del paciente.

Al inicio de la década de los 60's se inició en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social la integración de la metodología para el estudio de la sangre de los donadores y de los pacientes politransfundidos o con antecedentes de reacciones postransfusionales atribuibles a anticuerpos. De todo esto surgió un grupo de personas cuya sangre reunía una estructura fenotípica eritrocitaria (panel) adecuada para el estudio de los donadores y de los pacientes antes mencionados así como para el control de los antisueros, células y técnicas empleadas en los estudios pretransfusionales.

La necesidad de enviar estas células a otras unidades del Centro Médico Nacional y fuera de él obligó a conservarlas de diferentes maneras, algunas de ellas consumían mucho tiempo antes de su envío rutinario a otras unidades, por ejemplo: 1o) Congelación de las células en glicerol y su descongelación y envío diariamente a las

unidades. 2o) Conservación de las células en suero AB y ACD las que se mantenían adecuadamente solo por una semana, etc.

En 1977 con la coordinación del departamento de Trabajo Social se integró un grupo de 154 donadores del panel distribuidos en tres subgrupos para que cada uno de los subgrupos donara sangre cada 21 días cambiando el método de conservación de las células. Se usó una solución anticoagulante de ACD agregado de Inosina y antibióticos y se logró mantener a las células vivas por 21 días, envasándose en alícuotas de 5 ml. cada una en frascos de vidrio ámbar lo cual también permitió ampliar la red de los envíos.

Implantándose un sistema de control de calidad externo: con el envío de los eritrocitos A₁, A₂, B y O; se realiza la prueba inversa y el control de los antisueros empleados en la tipificación directa. Con los eritrocitos Rho (D) positivos y Rho(D) negativos se controlan los antisueros empleados en la tipificación del factor Rho (D). Con los eritrocitos sensibilizados (con un anticuerpo IgG) y no sensibilizados el control de los sueros antigamaglobulina humana y por último con el envío de 2 sueros control, conteniendo un anticuerpo de especificidad conocida permitan controlar todas las diferentes técnicas empleadas para la búsqueda de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO.

En 1982 se cambió el método de conservación de las células para ampliar su vigencia a 35 días, empleando CPDA-2 agregado de inosina, además se suspendieron al 3% para su uso inmediato. Pero para cubrir las necesidades de todos los envíos se requería de una gran cantidad de frascos, esto aumentó el costo y también el tiempo necesario para su preparación motivos por los cuales se desechó este método.

Finalmente desde 1983 se conservan como sangre total en CPDA-2

agregado de inosina y de antibióticos de ésta forma se preservan adecuadamente los antígenos eritrocitarios por 42 días, renovándose los envíos al término de este tiempo.

II.- GENERALIDADES

El panel de células conocidas se emplea en la investigación rutinaria de anticuerpos irregulares antieritrocitarios fuera del sistema ABO, en donadores y pacientes multitransfundidos y/o múltiparas, en el estudio de la enfermedad hemolítica del recién nacido, en las anemias hemolíticas auto y aloinmunes y como se explicó anteriormente en el control de calidad pretransfusional.

La selección de la sangre para armar el panel se hace en base a la especificidad de los anticuerpos regulares (esperados) e irregulares del sistema ABO y de los anticuerpos irregulares de otros sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios más comunes en la población aloinmunizada y según su frecuencia en nuestro país.

El panel consta de células A₁, A₂, B y O y otras de grupo O que contengan antígenos conocidos del sistema Rh-Hr, MNSS, P, Lewis, Lutheran, Kell-Cellano, Duffy, Kidd, Diego, etc. homocigotos y heterocigotos para esclarecer los problemas de fenómeno de dosis que presentan algunos anticuerpos. Y otras que no los contengan.

Los 5 paneles que forman el panel global son:

PANEL 1.- Eritrocitos A₁, A₂, B y O

PANEL 2.- Eritrocitos Rho (D) positivo y Rho (D) negativo

PANEL 3.- Eritrocitos sensibilizados con IgG anti-D y no sensibilizados.

PANEL 4a.- 10 muestras de diferentes eritrocitos O's de fenotipo conocido para otros sistemas sanguíneos fuera del sistema ABO

Cuando se emplean solamente 5 muestras se llama semipanel (4b)

El sistema de salud IMSS cuenta con:

1.- laboratorios de atención primaria donde se les tipifican a los

pacientes que lo requieran el sistema ABO y el factor Rho (D)

2o.- laboratorios de hospitales generales de zona en donde se ubican servicios de transfusión que realizan pruebas pretransfusionales completas; algunos de estos hospitales cuentan también con bancos de sangre donde se realizan pruebas de selección del donador.

3o.- los bancos de sangre de referencia con servicios de transfusión que se encuentran en hospitales regionales o en centros médicos, en donde se estudian a donadores y a pacientes con problemas transfusionales.

De acuerdo a las necesidades de cada uno de estos bancos o laboratorios se les envía diferentes paneles, dos muestras de sueros con anticuerpos de especificidad conocida y solución de LISS.

(cuadro número 1)

Los usuarios de los paneles reportan en una hoja específica para ello el resultado de su control de calidad, esta hoja de reporte se les envía junto con las células. (cuadro número 2)

DESCRIPCION Y EMPLEO DE LOS PANELES

PANEL 1.- Eritrocitos A₁, A₂, B y O

Consta de 4 diferentes células de fenotipo A₁, A₂, B y O

Este panel se emplea en la identificación de los anticuerpos regulares o esperados del sistema ABO o grupo inverso. Este es el único de todos los sistemas de grupo eritrocitario que contiene anticuerpos naturales regulares (anti-A, anti-AB, anti-B) en el suero. En algunos individuos pueden presentarse también anticuerpos naturales irregulares como el anti-A₁ o el anti-H. (cuadro número 3)

La forma correcta de hacer la tipificación completa de este grupo con la técnica en tubo es la siguiente:

TIPOS DE PANEL ENVIADOS A LOS DIFERENTES SERVICIOS

SERVICIO	TIPO DE PANEL						
	1	2	3	4a	4b	suero control	LISS
Laboratorio de atención primaria	si	si					
Hospitales generales de zona	si	si	si		si	si	si
Bancos de hospitales regionales y de centros medicos	si	si	si	si	si	si	si
Otros servicios del sector salud	si	si	si	si	si	si	si

CUADRO NUMERO 1

BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CENTRO MEDICO NACIONAL. I.M.S.S.

CONTROL DEL PANEL DE CELULAS DE FENOTIPO CONOCIDO

Panel número _____

Antisueros		Celulas			
Marca/lote/fecha caducidad		A ₁	A ₂	B	O
	Anti-A				
	Anti-AB				
	Anti-B				
	Anti-A ₁				
	Anti-H				
	Anti-D	R/r	rr		
	Control				

Suero de Coombs	Diluciones del suero de Coombs						
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
eritrocitos sensibilizados							
eritrocitos no sensibilizados							
Consumo de A. G. H.							

Computo _____

Investigación de anticuerpos irregulares fuera del S. ABO

Técnica	SUERO No.1										SUERO No.2									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S/r																				
S/22																				
S/37																				
S/c																				
Consumo AGH																				
Alb/r																				
Alb/37																				
Br/22																				
Br/37																				
Br/c																				
Consumo AGH																				
Liss/c																				
Consumo AGH																				

Resultados: SUERO No.1 _____
 SUERO No.2 _____

Unidad que reporta _____

Responsable de este reporte
 Nombre y firma _____

fecha _____

CUADRO NUMERO 2

ANTIGENOS Y ANTICUERPOS DEL SISTEMA ABO

GRUPO	SUBGRUPO	ANTIGENOS ERITROCITARIOS	ANTICUERPOS EN EL SUERO
O	---	H	anti-A anti-B anti-AB (anti-A ₁)
A	A ₁	A + A ₁ + H	anti-B (anti-H)
	A ₂	A + H	anti-B (anti-A ₁)
B	---	B + H	anti-A (anti-A ₁)
AB	A ₁ B	A + A ₁ + B + H	ninguno (anti-H)
	A ₂ B	A + B + H	ninguno (anti-A ₁)

Los datos entre parentesis son de los anticuerpos naturales irregulares, que algunas veces se encuentran en los sujetos de los subgrupos señalados.

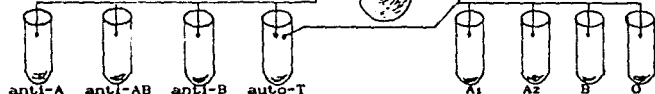
CUADRO NUMERO 3

muestra del paciente

1 gota de suspensión al 3%
de eritrocitos en su mismo

2 gotas de suero

suero



SUEROS CONOCIDOS

ERITROCITOS CONOCIDOS

una gota

1 gota de suspensión al 3% en salina

PRUEBA DIRECTA

PRUEBA INVERSA

Centrifugar los tubos a 3 500 rpm durante 30 segundos, o el tiempo y las revoluciones por minuto que se determinen en la calibración de la centrífuga.

Leer aglutinación en la prueba directa y aglutinación y/o hemólisis en la prueba inversa, de cada uno de los tubos.

Se leen uno por uno anotando de inmediato el resultado en hojas impresas para tal propósito. (cuadro número 4)

Con los sueros conocidos anti-A, antiAB y anti B, se identifican antígenos del sistema ABO sobre los eritrocitos que se van a tipificar (prueba directa). Mientras que con los eritrocitos conocidos A1, A2, B y O se identifican los anticuerpos antitéticos (prueba inversa). El autotestigo o autocontrol valida el resultado.

