

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION Y ESTANDARIZACION DEL SUERO
ANTI-D(Rh₀) PARA REFERENCIA Y CONTROL
DE CALIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
SILVIA ZARAGOZA RODRIGUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 1977

ADQ

EXCHA

PROG

S

409



QUIMICA

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

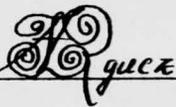
PRESIDENTE: Prof. MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL: Prof. RAMON GUEVARA ESTRADA
SECRETARIO: Prof. JOSEFINA PIEDRAS ROSS
1er. SUPLENTE: Prof. G. LETICIA CARRASCO R.
2do. SUPLENTE: Prof. LUZ MA. HERNANDEZ B.

Sitio donde se desarrolló
el tema:

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
(Depto. de Hematología)

Nombre completo y firma
del sustentante:

SILVIA ZARAGOZA RODRIGUEZ



A handwritten signature in black ink, featuring stylized, overlapping loops and flourishes. The name 'ZARAGOZA' is partially legible at the end of the signature. The signature is written above a horizontal line.

Nombre completo y firma
del asesor del tema:

Prof. JOSEFINA PIEDRAS ROSS



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Josefina Piedras Ross'. The signature is written above a horizontal line.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO
DE HEMATOLOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE
LA NUTRICION, BAJO LA DIRECCION DE LA
DRA. MA. SOLEDAD CORDOVA CABALLERO.

CON GRATITUD

A LOS ASESORES DEL TEMA, LAS Q.F.B. IRENE
ROBLES ARREDONDO Y JOSEFINA PIEDRAS ROSS

ESTO CONSTITUYE UN PEQUEÑO PASO DE ESA GRAN
CAMINATA QUE ES EL REALIZARSE, GRACIAS A
MIS PADRES POR TODO EL ESFUERZO HECHO:

GREGORIO ZARAGOZA SALAZAR

TOMASA RODRIGUEZ DE ZARAGOZA

A MIS HERMANOS:

ROSA MA., GREGORIO, MA. DEL ROSARIO
Y JORGITO

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

A LA MEMORIA DEL PROFESOR RAMON GUEVARA ESTRADA

VIVIR ES ELEGIR Y ELEGIR ES SIEMPRE
SACRIFICAR ALGO.

CON AMOR PARA CARLOS

AL HONORABLE JURADO:

CON ADMIRACION Y RESPETO A LA
PROFESORA MAGDALENA ACOSTA SE-
GURA POR LA GRAN CALIDAD DE SU
LABOR DOCENTE.

I N D I C E

	pág.
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	4
III. MATERIAL Y METODOS	12
IV. RESULTADOS	19
V. RESUMEN	21
VI. CONCLUSIONES	24
ANEXO	I
VII. BIBLIOGRAFIA	26

PREPARACION Y ESTANDARIZACION DEL SUERO ANTI-D(Rh₀) PARA
REFERENCIA Y CONTROL DE CALIDAD

I. INTRODUCCION

Los intentos para obtener suero anti-D(Rh₀) en forma experimental, mediante la inmunización de animales con eritrocitos humanos D(Rh₀)-positivos no han tenido éxito; los títulos de anticuerpos que se obtienen son bajos y además no son específicos. Estos sueros aglutinan tanto a los glóbulos rojos D(Rh₀)-positivos como a los glóbulos rojos D(Rh₀)-negativos, al actuar contra el antígeno LW^{1,2,3,4}.

Desde 1939 en que Levine y Stetson⁵ reportaron por vez primera el caso de una mujer cuyo suero aglutinaba al 85% de los eritrocitos del mismo grupo ABO, al igual que la sangre de su esposo y la de su producto que nació macerado; se sabe que el suero llamado por Landsteiner y Wiener anti-Rh, debe obtenerse de humanos D(Rh₀)-negativos transfundidos con eritrocitos D(Rh₀)-positivos o bien de mujeres inmunizadas por un producto D(Rh₀)-positivo.

El suero anti-D(Rh₀) que se emplea en los bancos de sangre

para la tipificación del antígeno $D(Rh_0)$ en las sangres del donador y del receptor, habitualmente proviene de diversas casas comerciales que lo obtienen de sujetos inmunizados con glóbulos rojos $D(Rh_0)$ -positivos. Los anticuerpos anti- $D(Rh_0)$ llamados también "inmunes o incompletos", son en su mayoría IgG, por tanto, los sueros comerciales se diluyen en una solución de albúmina con el fin de que al ponerlos en contacto con glóbulos rojos $D(Rh_0)$ -positivos produzcan su aglutinación inmediata. Esto es, se realiza una técnica en medio con alto contenido protéico para la demostración de anticuerpos que, como el anti- $D(Rh_0)$ no actúan en medio salino^{6,7,8}.

En la práctica diaria es frecuente observar variaciones importantes entre los diferentes lotes de sueros tipificadores de una misma casa comercial; estas variaciones son mayores aún cuando provienen de distintas casas comerciales. Se explica entonces, el gran margen de error en la tipificación del antígeno $D(Rh_0)$ que, en ocasiones, es de fatales consecuencias cuando no se tienen los controles adecuados.

Se consideró, por tanto, importante contar en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de la Nutrición, con un suero anti- $D(Rh_0)$

conocido que sirviera como referencia y control de calidad tanto de los sueros tipificadores anti-D(Rh₀) como de los diferentes reactivos utilizados en las diversas técnicas destinadas a la demostración in vitro de los anticuerpos que no actúan en medio salino.

II. GENERALIDADES

La naturaleza química del antígeno D(Rh₀) se desconoce, hay algunas evidencias de que se trata de una proteína. Green⁹, estudió la relación entre el antígeno Rh y los grupos sulfhidrilo de la membrana de los eritrocitos, poniendo en contacto N-etilmaleimida (compuesto que reacciona con grupos sulfhidrilo) con membranas de eritrocitos, observó que había pérdida gradual de la actividad antigénica Rh, un efecto similar se obtuvo con la exposición a grandes concentraciones de urea (>2.5 M).

En 1968 Green¹⁰, estudió la posibilidad de que la interacción lípido-proteína fuera responsable de la actividad antigénica. La antigenicidad de las membranas de eritrocitos D(Rh₀)-positivos fue eliminada después de la extracción con 1-butanol y pudo ser regenerada en gran parte por la adición del extracto en 1-butanol de membranas de eritrocitos D(Rh₀)-positivos y D(Rh₀)-negativos, el extracto no mostró esta actividad por inhibición de hemaglutinación, lo que indica que los lípidos no llevan las determinantes antigénicas pero pueden ser esenciales para la conformación de ellas. Así, la especificidad quedó asociada con los extractos de membrana. La cromatografía en capa fina reveló que el material fue le-

citina.

