



Universidad Nacional Autónoma  
de México

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE UN METODO RAPIDO PARA PRUEBAS  
CRUZADAS DE URGENCIA Y ESTUDIO DE ALOANTICUERPOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

*Dora María Hernández Delgado*

MEXICO, D. F.

1979



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

TESIS 1979  
M. Z. 167  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROC. \_\_\_\_\_  
S. \_\_\_\_\_



"EVALUACION DE UN METODO RAPIDO PARA PRUEBAS - -  
CRUZADAS DE URGENCIA Y ESTUDIO DE ALOANTICUERPOS".

Jurado asignado --  
originalmente según  
el tema.

PRESIDENTE: DEA CORONADO PERDOMO.

VOCAL: ESTHER GUTIERREZ HGO.

SECRETARIO: GUADALUPE LETICIA --  
CARRASCO R.

1er. SUPLEN

TE. SALVADOR MARTIN SOSA.

2do. SUPLEN

TE. GENOVEVA ABDALA MATUK.

Sitio donde se des-  
arrolló el tema:

BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CEN-  
TRO MEDICO "LA RAZA".

Nombre completo y --  
firma del sustentan  
te.

DORA MARIA HERNANDEZ DELGADO.

---

Nombre completo y --  
firma del asesor --  
del tema:

DEA CORONADO PERDOMO.

---

Nombre completo y --  
firma del supervi--  
sor técnico.

DR. MARCO ANTONIO SANTILLAN BECE-  
RRA.

---

A LAS AUTORIDADES Y PERSONAL DEL --  
LABORATORIO DEL BANCO DE SANGRE DEL  
C.M.R. ESPECIALMENTE AL DR. MARCO -  
ANTONIO SANTILLA BECERRA Y Q.F.B.-  
MARGARITA DESILVA.

A MIS COMPAÑEROS Y MAESTROS -  
ESPECIALMENTE A Q.F.B. DEA -  
CORONADO PERDOMO.

A JUAN E ISABEL MIS MEJORES AMIGOS.

A TODA MI FAMILIA.

A TI QUE SIEMPRE ESTAS EN DISPOSICION DE  
AYUDARME.

# I N D I C E

|  | PAGS. |
|--|-------|
| I. INTRODUCCION.   | 1     |
| II. GENERALIDADES.   | 4     |
| 1.- Importancia del estudio de aloanti <u>cu</u> erpos.  | 5     |
| 2.- Importancia de las pruebas de compa <u>ti</u> bilidad.   | 10    |
| 3.- Antecedentes bibliográficos del mé <u>to</u> do LISS (Low Ionic Strength Solu <u>ti</u> on).                       | 12    |
| III. METODOS.  | 18    |
| Material:  | 19    |
| 1.- Grupo "A". Donadores de sangre que <u>as</u> isten al Banco Central de Sangre <u>de</u> l Centro Médico "La Raza". | 19    |
| 2.- Grupo "B". Pacientes del Servicio <u>de</u> Hematología del Hospital General del C.M.R.                            | 19    |
| Métodos:   |       |
| 1.- Estudio de aloanticuerpos en el gru <u>po</u> "A" por el método convencional.                                      | 21    |
| 2.- Estudio de aloanticuerpos en el gru <u>po</u> "A" por el método LISS.  | 29    |
| 3.- Estudio de las pruebas de compati <u>bi</u> lidad en el grupo "B" por el método convencional.                      | 34    |
| 4.- Estudio de las pruebas de compati <u>bi</u>  |       |

|       |  | Págs. |
|-------|--|-------|
|       | lidad en el grupo "B" por el método<br>LISS. | 40    |
| IV.   | RESULTADOS.                                  | 43    |
| V.    | DISCUSION                                    | 48    |
| VI.   | CONCLUSIONES                                 | 52    |
| VII.  | RESUMEN.                                     | 55    |
| VIII. | BIBLIOGRAFIA                                 | 60    |

I N T R O D U C C I O N .

La transfusión sanguínea es una terapéutica que consiste en la substitución de sangre total, o de sus productos, y que se efectúa cuando debido a un padecimiento hay deficiencia o disminución de ellos.

Si se tiene en cuenta que existen reglas de seguridad en la transfusión sanguínea, y que dichas reglas son de naturaleza inmunológica, resulta obvio que al prescribir un producto sanguíneo debe seguirse minuciosamente tales normas, ya que de ellos depende la eficacia de la seguridad transfusional, con objeto de evitar las consecuencias fisiopatológicas o complicaciones debidas a reacciones transfusionales, como son: hemolítica, febril, alérgica, que agraven la enfermedad.

Dicho en otras palabras, se hace imprescindible efectuar una selección inmunológica donador-receptor lo más completa que sea posible; esto implica el conocimiento de los antígenos de grupo sanguíneo presentes en la superficie de la membrana del eritrocito, mismos que son adquiridos en forma hereditaria, con carácter mendeliano y definen serológicamente al donador.

Las características particulares de dichos antígenos: su composición bioquímica, la ubicación espacial y potencia antigénica, constituyen la capacidad de provocar la formación de anticuerpos -generalmente de tipo inmune- en el receptor. De aquí la importancia del estudio de los aloanticuerpos.

El diseño de unas pruebas de compatibilidad debe contemplar las variadas manifestaciones de la reacción antígeno-anticuerpo, pero además debe tener la ventaja de ser sencillo y fácil de reproducir: cualquier circunstancia para un procedimiento adicional que tienda a complicarlo se traduce en desventaja para cualquier ob-

jetivo señalado.

El empleo del método convencional, tanto para el estudio de los anticuerpos como para las pruebas de compatibilidad, han dado ahora muy buenos resultados. Sinem embargo esto no impide que deban buscarse nuevos métodos que permitan, por un lado, incrementar la sensibilidad de las reacciones antígeno-anticuerpo y por otro, disminuir el costo de los análisis y el tiempo requerido por el personal especializado.

Frecuentemente los pacientes requieren sangre antes de que se complete el procedimiento; en estos casos, la decisión médica de la urgencia se hace en base a valorar el riesgo de un efecto indeseable contra un problema clínico severo de choque. El abreviar las pruebas cruzadas puede someter a riesgos al paciente; sin em embargo, el utilizar en estos casos, como en otros, una prueba rápida que reúna los requisitos de ser: sencillo, de acortar el tiempo de incubación, de aumentar la afinidad de ciertos anticuerpos, abate en forma importante la problemática de estos casos. Por esto se decidió evaluar la metodología LISS (Low Ionic Strength Solution, solución de baja fuerza iónica) a fin de establecer su uso en forma "rutinaria" en las pruebas de compatibilidad a glóbulos rojos en los programas de plaquetas en pacientes del servicio de Hematología del Hospital General y en el estudio de aloanticuerpos en donadores que asisten al Banco Central de Sangre del Centro Médico "La Raza".

GENERALIDADES .

## IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE ALOANTICUERPOS.

Imunohematología de los eritrocitos(1). Los antígenos de los eritrocitos son estructuras químicas que proporcionan propiedades específicas a su superficie y que hasta ahora sólo pueden detectarse por la reactividad de los eritrocitos con anticuerpos que corresponden a estos antígenos, esto es, anticuerpos homólogos. La mayoría de estas reacciones antígeno anticuerpo implican la aglutinación de los eritrocitos; ésta es la razón de que a los anticuerpos se les suele denominar hemoaglutininas y a los antígenos, hemoaglutinógenos.

Son isoaglutinógenos e isoaglutininas, respectivamente, los antígenos y anticuerpos que diferencian los eritrocitos de unos individuos de aquellos de otros de la misma especie. Las heteroaglutininas son anticuerpos que reaccionan con antígenos de glóbulos rojos de una especie distinta.

Los anticuerpos suelen diferenciarse según su carácter natural o inmune (2). Los primeros se refieren a las aglutininas que se presentan sin causa conocida, las isoaglutininas inmunes resultan de una inmunización deliberada o no, tal como puede producirse por la inyección o transfusión de sangre o bien por multiparidad. Además de aglutinar a los eritrocitos, algunos hemoanticuerpos pueden hemolizarlos; tal es el caso de los anticuerpos hemolíticos anti A y anti B. Generalmente éstos son el resultado de una inmunización natural irregular. La actividad hemolítica se demuestra sólo en presencia del complemento, es decir, del componente termolábil del suero.