La imagen normal de los 4 principales grupos sanguíneos del sistema ABO es la siguiente:

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
BANCO CENTRAL DE SANGRE CENTRO MEDICO NACIONAL

GRUPO ABO, FACTOR Rho (D) Y ANTICUERPOS IRREGULARES

IDENTIFICACION DEL PACIENTE

Nombre _____
No. de afiliación _____
Hospital _____
No. cama _____

FECHA _____

Motivo del estudio _____

Clasificación de Grupos ABO y Rho (D)

Anti-A	Anti-AB	Anti-B	Auto-T
A1	A2	B	O

RESULTADO

RESULTADO

Anti-D	Auto-T

Búsqueda de anticuerpos irregulares fuera de S: ABO

Técnica	Células del panel										auto-T
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
S/r											
S/22											
S/37											
S/c											
Consumo AGH											
Alb/r											
Alb/37											
Br/22											
Br/37											
Br/c											
Consumo AGH											
Liss/c											
Consumo AGH											

Conclusiones _____

Nombre y firma de quien efectuó las pruebas _____

Nombre y firma del supervisor _____

GRUPOS	PRUEBA DIRECTA				PRUEBA INVERSA			
	anti-A	anti-AB	anti-B	auto-T	A ₁	A ₂	B	O
A	+	+	-	-	-	-	+	-
B	-	+	+	-	+	+	-	-
AB	+	+	+	-	-	-	-	-
O	-	-	-	-	+	+	+	-

Este panel se utiliza también para llevar a cabo el control de calidad de los diferentes antisueros comerciales que se utilizan para realizar la prueba directa, y los eritrocitos que se emplean en la prueba inversa. Se ponen en contacto los anticuerpos anti-A, anti-AB y anti-B con los eritrocitos conocidos A₁, A₂, B y O. De esta forma se comprueban la especificidad y la actividad de los antisueros probados y el grupo correcto de los eritrocitos. Este control se realiza diariamente antes de empezar a trabajar las muestras de los pacientes o de los donadores. (cuadro número 5)

ANTISUERO CONOCIDO	ERITROCITOS CONOCIDOS			
	A ₁	A ₂	B	O
Anti-A	+	+	-	-
Anti-AB	+	+	+	-
Anti-B	-	-	+	-

LECTINA CONOCIDA (si se cuenta con ellas)				
Anti-A ₁	+	-		
Anti-H	-	+		

Las lectinas son glucoproteínas de origen no inmunológico que tienen la particularidad de aglutinar células, en este caso eritrocitos por interacción con los azúcares del glucocálix. Estas sustancias se descubrieron por primera vez en las plantas pero también las hay en

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CENTRO MEDICO NACIONAL

CONTROL DE CALIDAD DIARIO

Laboratorio _____

Fecha _____

Panel número _____

Antisueros		Células			
Marca/lote/fecha de caducidad		A1	A2	B	O
	Anti-A				
	Anti-AB				
	Anti-B				
	Anti-A ₁				
	Anti-H				
		R1r	rr		
	Anti-D				
	Control				

Suero de Coombs	Diluciones del suero de Coombs						
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
eritrocitos sensibilizados							
eritrocitos no sensibilizados							
Consumo AGH							

Computo _____

RESPONSABLE DEL REPORTE

Nombre y firma

CUADRO NUMERO 5

muchos organismos. Las lectinas señaladas arriba provienen de vegetales:

Dolichos biflorus su especificidad es anti-N-acetilglucosamina (A₁)

Ulex europeus su especificidad es anti-L-fucosa (H)

PANEL 2.- Eritrocitos Rho (D) positivo y eritrocitos Rho (D) negativo.

Este panel esta formado por dos tipos de células:

1.- Rho (D) positivo del tipo R₁r (CcDee)

2.- Rho (D) negativo del tipo rr (ccdee)

El número de determinantes antigénicos varía según el genotipo Rh más probable. Rochna y Hughes-Jones, determinaron el número probable de estos sitios para el antígeno D, obteniendo los siguientes resultados:

GENOTIPO MAS PROBABLE		No. SITIOS ANTIGENICOS D
R ₁ R ₁	CDe/CDe	14 500 - 19 300
R ₂ R ₂	cDE/cDE	15 800 - 33 300
R ₁ r	CDe/cde	9 900 - 14 600
R ₂ r	cDE/cde	14 000 - 16 600
R ₁ R ₂	CDe/cDE	23 000 - 31 000
R ₀ R ₀	cDe/cDe	12 000 - 20 000

Es por esta razón que las células R₁r se seleccionan para realizar el control del suero anti-D. Un suero anti-D comercial con baja actividad, y por lo tanto inadecuado para la tipificación, dará una reacción débil o negativa con estas células.

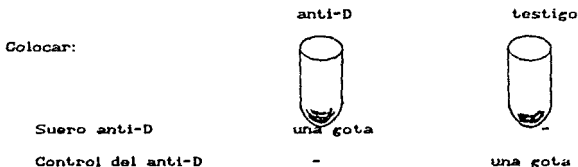
El control de calidad del suero tipificador anti-D se efectúa de la siguiente manera. (cuadro número 5)

	células Rr	células rr
Suero anti-D	3+	-
Control del anti-D	-	-

El resultado positivo debe ser una aglutinación de 3 cruces por lo menos. Si este fuera menor, es un suero que está fuera de control por lo tanto no se debe usar.

La forma correcta de tipificación del antígeno Rho (D) del sistema Rh-Hr es la siguiente:

Rotular dos tubos de 10 x 75 mm. así:



Agregar una gota a cada tubo de una suspensión de eritrocitos del problema al 3% hecha en el propio suero del problema. O como se indique en el instructivo del reactivo.

Mezclar y centrifugar a 3 500 rpm por 90 segundos. O como se indique en el instructivo del reactivo y leer el resultado

anti-D	testigo
3+	neg

Si este es el caso no hay ningún problema y el resultado se reporta así: Rho (D) positivo.

Pero si se hubiera obtenido la imagen siguiente:

anti-D	testigo
neg	neg

Incubar los tubos a 37°C durante 30 minutos. O como se indique en el instructivo del reactivo. Centrifugar y leer. Si la imagen obtenida es la siguiente:

anti-D	testigo
3+	neg

El resultado se reporta así: Rho (D) Positivo variedad Du.

Pero si se hubiera obtenido la siguiente imagen:

anti-D	testigo
neg	neg

Lavar los eritrocitos 3 veces con solución salina 0.9 %. Llenando los tubos en cada lavado. Después del último lavado decantar perfectamente la solución salina y con papel absorbente secar el labio del tubo, agregar una gota de suero de Coombs, mezclar y centrifugar a 3 500 rpm durante 30 segundos y leer. Si se obtiene la siguiente imagen:

anti-D	testigo
neg	neg

El resultado se reporta así: Rho (D) Negativo.

Pero si la imagen es la siguiente:

anti-D	testigo
3+	neg

El resultado se reporta así: Rho (D) Positivo variedad Du.

El tubo marcado como testigo debe dar siempre un resultado negativo para validar la tipificación. El reactivo llamado Control del anti-D contiene la misma solución que tiene el suero anti-D a excepción del

anticuerpo anti-D.

Las células Du reaccionan con el suero anti-D más debilmente que las células D normales. Algunas de ellas solo fijan del 7 al 25 % de ese anticuerpo (Masourdis, 1960) ya que el antígeno D se encuentra en muy poca cantidad. Existen diferentes grados Du, el de más bajo grado solo se pone en evidencia con la prueba de la antiglobulina humana o suero de Coombs.

PANEL 3. - Eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados.

Son células Rir sensibilizadas con IgG anti-D y células no sensibilizadas que se emplean para el control de especificidad y reactividad del suero antiglobulina humana o suero de Coombs. La cantidad de suero anti-D para sensibilizar las células Rir se determina experimentalmente para cada lote de suero que se emplee.

Este control se realiza diariamente antes de usar el suero de Coombs (cuadro número 5)

La forma de realizar el control de calidad del suero antiglobulina humana es la siguiente:

En tubos de 10 x 75 mm. y con pipeta pasteur realizar diluciones seriadas con solución salina del suero de Coombs.

Diluciones del suero de Coombs
(una gota)

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Eritrocitos sensibilizados							
al 3% (una gota)	++++	+++	++	+	g	-	-
Eritrocitos no sensibilizados							
al 3% (una gota)	-	-	-	-	-	-	-

Los eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados son lavados 3 veces antes de emplearse. Para ello se utiliza solución salina 0.9%.

Por un volumen de células se emplean 150 volúmenes de solución salina, para que sea adecuado el lavado.

Es importante resaltar que la solución salina 0.9 % debe estar estéril. Esto se aplica a todas las técnicas inmunohematológicas.

Mezclar y centrifugar a 3 500 rpm durante 30 segundos .

Leer la aglutinación en cruces, para reportar el resultado en título y puntuación.

En este caso el título es 1/16 y la puntuación es de 36.

Un suero de Coombs aceptable debe tener una puntuación mayor o igual a 28 puntos con este sistema de células "medianamente" sensibilizadas y de cero con las células no sensibilizadas.

Las células de este panel no deben estar fuertemente sensibilizadas porque sueros de Coombs de bajo título las aglutinarían.

La puntuación de la reacción se obtiene sumando la puntuación individual para cada dilución de acuerdo con la siguiente tabla:

INTENSIDAD DE LA REACCION	EQUIVALENCIA EN PUNTOS
++++	12
+++	10
++	8
+	5
(+)	3
(granuloso) 6	1
negativo	0

CONSUMO DE LA ANTIGLOBULINA

Otra de las pruebas de control insoslayable en donde se emplean

eritrocitos sensibilizados, es la prueba del consumo de la antiglobulina; esta prueba sirve como control de pruebas cruzadas, de la búsqueda de anticuerpos libres en el suero y despegado de los eritrocitos cuando se emplea la reacción de Coombs. Si la prueba en Coombs es negativa se agrega a ella eritrocitos sensibilizados, los que deben ser aglutinados si el suero de Coombs de la prueba no ha sido consumido, lo que asegura el control del proceso. (cuadro número 4)

PANEL 4a y 4b.- Eritrocitos de fenotipo conocido para otros sistemas de grupo fuera del sistema ABO. Como son: Rh-Hr, MNSs, P, Lewis, Kell-cellano, Duffy, Kidd, Diego, etc.