Dodd^{11,12}, reportó que las preparaciones del ácido N-acetil-neuramínico (NANA), un gangliósido de cerebro y productos de degradación como N-acetilglucosamina y N-acetilmanosamina, inhibieron específicamente el anticuerpo anti-Rh y que esto dependía del tiempo de incubación del inhibidor con el suero anti, de la cantidad de suero anti-Rh usado y de la naturaleza de la preparación. La mayor inhibición por el gangliósido y el ácido colomínico que contienen NANA en forma polimerizada están en apoyo de que la estructura del antígeno puede consistir de una estructura terminal de NANA.

Lubinski y Portnuff¹³, han demostrado que el calentamiento a 56°C reduce o destruye la aglutinabilidad de las células D(Rh₀)-positivas por el suero anti-D(Rh₀), mientras que la aglutinabilidad de células A, B, M y N por los sueros respectivos, aparentemente no es afectada. Estos hechos sugirieron que el receptor D(Rh₀) es probablemente más superficial que los receptores A, B, M y N. La adición de formalina (0.1 a 1.0%) a las suspensiones de eritrocitos reduce su aglutinación en mayor grado por suero anti-D(Rh₀) que por sueros anti-A y anti-B.

Landstienner y Wiener^{14,15}, en 1940, al inyectar eritrocitos de monos Rhesus a cobayos y conejos, encontraron que los sueros obtenidos tenían la capacidad de reaccionar con la mayoría de los eritrocitos humanos, asumiendo que estos eritrocitos tenían el antígeno "Rh" y los llamaron Rh positivos. Los eritrocitos Rh negativos eran aquellos que no presentaban aglutinación con el suero de cobayo o de conejo inmunizados, por carecer del antígeno. De esta manera surgió un nuevo sistema de grupo sanguíneo, cuya complejidad se inicia a partir del descubrimiento de los otros factores que lo constituyen y con la aparición de dos teorías opuestas sobre la herencia de los mismos (Tabla No. 1).

La impresión inicial de que los anticuerpos responsables de las reacciones post-transfusionales y de las incompatibilidades feto-maternas eran semejantes al anticuerpo producido por cobayos y conejos, se modificó ante la evidencia presentada en los trabajos de Levine^{3,4}, Fisk¹, Murray y Clark², sobre la especificidad de este anticuerpo contra un antígeno diferente, el LW, llamado así en honor de Landsteiner y Wiener.

Fisher y Race^{16,17,18,19} proponen la herencia de los antígenos Rh a través de tres pares de genes alelos estrechamente uni-

TABLA No. 1 NOMENCLATURA COMPARATIVA DE ANTIGENOS Rh

Wiener	Fisher-Race	Rosenfield
Rh ₀	D	Rh1
rh'	D	Rh2
rh''	E	Rh3
hr'	\bar{c}	Rh4
hr''	e	Rh5
hr	ce(f)	Rh6
hr _i	Ce	Rh7
rh ^{w1}	C ^w	Rh8
rhx	C ^x	Rh9
hrv	ce ^s (V)	Rh10
rh ^{w2}	E ^w	Rh11
rh ^G	G	Rh12
Rh ^A		Rh13
Rh ^B		Rh14
Rh ^C		Rh15
Rh ^D		Rh16
Hr ⁰		Rh17
Hr		Rh18
hrs		Rh19
hrvH	e ^s (VS)	Rh20
--	C ^G	Rh21
rh	CE	Rh22
rh ^{w0}	D ^w	Rh23

Wiener	Fisher-Race	Rosenfield
-	E^T	Rh24
-	LW	Rh25
-	$D^{ea1}(\bar{c}\text{-like})$	Rh26
hri	cE	Rh27
hrH		Rh28
RH		Rh29
-	Go^a	Rh30
hr^B		Rh31
	"Troll"	Rh32
R^{oHar}		Rh33

Goudemand, M and Delmas-
 -Marsalet. Principles of
 Immunohematology, 1975
 p. 59

dos, el Cc, el Dd y el Ee. Según esta teoría, una persona hereda un conjunto de tres genes Rh de cada uno de sus padres que pueden ser C o c, D o d, E o e. Por ejemplo: una persona puede heredar CDe de un padre y cde de otro. El esquema de Fisher ha tenido que ser ampliado y, aún así, no ha probado ser enteramente adecuado para explicar todas las reacciones observadas en el sistema Rh.

Wiener^{20,21,22} ideó una nomenclatura y teoría genética diferente, postulando que la existencia de una serie de genes alelos localizados en un locus determinan la presencia de los antígenos. Cada uno de estos antígenos está caracterizado por su habilidad para reaccionar con diferentes anticuerpos, lo cual no significa que contienen dos propiedades genéticamente separadas, sino que son debido a la acción de un gen y son heredados como unidad, las propiedades serológicas son debidas a la presencia de dos o más "antígenos parciales" dentro de la molécula (Tabla No. 2).

El antígeno D(Rh₀), desde el punto de vista clínico, es el más importante de este sistema de grupo sanguíneo, por su frecuente relación con problemas post-transfusionales y anemia hemolítica en el recién nacido.

TABLA No. 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE UN EJEMPLO DE UN FENOTIPO Rh
DE ACUERDO A LOS DOS CONCEPTOS MAS ACEPTADOS DEL SISTEMA Rh

Teoría de	Gen (Cromosoma)	Antígeno (Eritrocitos)	Determinantes Antigénicas	Anticuerpos
Wiener	R ₁	Rh ₁	Rh ₀	anti-Rh ₀
			rh'	anti-rh'
			hr''	anti-hr''
Fisher-Race	D	D	D	anti-D
	C	C	C	anti-C
	e	e	e	anti-e

Goudemand, M. and Delmas-Marsalet, Y.
Principles of immunohematology 1975,
p. 61.