Habitualmente los anticuerpos de carácter regular natural son más aglutinantes que hemolizantes; por el contrario, los anticuerpos inmunes en los cuales no se visualiza fácilmente la aglutinación por su naturaleza incompleta requieren del empleo de técnicas artificiales que facilitan y favorecen su detección e identificación, tales como: enzimas, medios macromoleculares, suero de antiglobulina y medios de baja fuerza iónica.

Un anticuerpo se define por su especificidad y se caracteriza por su título y avidéz. Los términos de afinidad en porcentaje de aglutinación son un poder de combinación en la reacción antígeno-anticuerpo.

La fijación de dicho anticuerpo hacia su antígeno correspondiente presenta varias características. En primer lugar, es específica; en segundo, irreversible, ya que se considera una reacción de equilibrio que requiere de ciertas condiciones favorables (pH, fuerza iónica, temperatura, tiempo de incubación y centrifugación).

El aprovechamiento de estas características en el laboratorio presenta, en forma simple, un modo de visualizar la reacción antígeno-anticuerpo, lo que permite una detección e identificación adecuada de los anticuerpos antieritrocitos valiéndose de medios rigurosamente controlados.

Una de las técnicas que cumple con los principales objetivos de la terapia transfusional, es el estudio de anticuerpos antieritrocitos empleando un patrón eritrocitario reactivo que consiste en glóbulos rojos representativos fenotípicamente de los antígenos más frecuentes (cuadro 1) según la naturaleza del grupo étnico que represente.

CUADRO 1. ANTIGENOS ERITROCITARIOS CONOCIDOS A LA FE  
CHA.

Race, R.R., 1968. Todd-Sanford, 1974.

| ANTIGENOS.  | SISTEMAS | AÑO  | AUTORES.                            |
|---|----------|------|-------------------------------------|
| A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> A <sub>x</sub> B H<br>Mn Ss U M <sup>g</sup> M <sub>1</sub> T <sub>m</sub> M <sup>k</sup> Hu | ABH      | 1900 | Landstei-<br>ner.                   |
| He Mi <sup>a</sup> U <sub>x</sub> (Gr) Mur Hil  | MNSs     | 1927 | Landstei-<br>ner y Le-<br>vine.     |
| P P <sup>k</sup> Luke   | P        | 1927 | Landstei-<br>ner y Le-<br>vine.     |
| D C c E e D <sup>u</sup> D <sup>w</sup> C <sup>w</sup> E <sup>w</sup> E <sup>t</sup>  | Rh       | 1837 | Landstei-<br>ner y Le-<br>vine.     |
| Lu <sup>a</sup> Lu <sup>b</sup>   | Lutheran | 1946 | Callender<br>y Race.                |
| Kk Kp <sup>a</sup> Kp <sup>b</sup> Js <sup>a</sup> Js <sup>b</sup>  | Kell     | 1946 | Coombs, -<br>Mourant y<br>Race.     |
| Le <sup>a</sup> Le <sup>b</sup>   | Lewis    | 1946 | Mourant.                            |
| Fy <sup>a</sup> Fy <sup>b</sup>   | Duffy    | 1950 | Cutbush, -<br>Mollison<br>y Parker. |

| ANTIGENOS   | SISTEMAS              | AÑOS. AUTORES                                     |
|---|-----------------------|---|
| Jk <sup>a</sup> Jk <sup>b</sup>                               | Kidd                  | 1951 Allen, -<br>Diamond y<br>Niedziela.          |
| Di <sup>a</sup> Di <sup>b</sup>                               | Diego                 | 1954 Levine, -<br>Koch, Mc-<br>Gee e - -<br>Hill. |
| Yt <sup>a</sup> Yt <sup>b</sup>                               | Yt                    | 1956 Eaton y -<br>colabs.                         |
| Ii  | I                     | 1956 Wiener.                                      |
| Xg <sup>a</sup>   | Xg                    | Mann y <u>co</u><br>labs.                         |
| Do <sup>a</sup>   | Dombrook.             |   |
| Vel Ge Lau Co <sup>a</sup> Cy <sup>a</sup> At <sup>a</sup>    | Antígenos frecuentes. |   |
| Levoy Wr <sup>a</sup> Be <sup>a</sup> By Sw <sup>a</sup> Good |                       |   |
| Bi Tr <sup>a</sup> Wb Bp <sup>a</sup> Rd Ls <sup>a</sup>      | Antígenos raros.      |   |

Este grupo de hematies que favorece la identificación de los anticuerpos en un receptor potencial, ayuda en forma extraordinaria en la terapia transfusional, lo mismo si el estudio resulta positivo o negativo. De aquí que todo banco de sangre moderno deba contemplar tal actividad dentro de sus funciones.

Evidentemente, la presencia de anticuerpos se refleja desde:

1.- La tipificación del grupo sanguíneo en donde no se aprecia correlación entre la prueba directa y la inversa.

2.- Una prueba cruzada incompatible.

3.- In vivo, la aparición de un efecto indeseable, transfusional, de tipo inmediato.

4.- La presencia de ictericia neonatal.

## IMPORTANCIA DE LAS PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD.

Pruebas de compatibilidad (4). El descubrimiento que Landsteiner hizo en 1900 de los grupos sanguíneos - ABH permitió realizar una serie de estudios que han hecho de la transfusión sanguínea un procedimiento menos peligroso. Asimismo, en 1945 el uso de las técnicas de Coombs en las pruebas de compatibilidad redujo aún más la posible incompatibilidad en la transfusión sanguínea.

El propósito de las pruebas de compatibilidad es el de asegurar que el paciente se beneficie con la transfusión de sangre total o de sus productos y evitar efectos indeseables, tanto inmediatos como tardíos, de índole inmunológica. Lo anterior hace de estas pruebas el procedimiento más importante de cuantos deben practicarse en un banco de sangre.

Las pruebas de compatibilidad se definen como la acción in vitro de lo que va a suceder in vivo, tomando en cuenta el factor dilución. Por ende, universalmente se sabe que las pruebas de compatibilidad están constituidas por lo que se conoce como: a) prueba mayor y b) prueba menor. La primera es la más importante y decisiva para la seguridad del receptor, debe efectuarse de tal manera que se descubran tanto los anticuerpos completos como los incompletos. Las multiparas, particularmente las madres de niños con enfermedad hemolítica y los pacientes con antecedentes de transfusiones, tienen más probabilidades de poseer anticuerpos irregulares o atípicos, por lo que se les debe prestar mayor atención.

La prueba menor detecta los anticuerpos circulantes en el donador que pueden, en un momento dado, dañar

los eritrocitos del receptor.

Recientemente se ha incrementado el interés por la investigación rutinaria de las sangres del donador y del receptor antes de efectuar las pruebas propiamente dichas. Kuhns y colaboradores (11) opinan que el estudio rutinario de los donadores es por lo menos tan satisfactorio como la prueba menor; Allen y colaboradores (12) opinan que si bien la investigación rutinaria de la sangre del donador y de la del receptor es un adelanto indudable en la técnica de la transfusión, no debe reemplazar a la prueba menor, ya que esta última evidencia principalmente los errores de la tipificación ABH.

El criterio básico para la selección del donador es que sea compatible, teóricamente, desde los sistemas ABH y Rh, cuya ratificación es siempre obligada antes de llevar a cabo el procedimiento; lo mismo debe confirmarse en el receptor.

Esto significa que el procedimiento a seguir implica los mismos pasos técnicos que se utilizan para el estudio de anticuerpos y que tiene las mismas limitaciones, puesto que en determinadas circunstancias es difícil evidenciar el anticuerpo a identificar porque éste se encuentra a bajo título. Asimismo, es conveniente subrayar que difícilmente las pruebas de compatibilidad evitan los errores que conlleva todo el procedimiento en general, tales como el manejo administrativo del producto mismo, previo a la transfusión y a las técnicas aplicadas.

## ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS DEL METODO LISS.

Löw y Messeter (5) describieron una modificación de la prueba de antiglobulina para uso rutinario, que consiste en la substitución de la solución salina como medio de suspensión de glóbulos rojos, por una solución de sales de baja fuerza iónica. Esto permite una considerable disminución en el tiempo de incubación que es de importancia práctica en el trabajo clínico. La sensibilidad de la reacción no parece disminuir por este procedimiento, y aún en algunos casos se puede observar un aumento en la fuerza de la reacción.