Este panel consta de 10 o de 5 tipos de células, todas ellas de grupo O. Los antígenos del sistema Rh-Hr están distribuidos de la siguiente manera:

Células No. 1	R ₁ R ₁	CCDee
Células No. 2	R ₂ R ₂	ccDEE
Células No. 3	r r	ccdee
Células No. 4	R ₁ r	CcDee
Células No. 5	R ₁ R ₂	CcDEe

El resto de los antígenos eritrocitarios están distribuidos de tal manera entre las cinco ó diez células que faciliten la identificación de los anticuerpos correspondientes.

La cartas del panel se integran como el ejemplo mostrado en el cuadro número 6.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 DELEGACION 3 SUROESTE DEL VALLE DE MEXICO
 BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CENTRO MEDICO NACIONAL

CARTA DEL PANEL

	C	D	E	c	e	M	N	S	s	P	FYa	FYb	K	k	Jka	Jkb	Lea	Leb	Dia	Dib
1	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
2	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
3	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
7	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
8	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
9	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
10	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-

CARTA DEL PANEL No. VI - 1989

VALIDO HASTA EL 19 de octubre de 1989

Semipanel. - 1, 2, 3, 4 y 5

Rho (D) negativo. - 3 y 7

Rir. - 4 y 6 usese para la evaluación del anti-Rho (D)

Kell. - 3

Lea. - 4

CUADRO NUMERO 6

CALCULO DE LA PROBABLE ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS

Para la identificación concluyente de la especificidad de un anticuerpo, se requiere que este se pruebe con un panel suficiente de células que contengan el antígeno específico y otras que no lo tengan y asegurar que la imagen de reactividad del anticuerpo no es resultante del azar. Para este fin se debe de aplicar una prueba de probabilidad simple como lo es el método exacto de Fisher de Tablas 2 x 2 el cual puede ayudar a determinar el nivel de probabilidad de la especificidad de un anticuerpo a través de la interpretación de los resultados de este tipo de prueba. En este método una probabilidad menor o igual a 1/20 es significativa. Lo que quiere decir que si P es igual o menor a 1/20 es probable que el anticuerpo encontrado esté relacionado efectivamente con el antígeno correspondiente, mientras que si P es mayor que 1/20 significa que la relación del anticuerpo con el antígeno es una relación al azar.

La tabla 2 x 2 es la siguiente:

		Antígeno		
		+	-	
Anticuerpo	+	a	b	a+b=A
	-	c	d	c+d=B
		a+c=C	b+d=D	A+B=C+D=T

La probabilidad P se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{A!B!C!D!}{T!} \times \frac{1}{a!b!c!d!}$$

Para el ejemplo de la carta del panel aquí mostrada (cuadro número 6) se desea saber de acuerdo al siguiente resultado si el anticuerpo es de probable especificidad anti-C

		Células del panel									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Técnicas	S/r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S/37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S/c	4+	-	-	4+	4+	4+	-	-	4+	4+

Se elabora la tabla 2 x 2

		Antígeno		
		C+	C-	
Anticuerpo	+	6	0	6
	-	0	4	4
		6	4	10

Se calcula P

$$P = \frac{6!4!6!4!}{10!} \times \frac{1}{6!0!4!} = \frac{1}{210}$$

De donde P menor que 1/120, por lo tanto la probabilidad de que el anticuerpo sea de especificidad anti-C es correcta.

Así como se calculó P para saber la significancia estadística del anti-C, se puede determinar para el resto de los anticuerpos de acuerdo a la siguiente tabla: (cuadro número 6)

ANTICUERPO anti-	ANTIGENO		P
	Pos	Neg	
N	5	5	1/252
C	6	4	1/210
c, P, Fyb	7	3	1/120
E	3	7	1/120
D, e, S, s, Fya, Jkb, Leb	8	2	1/45
Dia	2	8	1/45
M, Jka, Dib	9	1	1/10
K, Lea	1	9	1/10
k	10	0	1

El anticuerpo encontrado tendrá mayor significancia estadística cuanto menor sea la P.

En la tabla anterior se observa que $P = 1/10$ para los siguientes anticuerpos anti-: M, Jka, K, Dib y Lea la cual es mayor que $1/20$, por lo tanto es difícil asegurar la especificidad de estos anticuerpos con el panel de referencia, y la probabilidad es mucho menor para anti-k con una $P=1$, por lo que debe entonces hacerse un panel dirigido de 3 células que contengan el antígeno y 3 células que no lo contengan, con lo que se puede alcanzar una $P = 1/20$. En el caso del anti-k lo anterior no es necesario, pues en México la totalidad de la población es k positiva.

El panel óptimo será aquel que nos resuelva todos los problemas de anticuerpos con una P menor o igual a $1/20$. Lo ideal sería distribuir todos los antígenos en las diez células que conforman el panel, lo cual es imposible por la frecuencia de fenotipos de nuestra población que es diferente a otras razas. En el Banco

Central de Sangre del Centro Médico Nacional se realizó un estudio para conocer la frecuencia de estos diferentes fenotipos. Se estudiaron en total 2047 sujetos. (cuadro número 7)

Con este panel se realiza la búsqueda de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO.

En contraste con los anticuerpos del sistema ABO: anti-A, anti-AB y anti-B que son regulares (esperados), para todos los demás sistemas antigénicos del eritrocito no existe la presencia de anticuerpos en forma regular, si llegaran a encontrarse será en forma irregular (inesperados). Si la producción de los anticuerpos se debe a un estímulo diferente a eritrocitos, por sustancias presentes en la naturaleza con estructura química similar a los antígenos eritrocitarios estos anticuerpos se llaman: naturales irregulares, también reciben el nombre de xenoanticuerpos.

Cuando la estimulación antigénica es directa con eritrocitos ya sea por transfusión o por vía placentaria (por embarazos, partos o abortos) se les llama anticuerpos inmunes, también se les da el nombre de aloanticuerpos.

La búsqueda de anticuerpos se encamina a encontrar los anticuerpos naturales irregulares (xenoanticuerpos) y los inmunes (aloanticuerpos). En el cuadro número 8 se presenta una clasificación de los anticuerpos más comunes y que se pueden identificar con el panel preparado en el Banco Central de Sangre.

Como respuesta a los antígenos eritrocitarios se pueden formar inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA. Desde el punto de vista transfusional nos interesan únicamente las IgM e IgG.

Los anticuerpos IgM se producen como respuesta inmune primaria y los IgG como respuesta inmune secundaria. Pero sin saber por qué para

FRECUENCIA DE FENOTIPOS EN DONADORES DEL VALLE DE MEXICO
BANCO CENTRAL DE SANGRE C. M. N.

R ₁ R ₁	CCDEe	26.40 %
R ₂ R ₂	ccDEE	6.93 %
R ₁ R ₂	CcDEe	26.07 %
R ₂ R ₁	CCDEe	3.79 %
R ₂ R ₂	CcDEE	3.8 %
R ₂ R ₂	CCDEE	2.3 %
R ₁ r	CcDee	17.73 %
R ₂ r	ccDEe	7.5 %
R ₀ r	ccDee	1.56 %
R ₂ r'	CCDEe	0.0 %
r'r	ccdee	2.64 %
r'r	Ccdee	0.16 %
r'r'r	ccdEe	0.16 %
r'r'r'	ccdEE	0.16 %
ryry	CCdEE	0.3 %
	CCD uee	
	ccD uee	
	MNss	18.08 %
	MNSs	17.24 %
	MMSS	23.29 %
	NNss	7.14 %
	MMss	15.39 %
	MMSS	11.18 %
	MNSS	4.3 %
	NNSS	0.67 %
	Fy(a-b-)	40.67 %
	Fy(a-b+)	15.0 %
	Fy(a+b-)	42.65 %
	Fy(a+b+)	1.65 %
	Jk(a-b-)	25.19 %
	Jk(a-b+)	18.02 %
	Jk(a+b+)	56.78 %
	Le(a-b-)	6.0 %
	Le(a-b+)	10.0 %
	Le(a+b+)	84.0 %
	P ₁ (+)	68.89 %
	P ₁ (-)	31.11 %
	Kk	2.0 %
	kk	98.0 %

CUADRO NUMERO 7

CLASIFICACION DE LOS ANTICUERPOS

NATURALES	REGULARES	Sistema ABO	<ul style="list-style-type: none"> anti-A anti-AB anti-B
	IRREGULARES	Sistema ABO	<ul style="list-style-type: none"> anti-A₁ anti-H
Sistema MNSs		<ul style="list-style-type: none"> anti-M anti-N 	
Sistema P		<ul style="list-style-type: none"> anti-P₁ 	
Sistema Lewis		<ul style="list-style-type: none"> anti-Lea anti-Leb 	
INMUNES	IRREGULARES	Sistema Rh-Hr	<ul style="list-style-type: none"> anti-D anti-c anti-E anti-C anti-e
		Sistema MNSs	<ul style="list-style-type: none"> anti-S anti-s
		Sistema Duffy	<ul style="list-style-type: none"> anti-Fy_a anti-Fy_b
		Sistema Kell-cellano	<ul style="list-style-type: none"> anti-K
		Sistema Kidd	<ul style="list-style-type: none"> anti-Jk_a anti-Jk_b
		Sistema Diego	<ul style="list-style-type: none"> anti-Di_a anti-Di_b

CUADRO NUMERO 8

algunos antígenos se queda la respuesta en forma primaria, es decir, a pesar de la constante estimulación antigénica solo se encuentran inmunoglobulinas IgM, sobre todo cuando se trata de xenocuerpos.