Inmunización al factor D(Rh₀) por transfusión de sangre. La mayoría de las personas D(Rh₀)-negativo producen anticuerpos anti-D(Rh₀) después de una transfusión de sangre D(Rh₀)-positiva²³. Diamond²⁴, Pollack^{25,26}, Davey²⁷ y Gunson²⁸, han estudiado la proporción de individuos D(Rh₀)-negativos que por inyección de eritrocitos D(Rh₀)-positivos llegan a inmunizarse a este factor, los resultados han variado del 15 al 81%, el tiempo requerido para demostrar el anticuerpo serológicamente, varía de dos a seis meses, aún cuando se puede detectar antes y después de este tiempo. Pollack²⁵, ha establecido que en los individuos susceptibles inmunológicamente, la frecuencia de inmunización incrementa con el volumen de eritrocitos D(Rh₀)-positivos administrados.

Krevans y Col²⁹, hicieron una observación de gran interés, después de inyectar glóbulos rojos D(Rh₀)-positivos a sujetos D(Rh₀)-negativos por primera vez, encontraron que en un período de seis semanas, podían ser divididos en 2 clases: aquellos en quienes la segunda y subsecuentes inyecciones de glóbulos rojos D(Rh₀)-positivos marcados con Cr⁵¹ fueron rápidamente eliminados y que formaron anticuerpos anti-D(Rh₀) y aquellos en quienes la segunda y subsecuentes inyecciones de estos eritrocitos sobrevivieron normalmente y no formaron anticuerpos anti-D(Rh₀).

Mollison³⁰, concluye que solamente cierta proporción de individuos D(Rh₀)-negativos pueden ser inmunizados al antígeno D(Rh₀), aunque establece que la diferencia no es absoluta y que, algunos de ellos son inmunizados mucho más fácilmente que otros. Además supone que las diferencias son debidas a fenotipo, es decir, la diferencia en respuesta es presumiblemente controlada genéticamente.

Inmunización al factor D(Rh₀) por embarazo. El paso de eritrocitos del feto a la madre es necesario para que se lleve a cabo la inmunización al factor D(Rh₀) por embarazo^{31,32,33}. Chown³⁴, fue el primero en demostrar la hemorragia transplacentar del feto a la circulación de la madre, la sangre de una mujer que tuvo un niño con anemia severa fue examinada inmediatamente después del parto por aglutinación diferencial, absorción de anticuerpos y análisis bioquímicos, demostrándose la presencia de células D(Rh₀)-positivo y de hemoglobina fetal en su circulación; posteriormente las células D(Rh₀) positivas desaparecieron de la circulación en un período de 48 días con desarrollo de anticuerpos anti-D(Rh₀) en la madre.

III. MATERIAL Y METODOS

En la obtención de suero específico anti-D(Rh₀), es de gran importancia la absorción completa de aquellos anticuerpos que se encuentran también en el suero como son, el anti-A, el anti-B y otros. La absorción de estos anticuerpos se efectúa con sustancias de grupo sanguíneo, habitualmente las presentes en los glóbulos rojos y el mejor procedimiento es aquel que no modifica el título ni la avidéz del anticuerpo específico que se desea.

La Organización Mundial de la Salud³⁵ recomienda la absorción con glóbulos rojos dentro de los 5 días consecutivos a su extracción. Se estudió sin embargo, el grado de absorción de los eritrocitos formalinizados y del estroma de eritrocitos, con el propósito de investigar la posibilidad de tener siempre antígenos eritrocítricos para la absorción. Por tanto en un estudio preliminar se comparó los resultados de la absorción de un suero con título de anti-A 1:64, empleando eritrocitos "frescos"³⁶, eritrocitos conservados en formaldehído-salina-fosfatos³⁷ y con estroma de eritrocitos³⁸ de grupo A. El suero en estudio, se inactivó calentándolo por 4 minutos a 64°C, previamente a la absorción.

1. ABSORCIÓN CON ERITROCITOS CONSERVADOS EN SOLUCIÓN FORMAL- DEHÍDO/SALINA AMORTIGUADA CON FOSFATOS

1.1 Preparación de reactivos

-Solución salina amortiguada con fosfatos.

NaCl	0.85 % -----	100 ml
KH_2PO_4	0.15 mol/litro	24 ml
Na_2HPO_4	0.15 mol/litro	76 ml

-Solución formaldehído salina amortiguada con fosfatos.

Formaldehído al 36 % (P/V) 20 ml

Solución salina amortiguada con fosfatos 80 ml

1.2 Formalinización de los eritrocitos

-La obtención de la sangre se hace por punción venosa, colocán-
dola en tubos de ensaye de 13 por 100 mm sin anticoagulante.

-Lavar los eritrocitos 3 veces con solución salina isotánica.

-Agregar a 1 ml del paquete de eritrocitos 20 ml de la solución
formaldehído salina amortiguada con fosfatos poco a poco y agi-
tando continuamente.

-Incubar durante 20 horas a temperatura ambiente los eritroci-

tos suspendidos en la solución formaldehído salina amortiguada con fosfatos.

- Lavar los eritrocitos 3 veces con solución salina amortiguada con fosfatos.
- Hacer una suspensión de los eritrocitos al 50 % en solución salina isotónica.

1.3 Absorción de anticuerpos anti-A con eritrocitos grupo A formalinizados.

- Agregar 0.5 ml de eritrocitos grupo A formalinizados y suspendidos al 50% en solución salina isotónica a 1 ml de suero anti-A.
- Incubar una hora a 37°C.
- Centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm y separar el sobrenadante en donde, mediante titulación se investiga la presencia de anti-A (Anexo, Técnica No. 1).

2. ABSORCION CON ESTROMA DE ERITROCITOS

- Lavar los eritrocitos con solución salina isotónica 3 veces.
- Colocar 1 ml del paquete celular en un tubo de 16 por 150 mm y congelarlo en una mezcla de hielo seco-acetona.
- Descongelar la suspensión a temperatura ambiente y agregar 10 ml de alcohol etílico al 50 % frío.
- Congelar la suspensión en la mezcla hielo seco-acetona y dejarla en el congelador durante una hora.
- Descongelar a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm y desechar el sobrenadante.
- Lavar el estroma de una a tres veces con agua destilada.
- Hacer una suspensión de estroma al 50 % en solución salina isotónica y conservarla en el refrigerador.

2.2 Absorción de anticuerpos anti-A con estroma de eritrocitos del grupo A.

- Agregar a 2 ml de suero anti-A 1 ml de estroma de eritrocitos del grupo A, suspendidos al 50% en solución salina isotónica.
- Incubar una hora a 37°C, agitando ocasionalmente.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos y separar del estroma el sobrenadante en donde, mediante titulación se investiga la presencia de anti-A. (Anexo, Técnica No. 1).