Varios factores influyen en la reacción antígeno anticuerpo, por ejemplo: el pH, la temperatura y la fuerza iónica del medio de suspensión de los glóbulos rojos. Atchley (1964), Elliot (1964), y Hughes han estudiado estos factores y subrayado particularmente el fuerte efecto de una fuerza iónica reducida. El resultado es la pronunciada disminución en el tiempo de reacción; su principal aplicación es para anticuerpos IgG en la fase de incubación para la reacción de antiglobulina.

Hay sin embargo una tendencia a reacciones positivas no específicas que ocurren con medios de baja fuerza iónica, para lo cual Löw y Messeter prepararon varias soluciones salinas de diferente fuerza iónica, y encontraron que cuando los glóbulos rojos se suspenden en solución de glicinato de sodio que contenga cloruro de sodio 0.03 M amortiguado con fosfatos a pH 6.7, las reacciones inespecíficas son insignificantes.

La preparación de la solución de baja fuerza iónica (LISS) se describirá en el capítulo correspondien-

te a la parte experimental.

Löw y Messeter emplearon una suspensión de glóbulos rojos al 5% lavados previamente, una vez con solución salina isotónica y suspendidos en LISS. Probaron varios sueros con anticuerpos conocidos:

a) En pruebas de aglutinación: anti A, B, P<sub>1</sub>, H, M, N, Le<sup>a</sup>.

b) En pruebas indirectas de antiglobulina, usando varios sueros de amplio espectro y sueros puros anti IgG; anti D, E, C, C<sup>w</sup>, c, Kell, Fy<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, S, Jk<sup>a</sup>.

La prueba indirecta de antiglobulina se realizó de la siguiente manera:

En un tubo se colocaron 2 gotas de suero más 2 - gotas de glóbulos rojos suspendidos al 5% en LISS se incubaron a 37°C durante 5 min, se lavaron cuatro veces con solución salina, se agregó una gota de suero anti-globulina humana, se mezcló y se centrifugó por 10 seg; se observó la aglutinación.

Este método lo compararon con el convencional de antiglobulina, con dos excepciones; los glóbulos rojos fueron suspendidos en solución salina e incubados durante una hora.

Para la identificación de anticuerpos se compararon también con métodos enzimáticos y automatizados.

Los resultados obtenidos por estos investigadores fueron los siguientes: en 14 diferentes sueros con anti D el título fue similar por ambos métodos y en - -

ocasiones el título fue superior por el método de LISS. En el estudio de otros anticuerpos irregulares se observó en su totalidad un título mayor en las células suspendidas en LISS que en las suspendidas en salina, excepción hecha de un anti Le<sup>a</sup> que dio una dilución por debajo del título obtenido mediante el método salino. De igual forma, aumentó el número de anticuerpos identificados, debido probablemente a que el incremento en la sensibilidad de la reacción hizo más definidas las reacciones débilmente positivas o dudosas.

Löw y Messeter reportaron que se cruzaron - - 100,000 unidades de sangre por el método de LISS, sin - que se presentara reacción transfusional originada por anticuerpos de grupo sanguíneo.

Los citados estudios dieron como conclusión que además de ser un método en el que se reduce el tiempo de incubación, el de LISS es tan realizable como el convencional de la prueba de antiglobulina en salina.

Moore y Mollison (6) usaron el medio de baja - - fuerza iónica, descrito por Löw y Messeter, en pruebas manuales para la detección de anticuerpos.

Sus observaciones confirman la importancia de - suspender los glóbulos rojos en un medio de baja fuerza iónica, durante la primera etapa de la prueba indirecta de antiglobulina, esto es, en el período de incubación con el suero que contiene el o los anticuerpos.

Estos autores emplearon una suspensión al 3% en lugar del 5% recomendado por Löw y Messeter, el procedimiento del método fue el mismo descrito por estos autores.

Moore y Mollison compararon el empleo de albúmina y en todos los casos el grado de aumento en la reacción resultó más grande en las células suspendidas en LISS que en las células suspendidas en solución salina y adicionadas con albúmina.

De esta serie de estudios dedujeron que el empleo de esta solución de baja fuerza iónica permite reducir el tiempo de incubación en la prueba de antiglobulina, así como incrementar la afinidad de ciertos anticuerpos.

Enfatizaron puntos prácticos en el manejo de esta prueba, es importante colocar volúmenes iguales de células suspendidas en LISS con suero, ya que un exceso considerable de LISS puede producir reacciones falsas positivas debido al bajo contenido iónico en el medio; la adición de un exceso de suero aumenta la fuerza iónica y puede reducir la sensibilidad. Recomiendan guardar la solución de LISS a 4°C y en alícuotas para el uso diario.

Wicker y Wallas (7) hicieron un estudio comparativo entre el método convencional reforzado con albúmina y el método de LISS. Ambas pruebas fueron realizadas a temperatura ambiente y a 37°C. La solución de LISS es la misma descrita por Löw y Messeter.

Estudiaron entre otros, 50 anticuerpos anti sistema Rh, mismos que fueron detectados después de 15 min. de incubación, por el método de LISS. Al emplear el método convencional de rutina para la detección de dichos anticuerpos, el tiempo se duplicó y hasta cuadruplicó.

Varios anticuerpos fueron detectados empleando el medio de LISS después de 15 min. de incubación, en

tanto que por el método convencional después de 60 min de incubación algunos pasaron inadvertidos o no mostraron patrón específico.

La forma de actuar de este medio de LISS es aumentando la actividad de la reacción antígeno-anticuerpo, merced a una reducción de la barrera electrostática que rodea al glóbulo rojo; el resultado es una disminución en el período de incubación, así como un aumento en el título del anticuerpo que facilita su detección.

Rock, Baxter y colaboradores (8) hicieron estudios para pruebas cruzadas empleando el medio de LISS. Los datos presentados por ellos coinciden con los reportes de autores anteriores: Löw y Messeter, Moore y Mollison, Wicker y Wallas, e indican que la técnica de LISS antiglobulina es sensible y rápida para cruzar sangre. Frecuentemente el método de LISS, a pesar de su corto tiempo de incubación, es más sensible que el método convencional antiglobulina. El fracaso para detectar un anticuerpo dentro del sistema Rh (anti E) no puede invalidar el uso del LISS, ya que este anticuerpo sólo lo detectaron por el método de LISS automatizado; este sistema es reconocido como superior a la técnica manual para la detección de anticuerpos en el sistema Rh.

Tanto el trabajo que se viene reseñando como el de Wicker y Wallas indicaron que la incubación óptima es de 15 min; sin embargo, en casos de urgencia puede justificarse su reducción a sólo 5 min.

Rock, Baxter y colaboradores reportaron una estabilidad de los glóbulos rojos suspendidos en LISS que hace posible su utilización durante un lapso de hasta 48 hrs, lo que permite que la sangre a utilizar pueda ser cruzada varias veces sin consumir el piloto inte-

gral de la bolsa, evitando de ésta manera la manipulación de la unidad de sangre.

Como información adicional señalaré que el empleo del medio de LISS ha provocado gran interés entre varios autores que han realizado estudios más elaborados agregando al sistema de LISS otros componentes para detectar e identificar anticuerpos. Tal es el caso de los trabajos realizados por Rosenfiel, Garraty, Rafleigh y colaboradores. (3 IST ANNUAL MEETING ABSTRACTS, - - 1978). (9).

M E T O D O S

## MATERIAL Y METODOS.

El estudio que nos ocupa tiene como objetivo fundamental comparar el método de LISS contra el convencional.

El material biológico utilizado estuvo constituido por:

a) 1480 muestras de sangre obtenidas por punción venosa de donadores en estado basal, de sexo masculino y femenino, cuyas edades oscilaron entre 18 y 50 años, - con un mínimo de 50 Kgs. de peso y 44% de hematocrito, - en buen estado de salud previo examen médico.

b) 3031 fracciones de concentrados de plaquetas cruzados para pacientes de sexo femenino y masculino de edades entre 4 y 75 años, en la mayoría de los casos - los pacientes eran politransfundidos o multíparas y politransfundidas.