Generalmente los anticuerpos IgM son anticuerpos aglutinantes que reaccionan mejor a temperaturas bajas (4-22°C) por lo que se les llama también "anticuerpos fríos", si se encuentran en algún paciente no darán problemas de reacción transfusional a menos que fijen complemento lo que daría por resultado una hemólisis intravascular.

Esta hemólisis intravascular es una reacción inmediata.

Generalmente los anticuerpos IgG no son aglutinantes (incompletos), pero sí son sensibilizantes y los eritrocitos recubiertos por estos anticuerpos son retirados de la circulación sanguínea por el sistema retículo endotelial(S.M.F.) dando como resultado una hemólisis extravascular. La hemólisis extravascular es una reacción tardía.

La temperatura óptima de actividad de estos anticuerpos es a 37°C motivo por lo cual se les denomina "anticuerpos calientes".

Los anticuerpos peligrosos desde el punto de vista transfusional son los anticuerpos IgM fijadores de complemento y los anticuerpos IgG.

Por lo cual las técnicas adecuadas para la búsqueda de anticuerpos son aquellas que nos permitan identificarlos. En el cuadro número 9 se enlistan las características más importantes para la observación "in vitro" de estos anticuerpos.

REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO

Para poder observar de forma adecuada la reacción antígeno (Ag) anticuerpo (Ac), es necesario conocer un poco la físicoquímica de la reacción.

CARACTERISTICAS IN VITRO DE LAS INMUNOGLOBULINAS

	IgG	IgM
Valencia	2	5
Aglutinante	algunas	si
Hemolizante	no	algunos
Fija Complemento	no	algunos
Velocidad de reacción en medio salino	lenta	rápida
Temperatura óptima de reacción	37°C	22°C

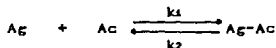
CUADRO NUMERO 9

El complejo Ag-Ac se mantiene unido por enlaces débiles como son:

Puentes de hidrógeno	5 kcal/mol
Atracciones coulómbicas	4.5 kcal/mol
Fuerzas de Van der Waals	2.5 kcal/mol

La combinación de estos diferentes tipos de enlace produce una fuerza de enlace total de 10-14 kcal/mol; juega un papel importante un cuarto tipo de uniones como son la atracciones hidrofóbicas que no aportan energía al enlace pero por su capacidad de repeler agua ayudan a que se formen los enlaces antes mencionados.

Escribiendo la reacción entre el antígeno y el anticuerpo como cualquier reacción química se puede aplicar la ley de acción de masas para calcular la constante de equilibrio (K).



$$K = \frac{[\text{Ag}] [\text{Ac}]}{[\text{Ag-Ac}]} = \frac{k_1}{k_2}$$

donde: K = constante de equilibrio

k₁ = constante de asociación

k₂ = constante de disociación

[Ag] = concentración de antígeno libre en el equilibrio

[Ac] = concentración de anticuerpo libre en el equilibrio

[Ag-Ac] = concentración del complejo Ag-Ac en el equilibrio

Desde luego es necesario conocer la valencia de los reactantes.

La valencia es la capacidad de combinación. Para los anticuerpos IgG es de 1 ó de 2, es decir el anticuerpo se puede fijar a un

determinante antigénico en un eritrocito ocupando una valencia, o puede unirse a dos determinantes ocupando las dos valencias, estas dos valencias pueden ser ocupadas sobre determinantes antigénicos de un solo eritrocito o sobre dos eritrocitos diferentes.

Para la IgM la valencia puede ser de 1, 2, 3, 4 ó hasta 5, es decir puede unirse a determinantes antigénicos hasta de 5 eritrocitos, por esta razón la IgM es aglutinante.

Como se puede observar la reacción es reversible. El valor de la constante de equilibrio da una idea de la fuerza del enlace entre el antígeno y el anticuerpo y predice el sentido de la reacción.

Por supuesto que como a cualquier reacción química se le puede aplicar las leyes de la termodinámica:

Primera ley.- La energía no se crea ni se destruye

El cambio de energía de la reacción se mide en forma de calor o entalpia (H).

Cuando un proceso se realiza absorbiendo calor del medio se le llama endotérmico. Las reacciones con anticuerpos IgG son reacciones endotérmicas, pues necesitan absorber calor del medio, esto se logra poniendo un medio caliente, 37°C.

Cuando un proceso se realiza cediendo calor al medio se le llama exotérmico. Las reacciones con anticuerpos IgM son reacciones exotérmicas, pues necesitan ceder calor al medio, esto se logra poniendo un medio frío, 22°C.

Segunda ley.- Ningún proceso puede realizarse con disminución de la entropia (S) del universo.

Cuando se forma el complejo Ag-Ac hay liberación de alrededor de 20 moléculas de agua por un rearrreglo de la estructura terciaria de la molécula del anticuerpo por la formación de uniones hidrofóbicas,

esto da lugar a un aumento de la entropía.

La variación de entropía que se produce en un proceso esta relacionada con el incremento de la energía interna del sistema llamada energía libre (G).

Estas tres funciones de estado termodinámico están relacionadas en la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

donde: ΔG = cambio de la energía libre

ΔH = cambio de la entalpia

ΔS = cambio de la entropía

Como el proceso se lleva a cabo a temperatura, presión y volumen constantes $\Delta H = \Delta E$, la ecuación anterior se convierte en:

$$\Delta E = \Delta G + T \Delta S$$

La energía libre del sistema se relaciona con la constante de equilibrio mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G = - RT \ln K_{eq}$$

donde: R = constante de los gases

T = temperatura absoluta

$\ln K_{eq}$ = logaritmo natural de la constante de equilibrio

De esta forma se pueden conocer todas las funciones termodinámicas a través de la constante de equilibrio. En el cuadro número 10 se enlistan valores de las constantes de equilibrio para diferentes anticuerpos.

La constante de equilibrio se ve afectada por:

VALOR DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO PARA DIFERENTES ANTICUERPOS

INMUNOGLOBULINA	ESPECIFICIDAD	ERITROCITOS	K (L/mol)
IgG (conejo)	anti-A	A ₁ (adulto)	7.4×10^6
		A ₁ B (adulto)	5.1×10^6
		A ₂ (adulto)	2.1×10^6
		A ₁ (cordón)	3.3×10^7
		A ₁ B (cordón)	2.1×10^7
IgM	anti-Lea		8.4×10^6
IgG	anti-D		2.0×10^6
	anti-E		4.0×10^6
	anti-e		2.5×10^6
	anti-c		4.4×10^6
IgM	anti-D		1.7×10^6
IgG	anti-K		2.6×10^{10}

CUADRO NUMERO 10

pH

Temperatura

Fuerza iónica

Naturaleza del anticuerpo (IgG ó IgM)

Naturaleza del antígeno (polisacárido ó polipéptido)

Densidad antigénica

Concentración del antígeno y del anticuerpo

Conociendo y controlando todos los factores que afectan la reacción Ag-Ac es posible hacer que la constante de asociación k_1 sea muy grande, y el equilibrio se desplace hacia la derecha, o hacer que k_2 sea muy grande y el equilibrio se desplace hacia la izquierda. Depende de lo que se quiera, ya sea formar el complejo Ag-Ac y conocer antígenos desconocidos con anticuerpos conocidos ó conocer anticuerpos desconocidos con antígenos conocidos. O por el contrario romper un complejo ya formado para dejar libre al anticuerpo y después estudiarlo.

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS IRREGULARES

Para poner de manifiesto la reacción Ag-Ac se deben tener en cuenta todos los factores antes mencionados pues de no considerarse es posible que pase desapercibida o sea difícil de valorar, teniendo estos errores repercusiones incluso fatales en situación transfusional.

Por otra parte la búsqueda de anticuerpos irregulares se convierte en una verdadera investigación científica, en la que hay que contestar las siguientes preguntas:

- 1.- Hay anticuerpos en la muestra?
- 2.- Solo uno o es una mezcla?

3.- Cual o cuales son las especificidades más probables?

4.- Son naturales o inmunes?

Tal vez se puedan formular más interrogantes, pero con las aquí expuestas se ve la necesidad de tener el máximo posible de resultados o datos para poder darles respuesta.

A continuación se mencionará el fundamento de las técnicas más empleadas en el laboratorio del Banco Central de Sangre para la búsqueda de anticuerpos irregulares.

TECNICAS SALINAS

Las técnicas salinas con solución isotónica de cloruro de sodio resultan ser las más usadas porque reaccionan bien todos los anticuerpos, son realmente las más baratas y las más fáciles de controlar. Tal vez tengan el inconveniente de ser las más tardadas pero en una búsqueda de anticuerpos programada no existe tal inconveniente. En caso de urgencia es mejor emplear una técnica rápida pero éstas deben de tener un control más estricto.

Para realizar la identificación de la especificidad del anticuerpo o de los anticuerpos presentes en un suero, es indispensable el realizar las técnicas salinas y por lo menos otra más, ya sea esta enzimática, de alta concentración proteica o la salina de baja fuerza iónica.

Salina rápida (S/r)

En esta técnica se usa como medio de reacción un medio salino isotónico con cloruro de sodio a concentración de 0.9% con el que se obtiene una fuerza iónica de 0.15μ

En este sistema reaccionan bien los anticuerpos aglutinantes fríos y de velocidad rápida. Generalmente de naturaleza IgM como son:

anti-H, anti-I, anti-M, anti-N, anti-P, anti-Lea y anti-Leb.

Es importante recordar que una prueba cruzada de compatibilidad sanguínea es una búsqueda de anticuerpos pero a diferencia de los anticuerpos buscados con el panel 4a y 4b que nos sirve para buscar anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO, en las pruebas cruzadas se buscan anticuerpos de todo tipo incluyendo los anticuerpos naturales regulares del sistema ABO, por lo que en las técnicas salinas de pruebas cruzadas el hecho de tener una prueba mayor incompatible en salina rápida nos alerta ante la posibilidad de una equivocada selección del grupo ABO de la sangre que se va a transfundir.