2.3 Absorción con estroma liofilizado.

- Liofilizar el estroma suspendido en solución salina isotónica.
- En dos tubos de 13 por 100 mm colocar 1 ml de suero anti-A y agregar 50 mg de estroma liofilizado.
- Incubar los tubos durante una hora a 37°C y a temperatura ambiente respectivamente, agitar ocasionalmente.

- Centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm y separar del estroma el sobrenadante en donde se investiga la presencia de anti-A. (Anexo, Técnica No. 1).

3. ABSORCION CON ERITROCITOS "FRESCOS"

- Lavar los eritrocitos de grupo A dentro de las 2 primeras horas posteriores a la extracción, 3 veces con solución salina isotónica y eliminar totalmente la solución salina en el último lavado.
- Adicionar a 1 ml de suero anti-A, 0.5 ml del paquete de eritrocitos lavados.
- Incubar durante una hora a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm y separar el sobrenadante de los glóbulos rojos en donde, mediante titulación se investiga la presencia de anti-A. (Anexo, Técnica No. 1).

4. RESULTADOS DE LA ABSORCION DE ANTICUERPOS ANTI-A

Con una sola absorción, cuando se emplearon eritrocitos formalinizados, estroma de eritrocitos liofilizados o con eritrocitos "frescos" se logró la eliminación total de los anticuerpos anti-A. Con el empleo de estroma de eritrocitos suspendidos al 50 % en solución salina isotónica se requirió en cambio, de dos absorciones. (Tabla No. 3).

Posterior a la absorción de anticuerpos anti-A con eritrocitos formalinizados y con estroma liofilizado y sin liofilizar, el suero presentaba un marcado color café rojizo o café amarillento que dificultaba la lectura macroscópica de aglutinación. Por tanto, para la preparación de suero anti-D(Rh₀) fue seleccionada la técnica de absorción con eritrocitos "frescos", con la que se logró la absorción completa de anticuerpos anti-A sin modificación aparente del color del suero.

TABLA No. 3 RESULTADO DE LA ABSORCIÓN[&] DE ANTICUERPOS ANTI-A CON
ERITROCITOS Y ESTROMA DE ERITROCITOS DE GRUPO A

Diluciones	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Título de anti-A	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	-
Absorción con G.R. formalizados	-	-	-	-	-	-	-	-
Absorción con es- troma (50% en sa- lina)	1+	-	-	-	-	-	-	-
Absorción con es- troma liofilizado	-	-	-	-	-	-	-	-
Absorción con G. R. "Frescos"	-	-	-	-	-	-	-	-

[&] una sola absorción

5. PREPARACION DEL SUERO ANTI-D(Rh₀)

Se utilizaron 5 plasmas con anticuerpos anti-D(Rh₀), 4 provenientes de mujeres D(Rh₀)-negativas inmunizadas con productos D(Rh₀)-positivos, de la Clínica de Isoinmunización del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 1 del IMSS; el quinto plasma era de un varón D(Rh₀)-negativo inmunizado por una transfusión incompatible. Todos eran del grupo 0 con fenotipo ccee.

Se investigó en todos la presencia de anticuerpos contra otros antígenos de grupo sanguíneo además de anti-D(Rh₀), con el Patrón Celular Reactivo ("Panel"), empleando las técnicas en medio salino, en medio con alto contenido protéico^{6,7,8}, con bromelina³⁹ y con anti-gamma globulina humana (Coombs)⁴⁰ (Anexo, Técnica No. 2). Con estas mismas técnicas (Anexo, Técnica No. 3) se efectuaron las titulaciones de anti-D(Rh₀), en cada uno de los sueros, con glóbulos rojos grupo 0 y fenotipo DCcee. Tabla No. 4.

La obtención del suero a partir del plasma, se hizo adicionando 1 ml de CaCl₂ 1.0 mol/litro por cada 100 ml de plasma, incubando a temperatura ambiente durante 20 horas y centrifugando por 10 minutos a 3000 rpm para eliminar el coágulo. Posteriormente se inactivaron a 56°C durante 30 minutos.

Los sueros tenían únicamente anticuerpos anti-D(Rh₀), como ha sido señalado, la absorción de los anticuerpos anti-A y anti-B se realizó con eritrocitos "frescos". Por dificultades en la obtención de eritrocitos en estas condiciones, en tres de los sueros la absorción se efectuó con eritrocitos congelados⁴² (Anexo, Técnica No. 4) con resultados óptimos. Durante todo el proceso de absorción se guardaron estrictas condiciones de esterilidad, se agregó azida de sodio⁴³ al 0.1 % a cada uno de los sueros una vez absorbidos y se colocaron en frascos estériles en alícuotas de 10 ml aproximadamente, conservándolos congelados.

IV. RESULTADOS

La absorción con eritrocitos "frescos" o congelados prácticamente no modificó el título de anti-D(Rh₀) (Tabla No. 5); presentándose variaciones solo de un tubo en las diluciones, en algunos de los sueros. En los 5 sueros se investigó la presencia de crioglutininas (Anexo, Técnica No. 5), ante la posibilidad de que un título elevado de éstas diera lecturas falsas positivas.

En los 5 sueros después de la absorción de anticuerpos anti-A y anti-B, se comprobó su especificidad, potencia y avidez mediante la tipificación de glóbulos rojos con grupos ABO y fenotipos del sistema Rh diferentes y en diversas condiciones: glóbulos rojos de reciente extracción, glóbulos rojos almacenados a 4°C de 5 a 7 días y glóbulos rojos congelados. En todas estas determinaciones se puso un control de aglutinación inespecífica, usando albúmina bovina al 30 % con los eritrocitos a determinar.

Se tipificaron simultáneamente con sueros anti-D(Rh₀) comerciales y los sueros preparados los donadores y receptores del Banco de Sangre del INN, mediante la técnica de tubo rápida (Anexo, Técnica No. 6). Para este propósito los sueros se diluyeron volu-

men a volumen en una solución de albúmina al 30 % a excepción del suero No. 1 que se diluyó en dos volúmenes de albúmina.