En los dos grupos el estudio se realizó simultáneamente tanto por el método convencional como el de LISS.

En el grupo "A" se realizó el estudio de aloanticuerpos.

En el grupo "B" el estudio de pruebas de compatibilidad.

Las muestras de los pacientes que presentaban - reacciones incompatibles eran sometidas a estudios de - aloanticuerpos para la identificación de los mismos.

Las muestras de sangre de los donadores y de los receptores fueron recolectadas en tubos de 13 x 100 mm, sin anticoagulante, después de retraerse el coágulo, se centrifugaron a 3,000 r.p.m. durante 5 min, con el objeto de obtener suero y paquete globular.

Inmediatamente después de montar las pruebas de compatibilidad o de aloanticuerpos, los sueros deben guardarse en el congelador y los glóbulos rojos en el refrigerador para estudios posteriores, si son requeridos.

ESTUDIO DE ALOANTICUERPOS EN EL GRUPO "A" -  
POR EL METODO CONVENCIONAL (SALINO, ENZIMATI  
CO Y PROTEICO).

Fundamento:

El estudio de aloanticuerpos se basa en la reac-  
ción de aglutinación antígeno-anticuerpo.

El o los anticuerpos se van a detectar en el sue-  
ro problema, colocándolo frente a los diferentes antígenos  
presentes en los glóbulos rojos conocidos (patrón -  
eritrocitario reactivo).

Dependiendo de la naturaleza del anticuerpo, se  
detectarán a través de una serie de variables: tempera-  
tura, medios salino, proteico y enzimático, tiempo de -  
incubación; para detectar e identificar los anticuerpos  
incompletos, se recurre al uso de suero antiglobulina  
humana (prueba de Coombs).

Esquema de la reacción de antiglobulina (Todd -  
Sanford 1974).

Suero problema  
(con anticuerpo).

+

Glóbulos rojos  
(antígeno). \_\_\_\_\_



Reacción Ag-Ac  
(no visible).

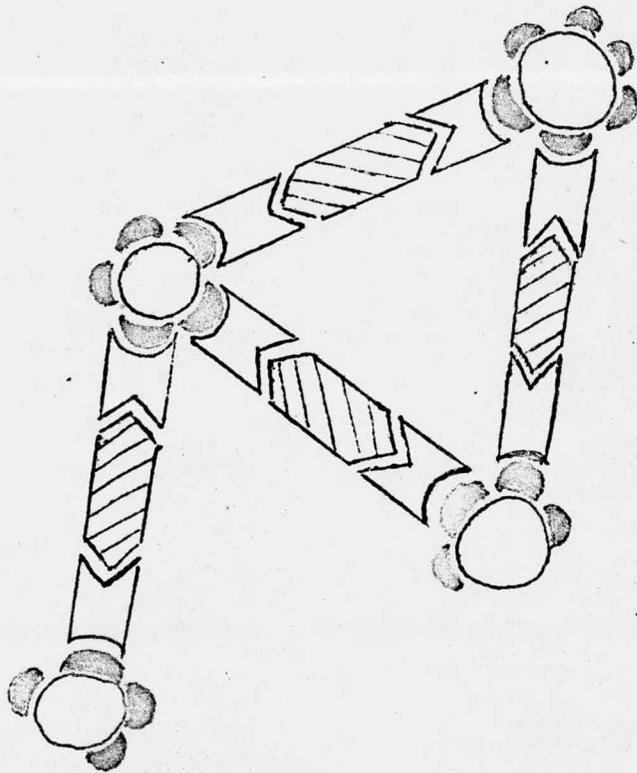
+

Suero antiglobulina  
humana. \_\_\_\_\_



Aglutinación positiva =

Presencia de anticuerpo.



Material biológico:

- 1.- Suero fresco del donador.
- 2.- Glóbulos rojos del donador suspendidos al 5% en su propio suero.
- 3.- Patrón eritrocitario reactivo suspendido al 5% en solución salina isotónica.

Reactivos:

- 4.- Ficina.
- 5.- Albúmina bovina al 30%.
- 6.- Suero antiglobulina humana de amplio espectro.
- 7.- Solución salina isotónica.

Equipo:

- 1.- Tubos de ensayo: para la toma del producto - (13 x 100 mm.) y para las pruebas de hemo- - aglutinación (12 x 75 mm.).
- 2.- Pipetas serológicas de 1 y 0.1 ml.
- 3.- Pipetas Pasteur, bulbos, aplicadores.
- 4.- Gradillas.
- 5.- Centrifuga.
- 6.- Microscopio, portaobjetos.

Valoración de las pruebas:

1.- Manejar antecedentes clínicos mediante el co nocimiento de la historia transfusional u obstétrica - del donador en potencia.

2.- Identificar el grupo sanguíneo ABH y el subgrupo, así como el factor Rh.

3.- Valorar el comportamiento serológico del anticuerpo mediante el siguiente procedimiento.

Procedimientos:

1.- Rotular una serie de tubos de 12 x 75 mm, según el número de células del patrón eritrocitario reactivo, con la sigla S (que corresponde al medio salino).

2.- Otra serie de tubos con la sigla F (ficina - medio enzimático).

3.- Otra serie con la sigla A (albúmina medio - proteico).

4.- Tres tubos extra para los tres medios correspondientes al autocontrol.

5.- Proceder conforme a los siguientes pasos.

MEDIO SALINO-ANTIGLOBULINA.

1.- Colocar en un tubo de 12 x 75 mm, 2 gotas de suero problema más 1 gota de células rojas suspendidas al 5% en solución salina, del correspondiente patrón eritrocitario.

2.- Mezclar bien y centrifugar durante 30 seg, a 3,400 r.p.m.

3.- Leer la aglutinación.

4.- Incubar a 22°C durante 1 hora.

5.- Centrifugar por 30 seg.

- 6.- Leer la aglutinación.
- 7.- Incubar a 37°C durante 1 hora.
- 8.- Centrifugar por 30 seg.
- 9.- Leer la aglutinación.
- 10.- Lavar 3 veces con solución salina isotónica.
- 11.- Agregar 2 gotas de suero antiglobulina humana.
- 12.- Centrifugar por 30 seg.
- 13.- Leer la aglutinación.

#### MEDIO ENZIMATICO.

- 1.- Colocar, en un tubo de 12 x 75 mms, 2 gotas de suero problema más 1 gota de células rojas del patrón eritrocitario reactivo suspendido al 5% en solución salina más 2 gotas de ficina.
- 2.- Mezclar bien e incubar a 22°C durante 15 min.
- 3.- Centrifugar por 30 seg.
- 4.- Leer la aglutinación.
- 5.- Incubar a 37°C durante 15 min.
- 6.- Centrifugar por 30 seg.
- 7.- Leer la aglutinación o la hemólisis.

#### MEDIO PROTEICO-ANTIGLOBULINA.

- 1.- Colocar, en un tubo de 12 x 75 mms, 2 gotas de suero problema más 1 gota de glóbulos rojos del patrón eritrocitario, más 2 gotas de albúmina bovina al 30%.

- 2.- Mezclar bien y centrifugar durante 90 seg.
- 3.- Leer la aglutinación.
- 4.- Incubar a 37°C durante 1 hora.
- 5.- Centrifugar por 90 seg.
- 6.- Leer la aglutinación.
- 7.- Lavar 4 veces con solución salina isotónica.
- 8.- Agregar 2 gotas de suero antiglobulina humana.
- 9.- Centrifugar por 30 seg.
- 10.- Leer la aglutinación.

#### AUTOCONTROL.

Los tubos etiquetados como autocontroles contienen 2 gotas de suero problema más 1 gota de los propios eritrocitos suspendidos al 5% en su propio suero.

Se trabajan en los tres medios antes mencionados siguiendo el mismo protocolo.

#### INTERPRETACION.

Se gradúa la lectura de la reacción por cruces.- Es conveniente valorar la intensidad de la reacción de aglutinación y su comportamiento térmico; ya que las variaciones pueden indicar la presencia de múltiples anticuerpos o de anticuerpo único que reacciona intensamente, bien sea con células homocigotas o con heterocigotas. Si existe hemólisis, esto debe consignarse.

El siguiente esquema de aglutinación es recomen-

dable para interpretar la lectura (Dunsford y Bowley, - 1967).