Salina 22 (S/22)

Es el mismo medio salino que en la técnica anterior pero se incuba una hora a 22°C para que los anticuerpos aglutinantes fríos y de velocidad lenta puedan actuar. Los anticuerpos que reaccionan bien en esta técnica son básicamente los mismos que en la S/r, pero se evidencia su efecto.

Salina 37 (S/37)

Es el mismo medio salino que las dos anteriores pero se incuba una hora a 37°C para que los anticuerpos IgG calientes y de reacción lenta puedan observarse, desde luego necesitan ser aglutinantes, tal es el caso de los siguientes anticuerpos: anti-S, anti-E, algunos anti-C, algunos anti-D.

Los anticuerpos IgM que funcionan bien a 22°C al incubarse una hora a 37 C "desaparecen", es decir se hace reversible la reacción ($k_2 > k_1$). Los anticuerpos IgM fijadores de complemento lo hacen a esta temperatura de 37°C, pero el complemento no es capaz de

aglutinar a los eritrocitos. La fracción del complemento que se queda adherida al eritrocito es la fracción C3d, y se descubrirá su presencia con la ayuda del suero de Coombs de amplio espectro.

Salina Coombs (S/c)

Este procedimiento es complementario de la técnica anterior. Si la reacción se llevó a cabo en S/37 y se logró observar por aglutinación ya no es necesario realizarla. Dicho de otra manera los tubos positivos de aglutinación en S/37 ya no se les hace la prueba de Coombs, solamente se efectúa en los tubos donde no se observó aglutinación.

Si la reacción que se efectuó en la técnica S/37 ya sea por fijación del C3d o por fijación de la IgG a su determinante antigénico no se puede observar por faltar la aglutinación, es necesaria la ayuda de un anticuerpo adicional que haga la red de aglutinación.

Como ejemplo de anticuerpos IgG que se ven en esta técnica están: anti-D, anti-c, anti-e, anti-s, anti-Fy_a, anti-Fy_b, anti-K, anti-D1a, anti-D1b, etc.

Como ejemplo de anticuerpos IgM irregulares fijadores de complemento están: anti-Jka, anti-Jkb, etc.

Recordar que los anticuerpos regulares del sistema ABO son fijadores de complemento, y algunos irregulares como el anti-A₁ y el anti-H pueden serlo también.

Este anticuerpo adicional es en realidad una mezcla de anticuerpos IgG de conejo de especificidad anti-IgG (humana) y de especificidad anti-C3d (humana).

Estos anticuerpos forman lo que se conoce con el nombre de suero antiglobulina humana o suero de Coombs. En este caso por tener

anticuerpos de dos especificidades se llama polivalente o poliespecífico. Este reactivo es el que se necesita para la búsqueda de anticuerpos pues permitirá la observación de anticuerpos IgG como de IgM fijadores de complemento, que como ya se mencionó anteriormente son los involucrados en reacción transfusional.

Conviene recordar que existen también sueros de Coombs monovalentes o mono-específicos de las siguientes especificidades: anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-C3d, anti-C3c, etc.

TECNICA SALINA DE BAJA FUERZA IONICA (LISS)

Liss/c

En esta técnica se emplea un medio salino pero de menor concentración que las técnicas salinas antes mencionadas, para mantener la isotonicidad de la solución se usa un aminoácido anfótero como lo es la glicina. Se usa una preparación especial (Ver material y métodos de la preparación de la solución de baja fuerza iónica o LISS) la cual tiene una fuerza iónica de 0.03μ

Al disminuir la fuerza iónica los anticuerpos IgG lentos en S/37 se vuelven más rápidos pues se tiene menor interferencia electrolítica para que los enlaces débiles ya mencionados puedan llevarse a cabo de una manera más fácil. Por lo que el tiempo de incubación se acorta de 60 minutos a solo 10 minutos. Desde luego que necesita de la ayuda del suero de Coombs para observar la aglutinación.

En esta técnica funcionan bien los anticuerpos que lo hacen en S/c pero en un tiempo menor.

TECNICAS ENZIMATICAS

Las enzimas proteolíticas como son la papaína, ficina, tripsina,

bromelina etc. remueven ácido siálico del glucocalix del eritrocito por lo tanto al tener menos barreras el anticuerpo puede llegar más facilmente con su determinante antigénico. Además el hecho de remover el ácido siálico que es el compuesto químico que dá la carga neta negativa a las células sanguíneas, se disminuye el potencial zeta (o fuerza de repulsión de los eritrocitos) permitiendo que anticuerpos que no son aglutinantes en medios salinos se manifiesten como aglutinantes con este tratamiento enzimático. La enzima que se utiliza en el Banco Central de Sangre es la bromelina.

Es importante señalar que la mayoría de las preparaciones de bromelina pueden destruir los antígenos M, N, S, Fya y Fyb, por lo tanto no sirve para observar anticuerpos con estas especificidades.

Bromelina 22 (Br/22)

Es el medio enzimático ideal para los anticuerpos fríos, pero también se pueden observar anticuerpos calientes,

El tiempo de incubación de 60 minutos en S/22 se acorta a solo 15 minutos.

Bromelina 37 (Br/37)

Es el medio ideal para los anticuerpos calientes.

El tiempo de incubación de 60 minutos en S/37 se acorta a solo 15 minutos.

Bromelina Coombs (Br/c)

Si a pesar de la acción enzimática que permite ser aglutinantes a anticuerpos que no lo son en medios salinos y aún no se observa aglutinación se cuenta con la ayuda del suero de Coombs.

TECNICAS DE ALTA CONCENTRACION PROTEICA

La alta concentración proteica se puede alcanzar con albúmina bovina, con suero AB humano o con polímeros de alto peso molecular. El medio proteico más usado es la albúmina bovina y se puede conseguir en diferentes concentraciones o en forma polimerizada.

Estos medios reducen el potencial zeta y facilitan la aglutinación a los anticuerpos que no son aglutinantes en medios salinos, por lo tanto son útiles para la observación de anticuerpos incompletos o sensibilizantes.

Albúmina rápida (Alb/r)

Es una buena técnica para observar los anticuerpos IgG. Se acorta el tiempo de incubación de 60 minutos a 37°C (salina a 37) a solo el tiempo necesario para centrifugar los tubos y leerlos. Como se trata de un medio más denso que el medio salino se aumenta el tiempo de centrifugación de 30 segundos para el medio salino a 90 segundos.

Los anticuerpos del sistema Rh-Hr funcionan muy bien es esta técnica

Albúmina 37 (Alb/37)

Para asegurar la aglutinación se dejan los tubos incubando a 37°C por una hora. Para esta técnica ya no se necesita la ayuda de suero de Coombs. Además está contraindicada la prueba hasta Coombs pues este medio proteico facilita la incorporación inespecífica al glucocalix del eritrocito de proteínas del suero y sobre todo de las inmunoglobulinas IgG que son las que tienen mayor carga positiva de todas. La incorporación es inespecífica pues se realiza únicamente por diferencia de cargas: positiva para la IgG y negativa para el glucocalix del eritrocito; y no por una reacción Ag-Ac .

CONSUMO DE LA ANTIGLOBULINA

Cuando una técnica se ha llevado hasta Coombs y el resultado es negativo se completa con la prueba del consumo de la antiglobulina para asegurarse que la antiglobulina quedó libre. Se realiza fácilmente agregando una gota de eritrocitos sensibilizados (previamente lavados y suspendidos al 3% en solución salina) a cada uno de los tubos negativos, se mezcla, se centrifuga y se lee. El resultado debe ser positivo lo que asegura una reacción negativa verdadera.

MATERIAL Y METODOS

MUESTRA.- 8 ml. de muestra de sangre venosa sin anticoagulante. Debe ser fresca (menos de 2 horas de extraída) para que contenga todavía complemento. Si se estuviera ante la posibilidad de la presencia de un anticuerpo fijador de complemento y éste se encuentra inactivado en la muestra entonces se corre el riesgo de dar un resultado falso negativo.

Se centrifuga la muestra para separar el suero que se fracciona en dos alícuotas, se identifican bien con los datos del paciente y con la fecha de la muestra. Una de las alícuotas se congela y se almacena a -20°C , la otra se procesa. Del fondo del tubo se toma una gota de eritrocitos que se lavan con solución salina para poder trabajar el autotestigo.

REACTIVOS Y MATERIAL

- 1.- Células del panel 4a ó 4b lavadas y suspendidas al 3% en solución salina.
- 2.- Suero de Coombs.
- 3.- Albúmina bovina al 22% ó al 30% ó polimerizada.

4.- Bromelina. Reconstituída y diluída de acuerdo a las indicaciones.

5.- Solución de LISS.

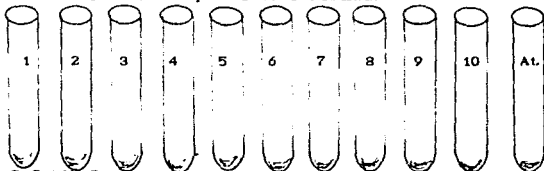
6.- Baño de agua a 22°C.

7.- Baño de agua a 37°C.

8.- Material y equipo de Laboratorio de banco de sangre.

PROCEDIMIENTO

Rotular tubos de 10 x 75 mm. del 1 al 10 en el caso del panel 4a ó del 1 al 5 en el caso del panel 4b, más un tubo con At (autotestigo) y de acuerdo a la técnica que se va a realizar



TECNICAS SALINAS

- Poner en cada tubo 2 gotas del suero problema.
- Agregar una gota de la suspensión al 3% de los eritrocitos en solución salina correspondientes, incluyendo el autotestigo.