En 2000 muestras de sangre tipificadas no se encontró discrepancia en los resultados positivos y negativos. Como era de esperarse en los sueros No. 2 y No. 3, con título de anti-D(Rh₀) bajo, hubo necesidad de incubar hasta 30 minutos a 37°C la mezcla de glóbulos rojos con anti-D(Rh₀), antes de centrifugar para observar la aglutinación macroscópica. En tanto que con los sueros No. 1, No. 4 y No. 5 no se requirió de incubación y la aglutinación fue de 3+ a 4+ en las muestras D(Rh₀)-positivas, en las sangres D(Rh₀)-negativas la aglutinación siempre fue negativa aún después de realizar la técnica de Coombs para investigar el antígeno D^u (Anexo, Técnica No. 7). Lo cual fue corroborado con las determinaciones hechas con sueros comerciales. El antígeno D^{u44} fue demostrado en 4 sangres, con los sueros preparados.

TABLA No. 4 TITULO DE ANTI-D(Rh₀) EN LOS 5 SUEROS ANTES

DE LA ABSORCION DE ANTI-A Y ANTI-B

Suero No.	SALINA	ALBUMINA	BROMELINA	COOMBS
1	(-)	(-)	1:32	1:64
2	(-)	1:1	1:8	1:16
3	(-)	1:1	1:2	1:4
4	(-)	1:8	1:64	1:64
5	(-)	1:1	1:32	1:64

TABLA No. 5 TITULO DE ANTI-D(Rh₀) EN 5 SUEROS DESPUES DE LA ABSORCION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-A Y ANTI-B

Suero No.	ALBUMINA	BROMELINA	COOMBS	CRIOAGLUTININAS
1	(-)	1:16	1:64	(-)
2	(-)	1:8	1:16	1:4
3 ⁺	(-)	1:2	1:2	(-)
4 ⁺	1:2	1:32	1:64	(-)
5 ⁺	(-)	1:16	1:32	(-)

⁺ una absorción con eritrocitos congelados

V. RESUMEN

El control de calidad en los procedimientos del laboratorio clínico representa un aspecto de gran importancia. Resulta por tanto, obvia la exigencia de una calidad óptima en los sueros clasificadores y reactivos biológicos que se emplean en el Banco de Sangre. La mayoría de estos productos proceden de casas comerciales de reconocido prestigio internacional, sin embargo deben estar sujetos a un control estricto de calidad antes de ser utilizados; aún cuando en la metodología de inmunohematología se incluyen siempre controles positivos y negativos así como autocontroles.

Son frecuentes los reportes que aparecen en la literatura sobre la evaluación de sueros comerciales, resaltando en ellos, sorprendentemente, la variabilidad de sus resultados^{45,46,47,48,49}. De aquí la insistencia de la Asociación Americana de Bancos de Sangre⁵⁰ en el control de calidad que debe efectuarse en las pruebas de inmunohematología.

En nuestro país se suman otros factores que repercuten en

la calidad de los reactivos biológicos de importación; entre ellos, la conservación de los mismos en medio y temperatura adversos durante el tiempo que toman los trámites aduanales. Se hace, por tanto, indispensable poner al alcance de todo banco de sangre, sueros de referencia y control de calidad.

Los resultados del presente trabajo muestran que con los recursos mínimos de un banco de sangre es factible preparar, de acuerdo a las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud³⁵, un suero específico anti-D(Rh₀) que sirva de referencia.

Un suero con especificidad conocida y estandarizado, además de su utilidad como suero hemoclasificador, es el mejor control de calidad de aquellos reactivos biológicos como: la albúmina, las enzimas, el suero anti-gamma globulina humana (Coombs) y el "Panel" o Patrón Celular Reactivo entre otros; destinados a la demostración de anticuerpos IgG, que representan a la gran mayoría tratándose de anticuerpos dirigidos a antígenos de grupo sanguíneo.

Por otra parte, puede también emplearse como un control de

los procedimientos técnicos dirigidos a la investigación in vitro de los anticuerpos anti-eritrocíticos de la clase IgG.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos con 5 sueros anti-D(Rh₀) se demuestra lo siguiente:

- 1) Aún con títulos de anticuerpos relativamente bajos (1:64) se logra obtener sueros específicos con potencia y avidez comparables con los de los sueros comerciales*.
- 2) La absorción de anticuerpos anti-A y anti-B se realiza fácilmente y en forma completa, con eritrocitos "frescos" al igual que con eritrocitos congelados, aún cuando con los glóbulos rojos formalinizados y con estroma de glóbulos rojos se logra una buena absorción, no es recomendable debido al marcado color oscuro que presentan los sueros después de la absorción.
- 3) Los sueros pueden conservarse congelados sin perder su potencia y avidez, por lo menos durante 12 meses.

*Suero clasificador de sangre (humano) anti-D(Rh₀) Hyland.

- 4) Ante la facilidad para obtener suero anti-D(Rh₀) específico, de individuos ya inmunes, aunada al hecho de que no se requieren procedimientos especiales para su estabilización y conservación es recomendable su utilización con el propósito de contar con un suero conocido como referencia y control de calidad de la mayoría de los reactivos biológicos empleados en el banco de sangre.

A N E X O

TECNICA No. 1 TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-A

- La obtención de la sangre fue por punción venosa, la cual se colocó en tubos de 13 por 100 mm sin anticoagulante.
- Preparar una suspensión al 2 % de eritrocitos grupo A lavados previamente con solución salina isotónica, tres veces.
- Numerar 10 tubos de 12 por 75 mm del 1 al 10.
- Colocar 0.1 ml de solución salina isotónica a cada uno de los tubos, a partir del No. 2.
- Adicionar 0.1 ml del suero en estudio al tubo No. 1 y 0.1 ml al tubo No. 2, mezclar y transferir 0.1 ml al tubo No. 3 y así sucesivamente hasta el tubo No. 10, del cual se desechan los

0.1 ml restantes.

- Agregar a todos los tubos dos gotas de la suspensión de eritrocitos.
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Centrifugar 30 segundos y leer.

TECNICA No. 2 INVESTIGACION E IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS CON EL "PANEL" O PATRON CELULAR REACTIVO

El "Panel" consiste en un número variable de muestras de sangre, todas ellas del grupo 0, con diferencias en los antígenos de los demás grupos sanguíneos. En este estudio se utilizó "Panel" del Banco de Sangre del Instituto Nacional de la Nutrición y "Panel" de Ortho Diagnostics.

Las muestras del "Panel" del Banco de Sangre del INN se mantienen congeladas. Para preservar los eritrocitos de la hemólisis al congelarlos, se suspenden en una mezcla de glicerol-fosfato, por lo que se deben descongelar y eliminar el glicerol antes de utilizarlas.