( 4+ ) ++++ Una masa completa de aglutinación, fácilmente visible.

( 3+ ) +++ Masa de aglutinación separadas, fácilmente visibles macroscópicamente; muy pocas células suspendidas.

( 2+ ) ++ Pequeñas masas aglutinadas; existen células sin aglutinación.

( 1+ ) + Pequeñas masas aglutinadas, con un 60% de células sin aglutinación. Microscópicamente se observan grandes grumos de 20 células.

(+ ) Pequeños grumos de no más de 20 células, - visibles sólo microscópicamente.

g Pequeños grupos de 4 a 6 células, visi- - bles sólo microscópicamente, distribuidos uniformemente.

NEGATIVO. Todas las células están libres y distri- - buidas uniformemente.

Es conveniente, como una medida cuantitativa, expresar la intensidad de la reacción con un número. Esto favorece su titulación y da justamente, el probable punto final de la reacción; la manera más conveniente es - la que se expresa a continuación.

|           |            |           |
|-----------|------------|-----------|
| 12 puntos | equivale a | ++++      |
| 10 puntos | "          | a +++     |
| 8 puntos  | "          | a ++      |
| 5 puntos  | "          | a +       |
| 3 puntos  | "          | a (+)     |
| 1 punto   | "          | a g       |
| 0 punto   | "          | NEGATIVO. |

ESTUDIO DE ALOANTICUERPOS EN EL GRUPO "A" -  
POR EL METODO LISS (LOW Y MESSETER).

Fundamento:

El estudio de aloanticuerpos se basa en la reacción de aglutinación antígeno-anticuerpo.

En este método se substituye la solución salina como medio de suspensión de los glóbulos rojos por una solución de baja fuerza iónica que va a permitir que la reacción antígeno-anticuerpo se lleve a cabo en un tiempo más reducido, en virtud de que su forma de acción - consiste en reducir la barrera electrostática que rodea al glóbulo rojo, permitiendo el acercamiento de los glóbulos y favoreciendo la aglutinación.

Material biológico:

- 1.- Suero fresco del donador.
- 2.- Glóbulos rojos del donador lavados una vez - con solución salina y suspendidos al 5% en LISS.
- 3.- Patrón reactivo eritrocitario suspendido al 5% en LISS.

Reactivos:

- 1.- Solución de LISS.
- 2.- Suero de antiglobulina de amplio espectro.
- 3.- Solución salina isotónica.

Equipo.

Se emplea el mismo material señalado para las - pruebas en el método convencional.

Preparación de la solución de LISS (Löw y Messerter, 1974).

Reactivos:

1.- Solución salina 0.17 M: pesar 0.943 g de cloruro de sodio y disolverlos en 100 ml. de agua destilada.

2.- Solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.15 M: pesar 13.5 g, - de la sal diácida y disolverla en un litro de agua destilada.

3.- Solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.15 M: pesar 5.25 g, de la sal disódica y disolverla en un litro de agua destilada.

4.- Solución de NaOH 1.0 M: pesar 40 g, de hidróxido de sodio y disolverlo en un litro de agua destilada.

5.- Glicina comercial.

Equipo:

1.- Matraz aforado de 250 ml, vasos de precipitado de 250 ml, probeta graduada de 250 ml, agitador de vidrio, pipetas serológicas.

2.- Potenciómetro, conductímetro y balanza analítica.

## Solución de LISS:

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Solución salina 0.17 M.          | 45 ml.  |
| Amortiguador de fosfatos 0.15 M. | 5 ml.   |
| Glicinato de sodio 0.30 M.       | 200 ml. |

## Preparación:

1.- Disolver 4.5 g, de glicina en 200 ml, de agua destilada.

2.- Agregar gota a gota, agitando, NaOH 1.0 M. - hasta pH 6.7

3.- Agregar 5 ml, de solución amortiguadora de - fosfatos 0.15 M (10 ml, de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 20 ml, de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

4.- Agregar 45 ml, de NaCl 0.17 M.

5.- El pH final debe ser de 6.7 y una conductividad de 3.5 mmho/cm a 22°C (Moore y Mollison 1976) y - - fuerza iónica  $\mu$  de 1.05

6.- Guardar a 4°C.

7.- Vigencia de 8 días aproximadamente.

## Procedimiento:

1.- Rotular una serie de tubos de 12 x 75 mms, - según el número de células que contenga el patrón eritrocitario reactivo.

2.- Rotular un tubo para el autocontrol.

3.- Lavar previamente -tres veces- con solución salina isotónica los glóbulos rojos del patrón eritrocitario y suspenderlo al 5% en LISS.

4.- Lavar previamente -una vez- con solución salina los glóbulos rojos del donador y suspenderlos al 5% en LISS.

#### MEDIO LISS/ANTIGLOBULINA.

1.- Colocar en un tubo de 12 x 75 mms, 2 gotas de suero problema más 2 gotas de glóbulos rojos del correspondiente patrón eritrocitario suspendido al 5% en LISS.

2.- Colocar en el tubo para autocontrol 2 gotas de suero problema más 2 gotas de sus propios eritrocitos suspendidos al 5% en LISS.

3.- Mezclar perfectamente todos los tubos e incubar a 37°C durante 5 a 8 min.

4.- Lavar 4 veces con solución salina isotónica.

5.- Agregar 1 gota de suero antiglobulina humana.

6.- Centrifugar durante 10 seg.

7.- Leer la aglutinación.

Con el propósito de evitar reacciones falsas positivas debidas a la molaridad de la solución de LISS - (menor de 0.03 M) se manejó un control de calidad positivo y uno negativo. Para ello se utilizó una muestra -

de suero conocido con anticuerpo de especificidad demostrada y uno sin anticuerpos, en forma rutinaria en el estudio de aloanticuerpos. Los mismos controles de calidad de la solución se usaron para las pruebas de compatibilidad.

#### Interpretación.

La lectura de la reacción de aglutinación también se hace por cruces.

ESTUDIO DE LAS PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD EN  
EL GRUPO "B" POR EL METODO CONVENCIONAL (SA  
LINO, PROTEICO Y ENZIMATICO).

Fundamento:

El estudio de pruebas de compatibilidad también está basado en la reacción de aglutinación antígeno-anticuerpo.

El o los anticuerpos se van a detectar en el suero del receptor al reaccionar frente a los antígenos presentes en los glóbulos rojos del donador.

El objetivo de las pruebas de compatibilidad es evitar la introducción de un antígeno que reaccione con un anticuerpo ya existente en el receptor, así como de un antígeno que lo sensibilice. Con ello se persigue eliminar, hasta donde sea posible, una reacción postransfusional.

Material biológico:

- 1.- Suero fresco del donador y del receptor.
- 2.- Glóbulos rojos del donador y del receptor, - ambos suspendidos al 5% en solución salina isotónica.

Reactivos:

- 3.- Albúmina bovina al 30%.
- 4.- Suero antiglobulina humana de amplio espectro.
- 5.- Solución salina isotónica.
- 6.- Ficina.

### Equipo:

Se emplea el mismo material señalado en las pruebas para el estudio de aloanticuerpos.

### Valoración de las pruebas:

1.- Manejar antecedentes clínicos mediante el conocimiento de la historia clínica u obstétrica del receptor en potencia, su diagnóstico y tratamiento.

2.- Identificar el grupo sanguíneo ABH y el subgrupo, así como el factor Rh.

3.- Valorar el comportamiento serológico de las pruebas de compatibilidad mediante el siguiente procedimiento.

### Procedimiento:

1.- Rotular, para la prueba mayor, 3 tubos con las siglas D salino y D albúmina, D ficina.

2.- Rotular, para la prueba menor, 3 tubos con las siglas R salino y R albúmina, R ficina.

3.- Rotular, para el autocontrol, 3 tubos con las siglas C salino, C albúmina y C ficina.

### MEDIO SALINO/ANTIGLOBULINA.

### Prueba mayor D:

Colocar en un tubo de 12 x 75 mm, 2 gotas de suero del receptor más 1 gota de glóbulos rojos del do-

nador lavados una vez con solución salina isotónica y suspendidos al 5% en solución salina.

Prueba menor R:

Colocar 2 gotas de suero del donador más 1 gota de glóbulos rojos del receptor, lavados una vez con solución salina y suspendidos al 5% en solución salina.