S/r

- Mezclar agitando suavemente.
- Centrifugar 30 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación y/o hemólisis. Uno por uno cada tubo.
- Anotar los resultados conforme se va leyendo cada tubo.

S/22

- Mezclar todos los tubos agitando suavemente.
- Incubar todos los tubos a 22°C por 60 minutos.

- Centrifugar 30 segundos a 3 400 rpm.
- Volver a colocar en el baño a 22°C.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo.
- Anotar los resultados conforme se va leyendo cada tubo.

S/37

- Mezclar todos los tubos agitando suavemente.
- Incubar todos los tubos a 37°C por 60 minutos.
- Centrifugar 30 segundos a 3 400 rpm.
- Volver a colocar en el baño a 37°C.
- Leer aglutinación y/o hemólisis. Uno por uno cada tubo.
- Anotar el resultado conforme se va leyendo.
- Desechar los tubos positivos.

S/c

- Se continúa solamente con los que dio negativo en S/37
- Agregar solución salina casi hasta el borde del tubo (1 lavado)
- Centrifugar 2 minutos a 3 400 rpm.
- Decantar la solución salina.
- Resuspender el botón de eritrocitos.
- Agregar solución salina casi hasta el borde del tubo (2 lavados)
- Etc. (3 lavados)
- Decantar perfectamente la solución salina.
- Secar el labio de los tubos con papel absorbente ó con gasa.
- Agregar una gota de suero de Coombs y mezclar suavemente.
- Centrifugar 30 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo.
- Desechar los tubos positivos.

CAGH (consumo de la antiglobulina humana)

- Agregar a los negativos una gota de suspensión al 3% de eritrocitos sensibilizados y mezclar suavemente.
- Centrifugar 30 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo.

Liss/c

- Agregar una gota de suspensión al 3% de eritrocitos correspondientes a cada tubo, incluyendo el autotestigo.
- Centrifugar 2 minutos a 3 400 rpm.
- Decantar perfectamente la solución salina.
- Secar el labio de los tubos con papel absorbente ó con gasa.
- Agregar una gota de la solución de Liss.
- Resuspender el botón de eritrocitos.
- Agregar una gota de suero problema y mezclar agitando suavemente.
- Incubar todos los tubos a 37°C por 10 minutos.
- Lavar 3 veces con solución salina (ver S/c)
- Agregar una gota del suero de Coombs y mezclar agitando suavemente.
- Centrifugar 30 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo.

CAGH a los negativos (ver S/c)

TECNICAS CON BROMELINA

- Agregar a cada tubo dos gotas del suero problema.
- Agregar una gota de la suspensión al 3% de eritrocitos correspondientes a cada tubo, incluyendo el autotestigo.
- Agregar una gota de bromelina.

Esta es una técnica de un paso, porque la bromelina se agrega directamente. En la técnica de dos pasos primero se tratan los eritrocitos con la enzima y posteriormente se agrega el suero.

Br/22

- Mezclar todos los tubos agitando suavemente.
- Incubar a 22°C por 15 minutos.
- Centrifugar por 30 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo
- Anotar el resultado conforme se va leyendo.

Br/37

- Mezclar todos los tubos agitando suavemente.
- Incubar a 37°C por 15 minutos.
- Centrifugar por 30 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo.
- Anotar el resultado conforme se va leyendo.
- Desechar los tubos positivos.

Br/c

- Continuar con los tubos negativos de la Br/37
- Lavar 3 veces (ver S/c)
- Agregar una gota de suero de Coombs y agitar suavemente.
- Centrifugar 30 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo.
- Anotar el resultado conforme se va leyendo.

CAOH a todos los negativos (ver S/c)

TECNICAS CON ALBUMINA BOVINA

- Agregar a cada tubo dos gotas de suero problema.
- Agregar una gota de la suspensión al 3% de los eritrocitos correspondientes a cada tubo, incluyendo el autotestigo.
- Agregar 2 ó 3 gotas de la albúmina bovina (ver instructivo del fabricante)

Alb/r

- Mezclar todos los tubos agitando suavemente.
- Centrifugar 90 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo.
- Anotar el resultado conforme se va leyendo.

Alb/37

- Mezclar todos los tubos agitando suavemente.
- Incubar 60 minutos a 37°C.
- Centrifugar 90 segundos a 3 400 rpm.
- Leer aglutinación. Uno por uno cada tubo.
- Anotar el resultado conforme se va leyendo.

Una vez obtenido el resultado de las diferentes técnicas se procederá a comparar estos contra la carta del panel utilizado, para identificar la especificidad más probable del o de los anticuerpos. En los cuadros números 11, 12 y 13 se representan los resultados para algunos ejemplos de anticuerpos y lo que se puede deducir de los mismos es lo siguiente:

Cuadro número 11.- Anti-P

Anticuerpo natural irregular
Anticuerpo aglutinante
Anticuerpo frío
No fija complemento

Cuadro número 12.- Anti-Fya

Anticuerpo inmune
Anticuerpo incompleto (sensibilizante)
Anticuerpo caliente

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
BANCO CENTRAL DE SANGRE CENTRO MEDICO NACIONAL

GRUPO ABO. FACTOR Rho (D) Y ANTICUERPOS IRREGULARES

IDENTIFICACION DEL PACIENTE

Nombre _____
No. de afiliación _____
Hospital _____
No. cama _____

FECHA _____

Motivo del estudio _____

Clasificación de Grupos ABO y Rho (D)

Anti-A Anti-AB Anti-B Auto-T

--	--	--	--

A₁ A₂ B O

RESULTADO _____

Anti-D Auto-T

--	--

RESULTADO _____

Búsqueda de anticuerpos irregulares fuera de S: ABO

Técnica	Células del panel										auto-T
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
S/r	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
S/22	+++	++	+	-	---	---	-	+++	-	+++	-
S/37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Consumo AGH	+++	++	+	---	---	---	---	---	---	---	---
Alb/r	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
Alb/37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Br/22	+++	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---
Br/37	++	++	++	---	---	---	---	---	---	---	---
Br/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Consumo AGH	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Liss/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Consumo AGH	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Conclusiones: Anticuerpos irregulares fuera de S: ABO
reactivos de panel de compatibilidad anti D

Nombre y firma de quien efectuó las pruebas _____

Nombre y firma del supervisor _____

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
BANCO CENTRAL DE SANGRE CENTRO MEDICO NACIONAL

GRUPO ABO, FACTOR Rho (D) Y ANTICUERPOS IRREGULARES

IDENTIFICACION DEL PACIENTE

Nombre _____
No. de afiliacion _____
Hospital _____
No. cama _____

FECHA _____

Motivo del estudio _____

Clasificación de Grupos ABO y Rho (D)

Anti-A	Anti-AB	Anti-B	Auto-T	RESULTADO	Anti-D	Auto-T	RESULTADO
A ₁	A ₂	B	O				

Búsqueda de anticuerpos irregulares fuera de S: ABO

Técnica	Células del panel										auto-T
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
S/r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S/37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S/c	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Consumo AGH					+++				+++		+++
Alb/r	+	+		+	-	+	+	+	+++	+	-
Alb/37	++	+	+	+	-	++	++	+	-	+	-
Br/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Br/37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Br/c					-						
Consumo AGH	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Liss/c	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	-
Consumo AGH					++				+++		+++

Conclusiones Anticuerpos irregulares fuera de S: ABO

1. Titulo de anticuerpos irregulares fuera de S: ABO

Nombre y firma de quien efectuó las pruebas

Nombre y firma del supervisor

No fija complemento

Se destruye con la bromelina

Con fenómeno de dosis

Cuadro número 13.- Anti-E + anti-c

Anti-E Anticuerpo inmune

Anticuerpo aglutinante

Anticuerpo caliente

No fija complemento

Con fenómeno de dosis

Anti-c Anticuerpo inmune

Anticuerpo incompleto (sensibilizante)

Anticuerpo caliente

No fija complemento

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
BANCO CENTRAL DE SANGRE CENTRO MEDICO NACIONAL

GRUPO ABO, FACTOR Rho (D) Y ANTICUERPOS IRREGULARES

IDENTIFICACION DEL PACIENTE
Nombre _____
No. de afiliación _____
Hospital _____
No. cama _____

FECHA _____
Motivo del estudio _____

Clasificación de Grupos ABO y Rho (D)

Anti-A Anti-AB Anti-B Auto-T				RESULTADO	Anti-D Auto-T		RESULTADO
A1	A2	B	O				

Búsqueda de anticuerpos Irregulares fuera de S: ABO

Técnica	Células del panel										auto-T
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
S/r	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S/22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S/37	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S/c	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Consumo AGH	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Alb/r	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Alb/37	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Br/22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Br/37	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Br/c	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Consumo AGH	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Liss/c	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Consumo AGH	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Conclusiones: Anticuerpos irregulares detectados: anti-B + D
Anticuerpos de naturaleza irregular anti-B + D

Nombre y firma de quien efectuó las pruebas _____

Nombre y firma del supervisor _____

III.- MATERIAL Y METODOS DE LA PREPARACION DEL PANEL

El panel actual se prepara en anticoagulante CPDA-2 con inosina y antibióticos.

SOLUCION ANTICOAGULANTE

Glucosa	100.0	g
Citrato trisódico. 2 H ₂ O	36.8	g
Fosfato disódico anh.	28.4	g
Acido cítrico	1.6	g
Adenina	1.8	g
Inosina	3.5	g
Cloruro de sodio	0.3	g
Cloranfenicol	3.3	g
Sulfato de neomicina	1.0	g
Agua destilada cbp	500	ml

Este anticoagulante se esteriliza por filtración y en forma estéril se colocan 25 ml. a las bolsas de recolección de sangre. Se toman 500 ml. de sangre a cada donador del panel, se agitan por 4 horas a temperatura ambiente y después se conservan es refrigeración a 4 grados centígrados. El envasado se realiza en campana de flujo laminar colocando 5 ml de sangre en cada frasco gotero de 7 ml. de capacidad de color ámbar.