2.1 Preparación de las muestras del "Panel"

- Descongelar las muestras a temperatura ambiente y colocarlas en bolsas de diálisis.

- Dializar en volumen suficiente de solución salina isotónica durante período mínimo de 2 horas.

- Pasar el contenido de cada bolsa a tubos de 13 por 100 mm los cuales se marcan con el número de la muestra correspondiente.

- Lavar los eritrocitos con solución salina isotónica las veces necesarias para eliminar la

hemoglobina libre en el sobrenadante.

- Los eritrocitos de las muestras una vez lavados y libres de hemólisis pueden ser empleados inmediatamente o guardarse en el refrigerador suspendidos en salina a una concentración aproximada del 2 % durante un máximo de una semana.

2.2. Empleo de las muestras del "Panel"

La investigación e identificación de anticuerpos se realiza mediante las técnicas en medio salino, con alto contenido protéico, con bromelina y por Coombs (anti-gamma globulina humana), incluyendo en cada uno controles positivos y negativos.

- Marcar tres hileras de tubos de 10 por 75 mm con el número correspondiente a la muestra del "Panel".

2.3. En albúmina -bromelina

- Colocar en los tubos de la primera hilera dos gotas de eritrocitos de la muestra del "Panel", al tubo testigo positivo dos gotas de la muestra cuyo fenotipo sea DCcee y al control negativo dos gotas de la muestra cuyo fenotipo sea ccee.

- Adicionar dos gotas del suero en estudio a cada uno de los tubos, excepto en los controles en los cuales se coloca dos gotas de suero anti-D diluído 1:10 en solución salina isotónica.

- Agregar dos gotas de albúmina y dos gotas de bromelina a todos los tubos, incluyendo los testigos, mezclar e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar 15 segundos a 1000 rpm y leer macroscópicamente agitando suavemente cada uno de los tubos.

2.4. En medio salino y con suero anti-gamma globulina humana (Coombs)

- Colocar dos gotas de la suspensión de eritrocitos a los tubos correspondientes en la segunda hilera, en los tubos testigo colocar dos gotas de las mismas muestras usadas en la técnica de bromelina.

- Adicionar dos gotas del suero en estudio a cada uno de los tubos excepto a los controles a los cuales se agrega dos gotas de suero anti-D diluído 1:10 en solución salina.

- Centrifugar a 1000 rpm durante 30 segundos.

- Hacer la lectura macroscópica, agitando suavemente cada uno de los tubos.

- Incubar los eritrocitos de los tubos cuyo resultado sea negativo (no aglutinación), durante una hora a 37°C.

- Centrifugar durante 30 segundos a 1000 rpm, realizar la lectura macroscópica que corresponde a la prueba en salina a 37°C.
- Lavar los eritrocitos de los tubos cuya lectura en salina sea negativa, con solución salina, eliminándola en el último lavado perfectamente.
- Agregar al paquete de eritrocitos dos gotas de Coombs.
- Centrifugar durante 30 segundos a 1000 rpm y efectuar la lectura macroscópica.

2.5. En medio con alto contenido protéico

- En la tercera hilera de tubos, colocar dos gotas de eritrocitos de la muestra correspondiente del "Panel" y a los tubos testigo colocar mismas muestras que la técnica de bromelina.

- Adicionar dos gotas del suero en estudio a cada uno de los tubos, excepto a los testigo a los cuales se agrega dos gotas de suero anti-D diluido 1:10 en solución salina.

- Adicionar dos gotas de albúmina al 30 % a todos los tubos, mezclar y centrifugar durante 30 segundos a 1000 rpm y efectuar la lectura macroscópica.

- Incubar los tubos cuyo resultado sea negativo durante una hora a 37°C.

- Centrifugar 30 segundos a 1000 rpm y hacer la lectura macroscópica.

2.6. Interpretación

La aglutinación en presencia del suero indica la existencia de anticuerpo(s) hacia eritrocitos humanos.

La especificidad de éste o éstos se determina al comparar el resultado con la tabla del "Panel" usado. Estas tablas registran los antígenos presentes como (+) y ausentes como (-) o (0).

TECNICA No. 3 TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-D(Rh₀)

Emplear eritrocitos del grupo 0 con fenotipo DC_{ce}, lavados tres veces y suspendidos al 2 % en solución salina isotónica.

- Numerar tres hileras de tubos de 10 por 75 mm del 1 al 10.
- Colocar 0.3 ml de solución salina en cada uno de los tubos de la primera hilera a partir del No. 2.
- Adicionar 0.1 ml de suero en estudio a los tubos

No. 1 de cada hilera y 0.3 ml al tubo No. 2 de la primera hilera, mezclar bien y transferir 0.3 ml al tubo No. 3 y así sucesivamente hasta el tubo No. 10 del cual se desechan los últimos 0.3 ml. Colocar 0.1 ml de la dilución del tubo No. 10 de la primera hilera a los tubos No. 10 de la segunda y tercera hilera, limpiar bien las paredes externas de la pipeta y colocar 0.1 ml de la dilución del tubo No. 9 de la primera hilera a los tubos No. 9 de la segunda y tercera hilera y continuar así hasta el tubo No. 2

3.1. En albúmina-bromelina

- Adicionar dos gotas de la suspensión de eritrocitos a los tubos de la primera hilera.
- Adicionar a cada uno de los tubos dos gotas de albúmina y dos gotas de bromelina.

- Incubar 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugar durante 15 segundos a 1000 rpm.
- Hacer la lectura macroscópica.

3.2. En medio salino y con suero anti-gamma globulina humana (Coombs)

- Colocar en cada uno de los tubos de la segunda hilera dos gotas de la suspensión de eritrocitos.
- Centrifugar 30 segundos a 1000 rpm.
- Leer macroscópicamente agitando suavemente cada uno de los tubos.
- Incubar los eritrocitos de los tubos cuyo resultado sea negativo durante una hora a 37°C.
- Centrifugar 30 segundos a 1000 rpm y hacer la

lectura macroscópica, los tubos en donde no haya aglutinación se lavan tres veces con solución salina, eliminándola perfectamente en la última lavada.

- Adicionar dos gotas de suero anti-gamma globulina humana (Coombs).
- Centrifugar 30 segundos a 1000 rpm y hacer la lectura macroscópica.

3.3. En medio con alto contenido protéico

- Adicionar dos gotas de la suspensión de eritrocitos a los tubos de la tercera hilera.
- Agregar a cada uno de los tubos dos gotas de albúmina.
- Centrifugar 30 segundos a 1000 rpm y hacer la

lectura macroscópica.