Autocontrol C:

Colocar 2 gotas de suero del receptor más 1 gota de glóbulos rojos del receptor, lavados una vez con solución salina y suspendidos al 5% en solución salina.

Procesar los 3 tubos de acuerdo con los siguientes pasos.

1.- Mezclar bien y centrifugar durante 30 seg, a 3,400 r.p.m.

2.- Leer la aglutinación.

3.- Incubar a 37°C durante 60 min.

4.- Centrifugar por 30 seg.

5.- Leer la aglutinación.

6.- Lavar 3 veces con solución salina isotónica.

7.- Agregar 2 gotas de suero antiglobulina humana.

8.- Centrifugar por 30 seg.

9.- Leer la aglutinación.

## MEDIO PROTEICO/ANTIGLOBULINA.

## Prueba mayor D:

Colocar 2 gotas de suero del receptor más 1 gota de glóbulos rojos del donador, lavados una vez con solución salina isotónica, más 2 gotas de albúmina bovina al 30%.

## Prueba menor R:

Colocar 2 gotas de suero del donador más 1 gota de glóbulos rojos del receptor, lavados una vez con solución salina isotónica, más 2 gotas de albúmina bovina al 30%.

## Autocontrol C:

Colocar 2 gotas de suero del receptor más 1 gota de glóbulos rojos del mismo receptor, lavados una vez y suspendidos al 5% en solución salina, más 2 gotas de albúmina bovina al 30%.

Procesar los 3 tubos de acuerdo con los siguientes pasos:

- 1.- Mezclar bien y centrifugar durante 90 seg, a 3,400 r.p.m.
- 2.- Leer la aglutinación.
- 3.- Incubar a 37°C durante 60 min.
- 4.- Centrifugar por 90 seg.
- 5.- Leer la aglutinación.
- 7.- Lavar 4 veces con solución salina isotónica.

7.- Agregar 2 gotas de suero antiglobulina humana.

8.- Centrifugar por 30 seg.

9.- Leer la aglutinación.

#### MEDIO ENZIMATICO.

##### Prueba Mayor D:

Colocar 2 gotas de suero del receptor más una gota de glóbulos rojos del donador, lavados una vez con solución salina, más 2 gotas de ficina.

##### Prueba menor R:

Colocar 2 gotas de suero del donador más 1 gota de glóbulos rojos del receptor, lavados una vez con solución salina, más 2 gotas de ficina.

##### Autocontrol C:

Colocar 2 gotas de suero del receptor más 1 gota de glóbulos rojos del mismo receptor, lavados una vez con solución salina, más 2 gotas de ficina.

Procesar los 3 tubos de acuerdo a los siguientes pasos.

1.- Mezclar bien e incubar a 22°C durante 15 minutos.

2.- Centrifugar por 30 seg.

3.- Leer la aglutinación o hemólisis.

- 4.- Incubar a 37°C durante 15 min.
- 5.- Centrifugar por 30 seg.
- 6.- Leer la aglutinación.

Interpretación:

Se gradúa la lectura de la reacción por cruces.-  
Es conveniente valorar la intensidad de la reacción de aglutinación y su comportamiento térmico. Si existe hemólisis debe consignarse.

La presencia de aglutinación o hemólisis estará indicando que la prueba es incompatible.

ESTUDIO DE LAS PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD -  
EN EL GRUPO "B" POR EL METODO LISS.

Fundamento:

Es el mismo que para el estudio de aloanticuerpos por el método LISS.

Se hicieron 2 modificaciones al método original de Löw y Messeter, que consistieron en hacer una lectura rápida y otra a 37°C.

Material biológico:

1.- Suero fresco del receptor.

2.- Glóbulos rojos del receptor y del donador ambos lavados con solución salina y suspendidos al 5% en LISS.

Reactivos:

3.- Solución de LISS.

4.- Solución salina isotónica.

5.- Suero antiglobulina humana de amplio espectro.

Equipo:

Se emplea el mismo señalado en las pruebas anteriores.

Procedimiento:

1.- Rotular, para la prueba mayor, 1 tubo con la sigla D LISS.

2.- Rotular, para el autocontrol, un tubo con la

sigla C LISS.

3.- La suspensión se hace colocando en un tubo - de 12 x 75 mms, 0.95 ml, de LISS más 0.05 ml, de paquete globular previamente lavado.

MEDIO LISS/ANTIGLOBULINA.

Prueba mayor D:

Colocar en un tubo de 12 x 75 mms, 2 gotas de - suero del receptor más 2 gotas de glóbulos rojos del do- nador suspendidos al 5% en LISS.

Autocontrol C:

Colocar 2 gotas de suero del receptor más 2 go- tas de glóbulos rojos del mismo receptor al 5% en LISS.

Procesar los 2 tubos de acuerdo con los siguien- tes pasos:

- 1.- Mezclar bien y centrifugar durante 30 seg, a 3,400 r.p.m.
- 2.- Leer la aglutinación.
- 3.- Incubar a 37°C durante 5 a 8 min.
- 4.- Centrifugar por 30 seg.
- 5.- Leer la aglutinación.
- 6.- Lavar 4 veces con solución salina isotónica.
- 7.- Agregar 1 gota de suero antiglobulina huma-

na.

8.- Centrifugar por 10 seg.

9.- Leer la aglutinación.

**Interpretación:**

La lectura se hace por cruces como se ha venido\_ realizando en las pruebas anteriores.

R E S U L T A D O S .

CUADRO 2. NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS Y % DE POSITIVIDAD EN EL ESTUDIO DE ALOANTICUERPOS.

|  | LISS | CONVENCIONAL | %     | TOTAL |
|--|------|--------------|-------|-------|
| Número total de determinaciones.                   | 1480 | 1480         |       |       |
| Número total de aloanti <u>cu</u> erpos positivos. | 10   | 10           | 0.6   | 10    |
|  | 0    | 3            | 0.2   | 3     |
|  | 1    | 0            | 0.06  | 1     |
| Número de autoanticuerpos positivos.               | 0    | 0            |       | 0     |
|  |      |              | TOTAL | 14    |

Durante un período de 7 meses se determinaron - 1480 estudios de aloanticuerpos en donadores, por ambos métodos, encontrando 14 casos de aloanticuerpos positivos, 10 de los cuales se demostraron por ambos métodos, 3 sólo por el método convencional y uno por el método de LISS exclusivamente. Ver cuadro 2.

CUADRO 3. NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS Y % DE POSITIVIDAD EN EL ESTUDIO DE PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD.

|   | LISS. | CONVENCIONAL | %    |
|---|-------|--------------|------|
| Número total de determinaciones.          | 3031  | 3031         |      |
| Número total de aloanticuerpos positivos. | 1     | 1            | 0.03 |
| Número de autoanticuerpos positivos.      | 24    | 24           | 0.7  |

Durante el mismo periodo se transfundieron 3031 concentrados de plaquetas cruzados tanto por LISS como por el método convencional, encontrando sólo en 24 casos incompatibilidad por ambos métodos. Vale la pena señalar que en estos casos el autoanticuerpo fue positivo y el estudio de aloanticuerpos con el patrón eritrocitario reactivo no demostró especificidad. Un caso de incompatibilidad por ambos métodos con autoanticuerpo negativo, y el estudio de aloanticuerpos demostró una especificidad de anti E. Ver cuadro 3.

De los 3031 concentrados transfundidos sólo en 15 casos se reportaron efectos indeseables en el receptor, caracterizados por rash y prurito debido a reacciones a proteínas y leucocitos.

CUADRO 4. TITULO DE ALOANTICUERPOS.

| ANTICUERPO           | LISS   | CONVENCIONAL | TOTAL |
|----------------------|--------|--------------|-------|
| Anti D               | 1:512  | 1:2048       | 1     |
| Anti D               | 1:512  | 1:512        | 1     |
| Anti E               | 1:64   | 1:512        | 1     |
| Anti E               | 1:2    | 1:1          | 1     |
| Anti C               | 1:4    | 1:1          | 1     |
| Anti e               | 1:1024 | 1:128        | 1     |
| Anti Le <sup>a</sup> | 1:256  | 1:16         | 1     |
| Anti Le <sup>a</sup> | 1:256  | 1:64         | 1     |
| Anti Le <sup>a</sup> | 1:1    | -            | 1     |
| Anti P               | 1:2    | 1:1          | 1     |
| Anti P               | 1:1    | 1:1          | 1     |

El cuadro 4 muestra el título de algunos de los anticuerpos identificados por ambos métodos.