Para preparar los eritrocitos sensibilizados se toman 500 ml de sangre en anticoagulante ACD en bolsa cuádruple. Se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos, separar el plasma en cada una de las bolsas satélite, pero sin cortarlas, pues se van a usar

después. Se sensibilizan con IgG anti-D agregando a una de las bolsas satélite 100 ml. de anti-D (reactivo tipificador de Rho (D)) mezclando muy bien, después se pone el contenido de esta bolsa en la bolsa grande que contiene el paquete globular y se mezcla. Incubar a 37°C por una hora, mezclando cada 10 minutos. Probar el título y si es de 1/16 ó 1/32 se considera que ya están bien sensibilizadas, si el título es menor es necesario agregar más anti-D y volver a incubar otra hora.

Cuando ya están sensibilizados agregar 25 ml. del anticoagulante CPDA-2 en otra de las bolsas satélite, mezclar y vaciar posteriormente el contenido en la bolsa que contiene los eritrocitos sensibilizados. Desechar el plasma de la tercer bolsa satélite.

Antes de emplear el panel se coloca una gota de eritrocitos de cada uno de los frascos ámbar en un tubo de hemólisis de 13 x 100 mm. y se lava una vez con solución salina fisiológica estéril, los eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados se lavan 3 veces. Los eritrocitos lavados se resuspenden al 3% en salina.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE BAJA FUERZA IONICA (LISS)

La solución de baja fuerza iónica (Liss) (0.03 μ) es una solución que permite llevar a cabo la técnica de la antiglobulina humana indirecta (Coombs indirecto) en un tiempo más corto (10 minutos) que la técnica normal (60 minutos) que se realiza con solución salina fisiológica (0.15 μ)

SOLUCION DE BAJA FUERZA IONICA

Glicina	36.0336	g
Fosfato de potasio monobásico	0.4080	g
Fosfato de sodio dibásico	0.4256	g
Cloruro de sodio	3.574	g
Agua destilada cbp	2.0	l
El pH debe ser de	6.7	

Se esteriliza por filtración y se envasa en frascos claros de 10 ml. Antes de enviar el panel se le realiza un control de calidad interno que consiste en un estudio bacteriológico para garantizar su esterilidad y un estudio inmunohematológico que consiste en realizar la determinación del antígeno Rho (D) a un muestreo de cada uno de los frascos envasados para comprobar que la etiqueta del frasco corresponda con las células.

IV. - MATERIAL Y METODOS DE LA ESTABILIDAD DEL PANEL

Como ya se mencionó en la introducción, el panel tiene una vigencia de 42 días, para asegurarse de que los antígenos celulares se conservan intactos por este período de vigencia se realizó una prueba de estabilidad de los antígenos para lo cual se investigó el fenotipo completo de todas las células en diferentes períodos de tiempo. El primer día de recolección de la sangre y en los días 30, 45 y 90. Los antígenos se conservaron perfectamente hasta el día 90. Pero el grado de hemólisis de las células hace necesario el tener que efectuar más lavados a las células y se tendría que enviar el doble o tal vez el triple de la cantidad que se envía normalmente.

Por cuestión de facilidad para realizar los envíos se optó por dejar la vigencia en solo 42 días, de esta manera el panel se prepara y se envía cada 6 semanas (42 días).

Con la ayuda del grupo de Trabajo Social se cita a los donadores del panel cada 6 semanas en día viernes. El lunes de esta misma semana se preparan las bolsas de recolección de la sangre, con el anticoagulante especial para este fin. Como ya se mencionó este anticoagulante es el CPDA-2 agregado de inosina y antibióticos, por tal motivo esta sangre no puede usarse para transfusión de pacientes, para evitar confusión, estas bolsas las maneja solo el personal encargado de la producción del panel, y por supuesto se mantienen alejadas del personal que se encarga de la recolección de la sangre para transfusión. Además a cada bolsa se le pone con letras grandes la siguiente leyenda: " Peligro no transfundir".

En la siguiente semana se estructura la carta del panel y se realiza el envasado de los frascos en lunes y martes, el miércoles se hacen los paquetes de acuerdo a la necesidad de cada usuario, este mismo día por la tarde y el jueves el grupo de Trabajo Social se encarga de realizar los envíos foráneos. Los usuarios del panel que radican en el Distrito Federal y área metropolitana acuden al Banco Central de Sangre a recoger su panel.

V.- MATERIAL Y METODOS DE LA SELECCION DE LOS DONADORES DEL PANEL.

Anteriormente las personas que conformaban el grupo especial de donación para el panel eran donadores remunerados, desde luego ellos estaban enterados de que pertenecían a un grupo especial y que su sangre no se usaba para transfusión sino que se empleaba en la

preparación de reactivos. A partir de la Ley de Salud publicada en el Diario Oficial en junio de 1986, ya no se realiza este tipo de donación por lo cual ahora nuestro grupo está integrado por donadores altruistas. Para satisfacer los requerimientos transfusionales de algunos de nuestros pacientes que ya están inmunizados y tienen en su suero desafortunadamente la presencia de uno ó más anticuerpos, se presenta la necesidad de buscar sangre sin el o los antígenos contra los cuales están dirigidos los anticuerpos, por lo que se tiene que investigar el fenotipo antigénico de las sangres cruzadas de estos donadores, entonces el laboratorio informa a Trabajo Social de los sujetos seleccionados y este equipo se encarga de reclutarlos en un programa de donación altruista y son citados en las fechas de preparación del panel. Desde luego los candidatos de este grupo de panel tienen que pasar todas la condiciones de la Ley de Donación de Sangre.

VI.- MATERIAL Y METODOS DEL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO.

Para realizar el control de calidad externo se necesita por supuesto las células del panel, y junto con estas células se envían dos sueros control, uno de los cuales contiene un anticuerpo o mezcla de anticuerpos bien caracterizados en su especificidad y medios de reacción. El otro suero no lleva anticuerpos, como son testigos ciegos se les llama suero 1 y suero 2 pero el anticuerpo lo llevan indistintamente.

También se envía la hoja de reporte en la cual anotarán sus resultados obtenidos y tienen que regresar al Banco Central de Sangre para su evaluación.(cuadro número 2) Es importante que se llenen

todos los datos de identificación de la unidad que reporta, para poder enviar con el panel siguiente el resultado de su evaluación. (Cuadro número 14)

Este método de evaluación permite estar en comunicación continua con el personal que recibe y usa el panel para su control interno.

VII.- RESULTADOS

Anteriormente los reportes enviados de los diferentes centros de trabajo se revisaban anualmente, un estudio que evaluó el periodo comprendido entre 1977 a 1981, arrojó los siguientes resultados:

(Tabla número 1)

De un total de 2990 envíos solo se logró 371 respuestas lo que representa el 12.4 % y de los cuales solo el 64.7 % eran correctas.

Los anticuerpos enviados se dividieron en:

Anticuerpos calientes. - La temperatura óptima de actividad es a 37°C

Anticuerpos fríos . - La temperatura óptima de actividad es a 22°C

Como se puede observar en la tabla 1 se obtiene mayor certeza de identificación en los anticuerpos calientes (86.5%) que en los anticuerpos fríos (63.0%)

A partir de 1987 la evaluación se realiza cada vez que se prepara el nuevo panel. En la tabla número 2 se puede observar que se ha logrado un aumento en el número de respuestas: de 12.4 % (tabla número 1) a 36.8 % para el año 1987 y a 42.7 % para el año 1990 (Tabla número 2)

En la tabla número 3 se hace una lista de los anticuerpos calientes enviados y se puede observar que los que tienen mayor certeza de identificación son el anti-D (94.7 %) y el anti-c (94.4 %). Estos

RESULTADOS DEL PERIODO DE 1977 A 1981

No. envíos	No. respuestas	%	% respuestas correctas
2990	371	12.4	64.7
ANTICUERPOS CALIENTES			
		Anti-D	83.0
		Anti-K	90.0
			<hr/> 86.5
ANTICUERPOS FRIOS			
		Anti-P	59.3
		Anti-Lea	66.7
			<hr/> 63.0

TABLA NUMERO 1

RESULTADOS DEL PERIODO DE 1987 A 1990

Año	No. envíos	No. respuestas	%
1987	657	242	36.8
1988	693	273	39.4
1989	662	269	42.1
1990	828	354	42.7
TOTAL	2840	1138	40.0

TABLA NUMERO 2

IDENTIFICACION DEL ANTICUERPO ENVIADO. (CALIENTES) 1987-1990

Anticuerpo	No. envíos	No. respuestas	Respuestas correctas	%
Anti-D	521	132	125	94.7
Anti-C	300	116	93	80.2
Anti-E	297	94	81	86.2
Anti-c	146	54	51	94.4
Anti-Fya	149	41	27	65.8
Anti-K	69	37	33	89.2
TOTAL	<u>1482</u>	<u>474</u>	<u>410</u>	<u>86.5</u>

TABLA NUMERO 3

son los anticuerpos que se presentan con mayor frecuencia en nuestros paciente ya sea que se sensibilizaran por transfusión o por embarazos. Afortunadamente son los que tienen menor problema de identificación, pero desde luego seria mejor que la identificación fuera del 100 %

En esta misma tabla 3 se puede ver que el anti-Fya es el que presentó más problemas de identificación, solo se obtuvo 65.8 % de respuestas correctas.