TECNICA No. 4 CONSERVACION DE GLOBULOS ROJOS CONGELADOS

4.1 Preparación de glicerol-fosfato-citrato

Citrato tripotásico --- 3.25 % en agua dest. ---- 20 cc.
($K_3C_6H_5O_7$)

Fosfato dibásico de
potasio --- 0.60 % en agua dest. ---- 20 cc.
(K_2HPO_4)

Fosfato dibásico de
potasio --- 0.47 % en agua dest. ---- 20 cc.
(KH_2PO_4)

Glicerol ----- 40 cc.

4.2 Congelamiento de los glóbulos rojos

- Tomar la sangre en bolsas cuyo volumen es de 500 cc y que contienen 75 cc de ACD (Acido cítrico-citrato de sodio-dextrosa) como anticoagulante.
- Dejar reposar en el refrigerador la bolsa durante 24 horas, con el objeto de que sedimente el paquete celular.
- Separar la mayor cantidad posible de plasma.
- Adicionar al paquete celular un volumen igual de glicerol-fosfato-citrato, mezclar bien hasta homogenizar.
- Separar en alícuotas de 50 a 75 ml en bolsas pequeñas.
- Congelar cada una de las bolsas en una mezcla de

hielo seco-acetona y conservarlas en el congelador hasta el momento de usarlas.

4.3. Preparación de los glóbulos rojos

- Para su uso, los eritrocitos deben descongelarse a temperatura ambiente y dializarse en solución salina isotónica durante 24 horas, manteniéndose a 4°C durante este período y cambiando la solución salina previamente enfriada, por lo menos dos veces.
- Pasar el contenido de cada bolsa a tubos de 15 por 125 mm.
- Lavar los eritrocitos con solución salina isotónica las veces necesarias para eliminar la hemoglobina libre en el sobrenadante, eliminando en el último lavado la mayor cantidad posible de solución salina, el paquete celular debe ser usado

inmediatamente.

TECNICA No. 5 DETERMINACION DE CRIOAGLUTININAS

- Numerar 10 tubos de ensaye de 10 por 75 mm del 1 al 10.
- Colocar 0.75 ml de solución salina en el tubo No. 1 y 0.5 ml en cada uno de los tubos restantes.
- Adicionar 0.25 ml del suero en estudio en el tubo No. 1, mezclar y transferir al siguiente tubo 0.5 ml, continuar en esta forma hasta el tubo No. 10 del cual se descartan 0.5 ml.
- Adicionar dos gotas de eritrocitos propios del suero en estudio, lavados tres veces con solución salina y suspendidos al 2 %.

- Estudiar en forma similar y simultáneamente una sangre normal (suero y eritrocitos).
- Poner los tubos en un vaso de precipitados con hielo y dentro del refrigerador durante 24 horas.
- Hacer la lectura macroscópica agitando suavemente cada uno de los tubos (sin centrifugar).

TECNICA No. 6 DETERMINACION DEL FACTOR D(Rh₀) EN TUBO

- Colocar una gota del suero anti-D(Rh₀) en tubo de 10 por 75 ml.
- Adicionar con un aplicador los eritrocitos en estudio hasta una concentración del 5 %.
- Mezclar y centrifugar durante un minuto a 1200 rpm.

- Hacer la lectura macroscópica. Si hay aglutinación los eritrocitos son D(Rh₀)-positivos.
- Si no hay aglutinación incubar 30 minutos a 37°C.
- Centrifugar durante 30 segundos a 1200 rpm y leer, si hay aglutinación los eritrocitos son D(Rh₀)-positivos.

TECNICA No. 7 DETERMINACION DEL FACTOR D^u

- Si el resultado es negativo en la técnica anterior, lavar los eritrocitos tres veces con solución salina isotónica, eliminándola bien en el último lavado.
- Adicionar dos gotas de suero anti-gamma globulina humana (Coombs) al paquete celular.
- Centrifugar durante 30 segundos a 1200 rpm.

- Hacer la lectura macroscópica agitando suavemente el tubo.

7.1 Interpretación

Si es positiva la aglutinación en el último paso se trata del factor D^u , si no hay aglutinación los eritrocitos son negativos para el factor $D(Rh_0)$.

B I B L I O G R A F I A

1. Fisk, R. T. and Foord, A. G. Observations on the Rh agglutinin of human blood. *Amer. J. Clin. Path.* 12:545, 1942.
2. Murray, J. and Clark, E. C. Production of anti-Rh in guinea pigs from human erythrocyte extracts *Nature* 169:886, 1952.
3. Levine, P., Celano, M., Fenichel, R., Pollack, W., and Singher, H. A "D-like" antigen in Rhesus monkey, human Rh-positive and human-negative red blood cells. *J. Immunol.* 87:747, 1961.
4. Levine, P., Celano, M. J. Wallace, J. and Sanger, R. A human "D-like" antibody. *Nature* 198:596, 1963.
5. Levine, P., Stetson, K. E. and unusual case of intragroup agglutination, *JAMA* 113:126, 1939.
6. Camero, J. W. and Diamond, L. K. Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. *J. Clin. Invest.* 24: 793, 1945.
7. Diamond, L. K., Denton, R. L. Rh agglutination in various media with particular reference to the value of albumin. *J. Lab. Clin. Med.* 30:821, 1945.

8. Lewis M. and Chown, B. A short albumin method for the demonstration of iso-hemagglutinins, particularly incomplete Rh antibodies. *J. Lab. Clin. Med.* 50:494, 1957.
9. Green, F. A. Erythrocyte membrane sulphydryl groups and Rh antigen activity. *Immunochem.* 4:247, 1967.
10. Gree, F. A. Phospholipid requirement for Rh antigenic activity. *J. Biol. Chem.* 243:5519, 1968.
11. Dodd, M. C., Bigley, N. J. and Gener, V. B. Further observations on the serologic specificity of sialic acid for Rh₀(D) antibody. *J. Immunology.* 90:518, 1963.
12. Dodd, M. C., Bigley, N. J., Johnson, G. A., and McCluer, R. H. Chemical aspects of inhibition of Rh₀(D) antibody. *Nature* 204:549, 1964.
13. Lubinski, H. H., and Portnuff, J. C. The influence of heat and formalin on the Rh agglutinin. *J. Lab. Clin. Med.* 32:178, 1947.
14. Landsteiner, K., and Wiener, A. S. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 43:223, 1940.