Debemos señalar que la titulación de los anticuerpos del sistema Rh en el método convencional fue realizado en medio proteico.

Además, como puede observarse en la mayoría de los casos, el título del anticuerpo fue mayor - por el método de LISS que por el convencional; con excepción de un anti D y un anti E en los cuales - el título fue mayor por el método convencional.

## CUADRO 5. ESTUDIO DE ALOANTICUERPOS ANTI P.

## ESTUDIO INICIAL.

|        | CONVENCIONAL | LISS/c   |
|--------|--------------|----------|
| anti P | positivo     | negativo |
| anti P | positivo     | negativo |
| anti P | positivo     | negativo |

## ESTUDIO POSTERIOR

|        | LISS/r   | LISS/37°C | LISS/c   |
|--------|----------|-----------|----------|
| anti P | positivo | negativo  | negativo |
| anti P | positivo | negativo  | negativo |
| anti P | positivo | negativo  | negativo |

En el estudio de aloanticuerpos realizado por - ambos métodos, la mayoría de los anticuerpos reaccionaron en forma similar, excepto en 3 casos de anti P, los cuales en nuestras manos no se detectaron por el método de LISS coombs, en éstos manejamos lecturas de LISS rápida, LISS 37°C y LISS coombs. Ver cuadro 5.

DISCUSSION.

CUADRO 6. COMPARACION DEL TIEMPO REQUERIDO PARA PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD POR EL METODO CONVENCIONAL Y POR LISS.

| TIEMPO                | TECNICAS   | OBSERVACIONES   |
|-----------------------|--|---|
| 90 min, a<br>120 min. | Salina/r albúmina/r<br>salina/37 albúmina -<br>37°C antiglobulina. Tiem<br>po de incubación: 60 min. | Método convencional,<br>no propio para urgen<br>cias.   |
| 60 min a<br>90 min.   | Igual que la anterior<br>tiempo de incubación:<br>30 minutos.  | En general, para ruti<br>na y urgencias. Para<br>compatibilidad de -<br>glóbulos rojos en -<br>concentrados de pla<br>quetas.       |
| 15 a 30 -<br>min.     | salina/r albúmina/r  | Detecta incompatibi<br>lidad ABH y anticuer<br>pos a alto título. -<br>Se escapan anticuer<br>pos a bajo título -<br>(incompletos). |
| 15 min.               | LISS/r LISS/37°C - -<br>LISS/c.  | Procedimiento de ur<br>gencia general con -<br>alto grado de sensi<br>bilidad.  |

Evidentemente, la fase de antiglobulina en el método convencional presupone un consumo de tiempo que prolonga el procedimiento técnico general. Si bien esto proporciona mayor seguridad en las pruebas de compatibilidad y por ende la eficacia de la transfusión, también constituye un impedimento para proporcionar sangre total o sus productos en forma urgente cuando esto es requerido. En el cuadro 6 podemos apreciar las ventajas de la utilización del LISS.

## CUADRO 7. PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGIA ELECTIVA.

## MASCULINO:

- 1.- No transfundido.  
Aloanticuerpos negativos por LISS.  
Realizar pruebas de compatibilidad por LISS.
- 2.- Politransfundido.  
Aloanticuerpos negativos por LISS.  
Realizar pruebas de compatibilidad por LISS.
- 3.- Politransfundido.  
Aloanticuerpos positivos por LISS.  
Realizar patrón eritrocitario reactivo des-  
plegado.  
(Método convencional).  
Realizar pruebas de compatibilidad previo fe-  
notipo.  
(Método Liss).

## FEMENINO:

- 4.- Gesta 0 Para 0. No transfundida.  
Procede igual que 1.
- 5.- Multípara.  
Procede igual 2.
- 6.- Multípara.  
Procede igual 3 además:  
Aloanticuerpos antileucocitos y antiplaque-  
tas.  
Linfocitotoxicidad.

El cuadro 7 muestra el tipo de protocolo que se sigue en el Banco Central de Sangre del Centro Médico - "La Raza" para cualquier programa de transfusión sanguínea.

CUADRO 8. SENSIBILIDAD DE LOS GLOBULOS ROJOS SUSPENDIDOS EN LISS.

| TIEMPO. | AGLUTINACION. | HEMOLISIS.         |
|---------|---------------|--------------------|
| 0 horas | 3 +           | Sin hemólisis.     |
| 24 "    | 3 +           | Sin hemólisis.     |
| 48 "    | 3 +           | Sin hemólisis.     |
| 72 "    | 2 +           | Hemólisis parcial. |

Con el objeto de comprobar que la sensibilidad de los glóbulos rojos suspendidos en LISS por 48 hrs. no es afectada, se trabajó un suero con anticuerpo de especificidad demostrada frente a una suspensión de glóbulos rojos en LISS que se guardó a 4°C durante 24, 48 y 72 hrs. Durante las primeras 48 hrs. el suero probado frente a dichos glóbulos rojos dio una aglutinación de 3+ sin presentar hemólisis; fue a las 72 hrs. que la aglutinación disminuyó, presentando una hemólisis parcial de los glóbulos rojos. Ver cuadro 8.

## CONCLUSIONES

La técnica de LISS nos permite asegurar ampliamente los resultados, no sólo a nivel de pruebas de compatibilidad, sino también para la detección de aloanticuerpos; en esencia, no sólo reduce el tiempo de incubación sino que no afecta la sensibilidad de la reacción, ya que su forma de acción es reducir la barrera electrostática que rodea al glóbulo rojo y abate el potencial Zeta permitiendo el acercamiento de los mismos y acelerando la aglutinación en la reacción antígeno anticuerpo.

Por otra parte la estabilidad de las células suspendidas en LISS durante un período de 48 horas no se ve afectada, lo que permite que la sangre cruzada y no utilizada, pueda ser cruzada varias veces sin consumir el piloto integral de la bolsa, evitando la manipulación excesiva de la unidad de sangre, que aunado al tiempo breve de incubación, la hace en general bastante valiosa para los servicios de transfusión.

La utilización de esta técnica no implica que para la identificación de los aloanticuerpos que se captan en forma rutinaria en las pruebas de compatibilidad y estudio de aloanticuerpos, no se recurra al método convencional, en donde las variables temperatura, medio, centrifugación, son vitales para la definición de la especificidad. Dichos estudios deben llevarse a cabo en los centros de referencia correspondientes.

La instalación en bancos de sangre de programas de transfusión de plaquetas en donde la carga de trabajo suele ser excesiva y de acuerdo a la metodología de compatibilidad específica que se lleva a cabo, exige una prueba rápida y sencilla para compatibilidad de glóbulos rojos que sea trabajada en forma paralela a la anterior,

siendo el método LISS el que reúne las características que a juicio nuestro son las más completas.

Queda aún por evaluar la aplicación y efectividad del LISS en los estudios de anemias hemolíticas autoinmunes sobre todo en aquellas que cursan con antiglobulina negativa por baja concentración de anticuerpos adheridos al glóbulo rojo.

RESUMEN .

La transfusión sanguínea ha evolucionado en forma considerable ya que gracias al descubrimiento de los antígenos de grupo sanguíneo se ha logrado conocer la antigenericidad de la sangre, y esto ha sido de gran importancia en la transfusión como medio terapéutico.

Asimismo, el estudio de los aloanticuerpos irregulares, tanto en el donador como en el receptor, ha venido a contribuir para que la transfusión sanguínea sea lo más benéfica posible para el receptor, evitando, hasta donde se puede, las reacciones postransfusionales.

Del conocimiento de los antígenos de grupo sanguíneo se ha derivado toda una metodología para el estudio de la detección e identificación de los anticuerpos y de sus respectivos antígenos. Esta metodología llamada convencional, permite a través de una serie de variables evidenciar los anticuerpos. Estas variables necesitan de un tiempo adecuado para su realización, lo que se traduce en una desventaja para proporcionar sangre en casos de urgencia.