En la tabla número 4 se presentan los resultados para los anticuerpos fríos enviados. Como se puede observar se identifican con más dificultad; solo 57.6 % de respuestas correctas, comparado contra 86.5 % de respuestas correctas para los anticuerpos calientes de la tabla número 3

El anticuerpo frío que se identifica mejor es el anti-Lea (75.0 %). Le siguen el anti-P (68.4 %), el anti-N y al final el anti-H con solo 17.5 % . No es de sorprender pues desafortunadamente no enviamos células de cordón para poderlo diferenciar de un anti-I. Se recomienda que cada laboratorio que necesite diferenciar estos anticuerpos consiga células de cordón umbilical en sus hospitales.

Tal vez seria de mayor preocupación que se lograra más identificación de los anticuerpos fríos que de los calientes. Ya que los anticuerpos fríos que no fijan complemento interfieren con las pruebas cruzadas de compatibilidad "in vitro", pero no tienen repercusión clínica en el paciente. Pero los anticuerpos calientes o aquellos fríos que fijan complemento si dan problemas de reacción post-transfusional.

En el panel número IV-1990 se enviaron los dos sueros negativos y se obtuvo un resultado sorprendente pues solo se logró un 79.1% de

IDENTIFICACION DEL ANTICUERPO ENVIADO. (FRIOS) 1987-1990

Anticuerpo	No. envíos	No. respuestas	Respuestas correctas	%
Anti-P	219	98	67	68.4
Anti-Lea	154	32	24	75.0
Anti-N	77	21	12	57.1
Anti-H	67	40	7	17.5
TOTAL	<u>517</u>	<u>191</u>	<u>110</u>	<u>57.6</u>

TABLA NUMERO 4

IDENTIFICACION DEL ANTICUERPO ENVIADO. (FRIOS) 1987-1990

Anticuerpo	No. envíos	No. respuestas	Respuestas correctas	%
Anti-P	219	98	67	68.4
Anti-Lea	154	32	24	75.0
Anti-N	77	21	12	57.1
Anti-H	67	40	7	17.5
TOTAL	<u>517</u>	<u>191</u>	<u>110</u>	<u>57.6</u>

TABLA NUMERO 4

IDENTIFICACION DEL ANTICUERPO ENVIADO (MEZCLAS) 1987-1990

Anticuerpos	No. envios	No. respuestas	Respuestas correctas	%	
Anti-E+c	140	81	anti-E+c c	17 58	21.0
Anti-E+Jka	78	37	anti-E+Jka E	3 34	8.1
Anti-H+Jka	67	42	anti-H+Jka H Jka	5 5 24	11.9
Anti-I+Lea	67	44	anti-I+Lea I Lea	3 3 34	6.8
Anti-H+E	67	47	anti-H+E H E	8 1 19	17.0
Anti-cE+Jka	69	31	anti-cE+Jka cE E+Jka c E Jka	2 5 4 5 12 1	6.5
TOTAL	<u>488</u>	<u>282</u>		<u>38</u>	<u>13.5</u>

TABLA NUMERO 6

respuestas correctas. (tabla numero 5)

También en este año de 1990 se decidió mandar mezclas de anticuerpos para hacer un poco más difícil, pero también un poco más real para ciertos pacientes, el rastreo de anticuerpos. Los resultados que se muestran en la tabla número 6 son muy sorprendentes. Es muy difícil identificar las mezclas de anticuerpos. Como se observa en la tabla solo se obtuvo en promedio el 13.5 % de certeza en la identificación. Algunos laboratorios lograron identificar solo uno de los dos anticuerpos.

Como se puede observar las mezclas de anticuerpos comprenden las siguientes combinaciones:

1. - Dos anticuerpos calientes.

Anti-E + anti-c	(21.0 %)
Anti-E + anti-Jka	(8.1 %)
Anti-cE + anti-Jka	(6.5 %)

2. - Un anticuerpo frío y un anticuerpo caliente.

Anti-H + anti-Jka	(11.9 %)
Anti-H + anti-E	(17.0 %)

3. - Dos anticuerpos fríos.

Anti-I + anti-Lea	(6.8 %)
-------------------	---------

Pero en todas la mezclas hay dificultad para identificar los dos anticuerpos.

Para terminar, en la tabla número 7 se presentan los anticuerpos comunes a los dos períodos de tiempo analizados. En general se puede observar que el anti-K se sigue identificando con la misma certeza 89.2 % contra 90.0 %. Pero el anti-D: 94.7 % contra 83.0 %, el anti-P: 68.3 % contra 59.3 % y el anti-Lea: 75.0 % contra 59.3 % mostraron mayor certeza de identificación.

ANTICUERPOS COMUNES A LOS DOS PERIODOS

Anticuerpo	% Respuestas correctas	% Respuestas correctas
Anti-K	90.0	89.2
Anti-D	83.0	94.7
Anti-P	59.3	68.3
Anti-Lea	66.7	75.0

TABLA NUMERO 7

VIII.- DISCUSION

Se ha logrado hasta el momento una red de envíos del panel a 100 laboratorios del Instituto Mexicano del Seguro Social y a otras instituciones del sector salud , ubicados en diferentes regiones de nuestro país. Por ejemplo se envía panel a Mexicali, Mérida, Veracruz, Guadalajara, Oaxaca, Chiapas, Chihuahua, etc.

Esta gran red de envíos se logró gracias al perfeccionamiento de las técnicas para conservar los eritrocitos viables para que puedan mantener sus determinantes antigenicos intactos y puedan reaccionar sus anticuerpos con ellos. Debe recordarse recordarse que en la introducción se mencionó que el panel original se hacia para consumo del propio Banco Central y que después se fué ampliando la red de usuarios hasta completar la lista de 100 con los que se cuenta actualmente, y que todavía va a crecer más.

Cuando se evaluaron los resultados del panel anualmente se obtuvo solamente el 12.4 % de respuestas (tabla número 1). Cuando el reporte se hace cada vez que se prepara el panel se eleva el numero de respuestas a 42.7 % (tabla número 2). Aunque no se señalo como objetivo de este informe, en realidad se tenia como un objetivo implícito, el que la evaluación de cada panel motivaria el interes por trabajar mejor y con más integración al control de calidad. Creo que se propicio mas intercomunicación y mayor interés por tener mejores resultados.

Es conveniente mencionar que hay laboratorios que no esperan el resultado de su evaluación o aún mejor no esperan siquiera enviar su reporte, cuando observan resultados sorprendentes - como en las mezclas de anticuerpos o cuando se enviaron los dos sueros negativos

- llaman por telefono para saber si están trabajando correctamente. Por supuesto que este interés es gratificante y motiva a continuar con este sistema de intercomunicación constante con el personal interesado en este control de calidad externo. Creo que es el único país del mundo donde se realiza este control de calidad. Por lo tanto el agradecimiento al personal del Banco Central de Sangre que inició este sistema debe estar siempre presente, en especial al Dr. Héctor Rodríguez Moyado y a la Q.F.B. Elisa Quintanar García.

IX. - CONCLUSIONES

Definitivamente no se puede descansar hasta lograr el 100 % de respuestas. Debe lograrse la integración de todos los químicos a los programas de control de calidad interno en cada laboratorio y externo con un coordinador, como en el caso específico del PANEL DE ERITROCITOS DE FENOTIPO CONOCIDO.

Desde luego ya no se puede permitir que en ningún laboratorio se realice únicamente la prueba directa del sistema ABO o que se usen antisueros sin el debido control.

Cuando se logre el 100 % de respuestas correctas por lo menos en la identificación de los anticuerpos calientes se logrará que las pruebas de compatibilidad pretransfusionales aseguren la compatibilidad absoluta de la sangre.

Estas metas se lograrán insistiendo en el adiestramiento continuo de todo el personal involucrado en la transfusión sanguínea. Este adiestramiento continuo empieza en el Banco Central de Sangre a través de los diferentes cursos que se imparten durante todo el año, adiestramiento que tiene que continuarse en cada laboratorio.

Espero que este informe de la práctica de mi profesión sirva como manual para resolver dudas inmediatas con respuestas inmediatas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

X. - BIBLIOGRAFIA

- 1.- Addine, G. Erskine, Wladyslaw, W. Socha. The Principles and Practice of Blood Grouping. 2da. ed. The C.V. Mosby Company. 1978
- 2.- Allen N.K. Manual Hyland de Inmunohematología. Hyland Laboratories. 1963 U.S.A.
- 3.- Boorman K.E., Dodd, B.E., Lincoln, P.J. Blood Group Serology. 5a.ed. Churchill-Livingstone. 5a ed. 1977 Great Britain.
- 4.- Bryant N.J. An Introduction to Immunohematology. 2da ed. W.B. Saunders Company. 1982 U.S.A.
- 5.- Grunbaum, B.W. Quintanar, G.E. Distribution of gene frequencies and Discrimination Probabilities for 22 Human Blood Genetic Systems in Four Racial Groups. J. of Forensic Sci. 25 (2) 1980
- 6.- Hughes-Jones, N.C. Nature of the Reaction Between Antigen and Antibody. Brt. Med. Bull. 19 (171) 1963
- 7.- Lehninger, A.L. Bionergetica. 2da. ed. Fondo Educativo Interamericano. 1975 Mexico
- 8.- Mollison, P.L. Transfusion de Sangre en Medicina Clinica. Trad. de la 7a. ed. Ed. Peverte. 1987 España.
- 9.- Petz, L.D., Garraty G. Acquired Immune Hemolytic Anemias. Churchill Livingstone. 1980 U.S.A.
- 10.- Pace, R.R. and Sanger, Ruth. Los Grupos Sanguíneos Humanos. 2da ed. La Prensa Medica Mexicana. 1975. México.

11. - Widmann, F. K. American Association of Blood Banks. Technical Manual. 9a. ed. U.S.A.

12. - Zmijewski, Ch. M. Immunochemistry. 3a ed. Appleton-Century-Crofts. 1978. U.S.A.