15. Landsteiner, K., Wiener, A. S. Studies on an agglutinin (Rh) in human blood reacting with anti-Rhesus sera and with human isoantibodies. *J. Exp. Med.* 74:309, 1941.
16. Fisher, R. A. cited by Race, R. R. An incomplete antibody in human serum. *Nature* 153:771, 1944.
17. Race, R. R., Taylor, G. L., Cappell, D. F. and McFarlane, M. N. Recognition of a further common Rh genotype in man. *Nature* 153:52, 1944.
18. Race, R. R., Taylor, G. L., Ikin, E. W. and Prior, A. M. The inheritance of allelomorphs of the Rh gene in fifty-six families. *Ann. Eugen.* 12:206, 1944.
19. Race, R. R., Mourant, A. E., Lawler, S. D. and Sangel, R. The Rh chromosome frequencies in England. *Blood* 3:689, 1948.
20. Wiener, A. S., Sonn, E. B. and Belkin, R. B. Heredity of the Rh blood types. *J. Exp. Med.* 79:235, 1944.
21. Wiener, A. S., Davidsohn, I. and Potter, E. I. Heredity of the Rh blood types. II. Observations on the relation of factor Hr to the blood types. *J. Exp. Med.* 81:63, 1945.

22. Wiener, A. S. The blood groups. Three fundamental problems, serology, genetics and nomenclature. *Blood* 27:110, 1966.
23. Mollison, P. L. The investigation of haemolytic transfusion reactions. *Brit. Med. J.* 1:529, 1943.
24. Diamond, L. K. Erythroblastosis foetalis or haemolytic disease of the newborn. *Proc. Roy. Soc. Med.* 40:546, 1947.
25. Pollack, W., Ascari, W. Q., Kochesky, R. S., O'Connor R. R., and Tripoli, D. Studies on Rh prophylaxis. I. Relationship between doses of anti-Rh and size of antigenic stimulus. *Transfusion* 11:333, 1971.
26. Pollack, W., Ascari, W. Q., Crispin, J. F., O'Connor, R. R. and Ho, T. Y. Studies on Rh prophylaxis. II. Rh immune prophylaxis after transfusion with Rh positive bloods. *Transfusion* 2:340, 1971.
27. Davey, M. G., Campbell, A. L. and James, J. Some consequences of hyperimmunization to the Rhesus (D) blood group antigen in man. (abstract) *Proc. Austr. Soc. Immunol. Adelaide. Dec.*, 1969.
28. Gunzon, H. H., Stratton, F. and Cooper, D. G. Primary immunization of Rh-negative volunteers. *Brit. Med. J.* 1:593, 1970.

29. Woodrow, J. C., Finn, R. and Krevans, J. R. Rapid clearance of Rh positive blood during experimental Rh immunization. *Vox Sang.* 17:349, 1969.
30. Mollison, R. L., France, M. and Ross, M. E. Differences between Rh(D) antigen Brit. J. Haemat. 19:257, 1970.
31. Gunson, H. H. Combined Rh and ABO haemolytic disease of the newborn. *Amer. J. Clin. Path.* 27:35, 1957.
32. Zipursky, A., Pollack, J., Neelands, P., Chown, B., Israels, L. The transplacental passage of foetal red blood cells and the pathogenesis of Rh immunization during pregnancy. *Lancet* 2:489, 1963.
33. Cohen, F., Zulzer, W., Gustafson, D. C., Evans, M. Mechanisms of immunization I. The transplacental passage of fetal erythrocytes in homospecific pregnancies. *Blood* 23:621, 1964.
34. Chown, B. Anaemia from bleeding of the foetus into mothers circulation. *Lancet* 1:1213, 1954.
35. Bowley, C. C., Goldsmith, K. L. G., and Maycock, W. d'A. Blood Transfusion. A guide to the formation and operation of a transfusion service. WHO 102, 1971.

36. Goudemand, M. and Delmas-Marselet, Y. Principles of Immunohematology. 1th edn. Ann Arbor Science. Ann Arbor, 1975, 223.
37. Gold, E. R., Lockyer, W. J. and Tovey, A. G. use of liophilized formal-treated red cells in blood-group serology. Nature 182:951, 1958.
38. Kidd, R. Elution of an incomplete type of antibody from erithrocytes in acquire haemolytic anaemia. J. Cli. Path. 2:103, 1949.
39. Pirofsky and Melvin E. M. Use of bromelin to demonstrate erythrocyte antibodies. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 101:40, 1959.
40. Coombs, R. R. A., Mourant, A. E. and Race, R. R. A new test for detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Brit. J. Exp. Path. 26:255, 1945.
41. Mollison, R. L. Blood Transfusion in Clinical Medicine. 5th ed. Balckwell Scientific Publications, Oxford, 1974. 391.
42. Weiner W. Reconstitution of frozen red cells. Lancet 1:1264, 1961.
43. Batson, H. C., Jayne, M. and Brown, M. Preservation of Rh agglutinating antiserum with sodium azide. J. Lab. Clin. Med. 35:297, 1950.

44. Rosenfield, R. E., Vogel, P., Miller, E. B. and Haber, G. Weakly reacting Rh positive (D^u) bloods. 6:1123, 1951.
45. Howard, P. L. and Dopp, S. L. The composition of several commercial rapid tube and saline anti-D reagents. Transfusion 14:270, 1974.
46. Greendyke R. M. and Banzhaf, J. C. Comparison of commercial blood bank antisera. Transfusion 13:297, 1973.
47. Issitt, P. D., Issitt, C. H. and Wilkinson, S. L. Evaluation of commercial antiglobulin sera over a two year period. Part I. Anti-beta 1A anti-alpha 2D and anti-beta 1E levels. Transfusion 14:93, 1974.
48. Issitt, P. D., Issitt, C. H. and Wilkinson, S. L. Evaluations of commercial antiglobulin sera a two year period. Part II. anti-IgG and anti-IgM levels and underisable contaminating antibodies. Transfusion 14:103, 1974.
49. Good practice for the collection and preparation of blood components for transfusion organizations WHO 11, 1976.
50. Borucki, D. T., and Heustess M. B. Quality control in the blood bank. In quality control in blood banking. American Associations of Blood Banks, 1, 1970.

Esta Tesis se Imprimió en Julio de 1977
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 531 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-21-05 y 536-57-54 México 12, D. F.