La preocupación por solucionar estos casos, la inquietud nacida de ello, nos condujo a buscar una forma rápida y segura que nos permitiera proporcionar sangre sin poner en peligro la vida del paciente, puesto que en la mayoría de los casos en que los requerimientos son realmente urgentes, sólo se realizaban las pruebas rápidas, y aun cuando el estudio se continuara, la sangre ya estaba siendo transfundida, con el riesgo de una reacción indeseable en el receptor. Los antecedentes bibliográficos reportados por Löw y Messeter en 1974, pusieron frente a nosotros una metodología que ofrecía varias ventajas y decidimos ponerla en práctica en el Banco Central de Sangre del Centro Médico "La Raza".

La principal ventaja que encontramos en este método es la reducción en el tiempo de incubación en la fase de la prueba de antiglobulina, prueba que coadyuva en la detección e identificación de los anticuerpos de tipo inmune o incompletos, que en última instancia son los que más nos interesan.

Mientras que el método convencional requiere de una hora de incubación, con el método de LISS bastan sólo 5 min. La proporción de 12 a 1 expresa en cifras, de manera fría, lo que en la práctica médica se traduce en una atención más eficiente y rápida de los pacientes.

Otra ventaja es que incrementa la afinidad de algunos anticuerpos, sobre todo del sistema Rh, que según se sabe son de poca afinidad en medio salino, y requieren de medios macromoleculares para su mejor detección. Una ventaja más es que se trata de un método sencillo y fácil de reproducir: la preparación de la solución de LISS es tan simple como la de cualquier solución amortiguadora y su costo es mínimo.

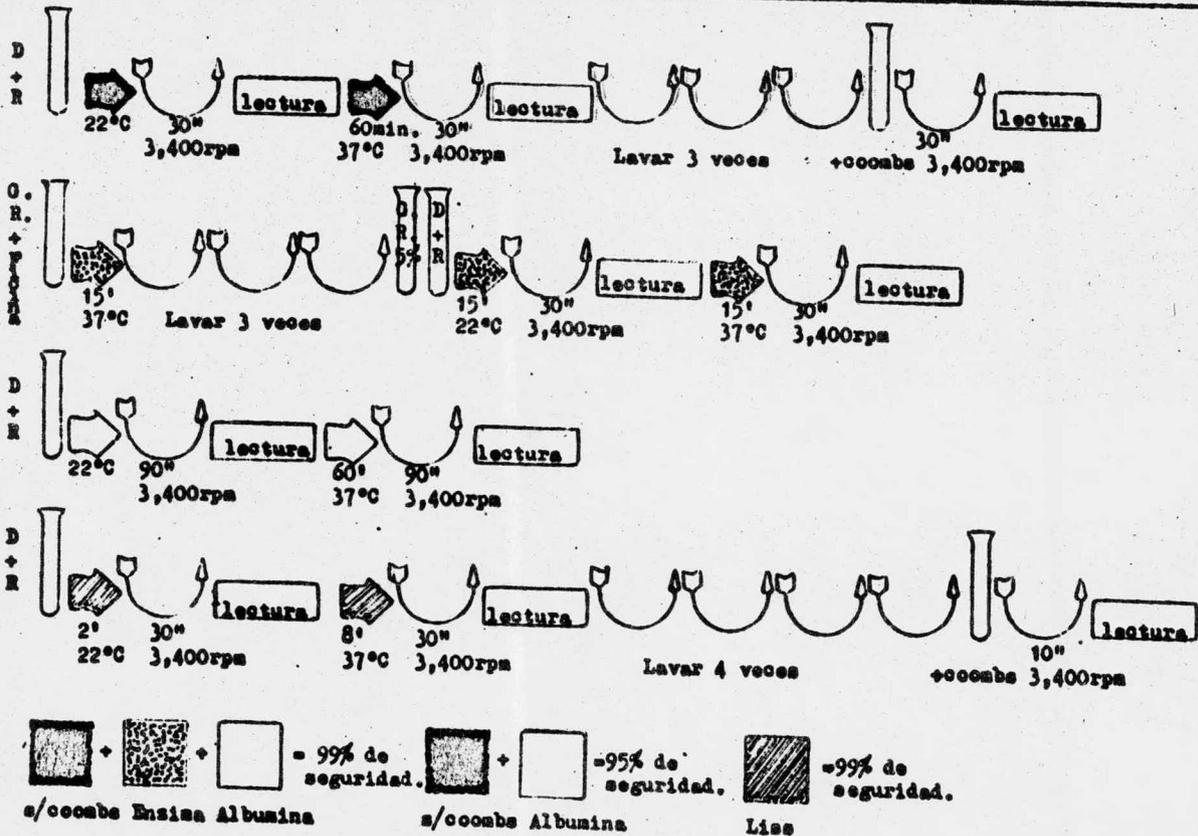
La única desventaja que ha sido reportada en la bibliografía es que los medios de baja fuerza iónica dan reacciones falsas positivas, probablemente por la agregación de IgG inespecífica presente en el suero así como por las fracciones de complemento que se adhieren a los eritrocitos; sin embargo, esto se logró evitar a partir de las investigaciones de Löw y Messeter, quienes concluyeron que la molaridad del NaCl en la solución no debía ser inferior a 0.03 M.

Durante los meses en que se hicieron estudios comparativos con el método de LISS y el convencional, en las pruebas de compatibilidad no se reportaron reacciones postransfusionales significativas.

Una vez comprobada la eficacia del método de -- LISS se le ha seguido utilizando en la realización de -- las pruebas de compatibilidad aplicadas a glóbulos ro-- jos en el programa de plaquetas. De igual forma, se ha\_ venido recurriendo a él para la detección de los aloan- ticuerpos irregulares en los donadores que asisten al - Banco Central de Sangre.

Entre los objetivos que más recientemente se ha\_ fijado el organismo en el que labora quien esto escri-- be, se encuentra el de aplicar el multicitado método en los estudios de anemias hemolíticas autoinmunes.

ESQUEMA DE LOS PROCEDIMIENTOS TECNICOS.



BIBLIOGRAFIA .

- 1.- Todd-Sanford, Davidsohn I., Henry J.B., Diag  
nóstico clínico por el laboratorio, Salvat -  
Editores, S.A. Barcelona, 1974.
- 2.- Dunsford and Bowley, Techniques in blood -  
grouping, 2 Nd. Edn, vol. II, 1967.
- 3.- Race, R.R. and Sanger, R., Blood Groups in -  
Man, 5a. Ed. Oxford Blackwell Scienc. Publ.-  
Ltd., 1968.
- 4.- Blood Group Antigens & Antibodies as Applied  
to Compatibility Testing, Ortho Diagnostics\_  
Inc. Raritan, New Jersey, 1967.
- 5.- Löw, B. and Messeter, L., "Antiglobulin Test  
Low-Ionic-Strength Salt Solution for Rapid -  
Antibody Screening and Cross-Matching", Vox  
Sang, 26:53-61, 1974.
- 6.- Moore, H.C. and Mollison, P.L., "Use of a -  
Low-Ionic-Strength Medium in Manual Test for  
Antibody Detection", Transfusion, 16:4, - -  
1976.
- 7.- Wicker, B. and Wallas, C.H., "A Comparisión  
of a Low-Ionic-Strength Saline Medium with -  
Routine Methods for Antibody Detection", -  
Transfusion, 16:5, 1976.
- 8.- Rock, G. and Baxter, A., "LISS an Effective\_  
Way to Increase Blood Utilization", Transfu-  
sion, 18:2, 1978.

- 9.- 3 IST ANNUAL MEETING ABSTRACTS, Transfusion, 18:5, 1978.
- 10.- Lincoln, P.J. and Dodd, B.E., "The Use of Low Ionic Strength Solution (LISS) in Elution - Experiments and in Combination with Papain-Treated Cells for the Titration of Various - Antibodies, Including Eluted Antibody". Vox Sang, 34:221-226, 1978°
- 11.- Kuhns, W.J.: Crossmatching whole blood for - massive transfusion therapy with particular - reference to open heart surgery. Bull. Amer. Ass. Blood Banks, 12:186, 1959.
- 12.- Allen, F.H., Jr., von Bercken, T., and Boyce, S.J.: Crossmatching of blood for massive - transfusion. Bull. Amer. Ass. Blood Banks - 12: 267, 1959.