

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN DE TESIS
FACULTAD DE QUIMICA

**Elaboración y control de calidad de la
Antiglobulina Humana (Suero de Coombs)
por varios métodos**

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N

JOSE LUIS GIL REYNOSO
ALFREDO DEL RIO PARRA

1 9 8 2



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.

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	
CAPITULO I	
Historia	2
CAPITULO II	
Prueba de Coombs	11
Prueba directa de Coombs	12
Prueba indirecta de Coombs	14
Reacción de Consumo de la antiglobulina humana	15
Aplicaciones de la prueba de Coombs	15
CAPITULO III	
Plan de trabajo	21
C A P I T U L O I V	
Material y métodos	24
Método de Proom	25
Método de Cohn	26
Evaluación electroforética de los - antígenos.	30
Determinación de Proteínas totales	31
Esquemas de inmunización	36
Evaluación de los suero hiperinmunes antiglobulínicos.	38
Inmunolectroforesis	38

Purificación de los sueros hiperinmunes.	42
--	----

C A P I T U L O V

Resultados	47
Evaluación electroforética de los antígenos	47
Determinación de Proteínas Totales	48
Prueba de potencia de los sueros hiperinmunes	50
Gráfica # 1	52
Determinación de los puntos de equivalencia de los sueros de Coombs.	55
Gráfica # 2	59
Pruebas de control de calidad de los sueros de Coombs.	61
Prueba de Coombs con subgrupos del sistema Rh	62
Gráfica # 3a.	65
Gráfica # 3b.	68
Prueba de Coombs para la detección de eritrocitos sensibilizados con suero anti-Lewis ^a .	70
Gráfica # 4a.	73
Gráfica # 4b.	74

C A P I T U L O VI.

Conclusiones	75
Bibliografía	76

ELABORACION Y CONTROL
DE CALIDAD DE LA ANTI
GLOBULINA HUMANA (SUE
RO DE COOMBS) POR VA
RIOS METODOS.

O B J E T I V O :

A).- Preparar una antiglobulina humana (Suero de Coombs), de acuerdo a los métodos descritos originalmente por Coombs, Mourant y Race, para comparar las características de los sueros obtenidos a partir de dos fracciones globulínicas preparadas por diferentes métodos.

B).- Confirmar la efectividad y confiabilidad de los sueros antiglobulínicos humanos obtenidos, con muestras proporcionalmente y controladas por el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría (DIF).

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

En la actualidad vemos que debido al desarrollo y progreso de las técnicas de laboratorio para la detección y prevención de diversas enfermedades, éstas se han ido mejorando haciéndose más sensibles y específicas, de aquí partimos para realizar el trabajo que a continuación exponemos. El método de la antiglobulina humana (suero de Coombs), desarrollado en 1945, tiene amplias aplicaciones prácticas dentro de algunos campos como la Microbiología; por ejemplo en el diagnóstico de algunas enfermedades virales donde se emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta, para la cual, se utiliza un anticuerpo de especie previamente marcado con una sustancia fluorescente contra los anticuerpos que se investigan.

La prueba de la antiglobulina humana tiene también una gran importancia en la Inmunología de Inmunohematología, en donde podemos mencionar el diagnóstico de enfermedades como la Eritroblastosis fetal, que es producida por un isoanticuerpo contra el factor Rh sanguíneo de los eritrocitos del recién nacido.

Sin duda alguna, la aplicación más importante de la prueba de Coombs, que se hace de manera rutinaria en el banco de sangre, es cuando se efectúan las pruebas cruzadas de donadores y receptores, para detectar los tipos de realidad

son compatibles.

Finalmente podemos mencionar el uso de la prueba de la antiglobulina humana en campos como la Química Legal, para casos de paternidad, ya que se pueden investigar tanto en el padre, como en el hijo algunos antígenos de superficie de los eritrocitos, que se detectan solo mediante la prueba de la antiglobulina de Coombs.

Debido a la gran importancia y a las amplias aplica--
ciones de la prueba de la antiglobulina humana para el diagnósti
tico y prevención de enfermedades, nos propusimos llevar a ce
bo ésta investigación, como tema de tesis profesional. Además
de considerar que podría ser un esfuerzo útil para el país. -
reduciendo nuestra dependencia científica y tecnológica.

C A P I T U L O I

GENERALIDADES:

HISTORIA.- Aunque Moreschi, en 1908 fué el primero en establecer el principio de la prueba de la antiglobulina - - (1, 2.), fueron Coombs, Mourant y Race, en 1945 los primeros en emplearla para la detección de aglutininas Rh incompletas o débiles.

Originalmente, se pretendió usar la prueba como un método de investigación, con referencia especial al efecto de aglutininas débiles o incompletas del factor Rh, las cuales - en muchos casos provocaban la sensibilización de eritrocitos humanos con el antígeno correspondiente, produciendo cuadros patológicos como la enfermedad hemolítica del recién nacido

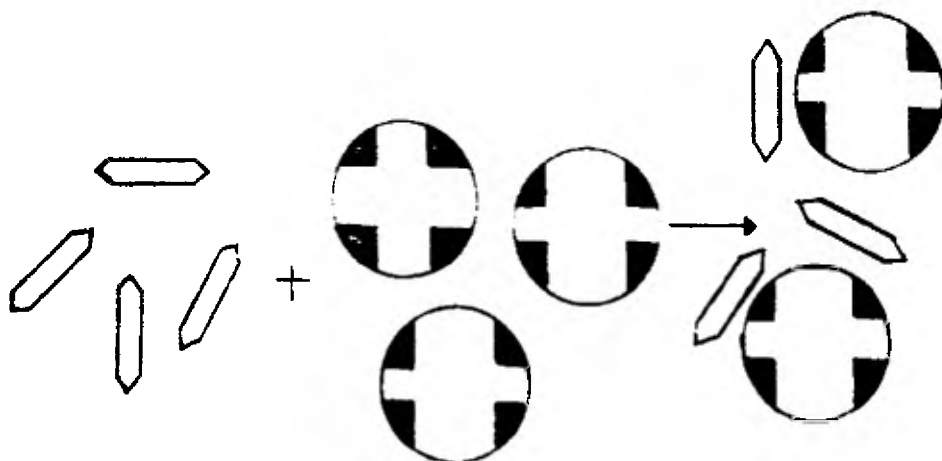
y reacciones postransfusionales.

Wiener y Peters (1944 - 1945), postularon que los cuadros clínicos mencionados eran debidos a un proceso de isoimmunización; sin embargo los isoanticuerpos responsables no podían ser detectados mediante una reacción visible "in vitro", en éste caso por una hemaglutinación. La razón de esto era: - que los isoanticuerpos por ser "incompletos o univalentes" (IgG) no podían producir la hemaglutinación, la cual se manifestaba cuando el anticuerpo era una aglutinina Rh completa (IgM).

La prueba de Inhibición o bloqueo ideado por Wiener - en 1944, era, por consiguiente el único método para poder detectar éste tipo de anticuerpo. La prueba consistía en sensibilizar eritrocitos con anticuerpos (IgG) anti - Rh (D), para posteriormente ser tratados con un anticuerpo IgM homólogo, la hemaglutinación no se producía ya que la acción del primer anticuerpo "bloqueaba" la acción del segundo; por cubrir los sitios antigénicos de los eritrocitos Rh (D) positivos.

ESQUEMA DEL METODO DE WIENER (1944).





Anticuerpos (IgM)
anti - Rh (D)

Eritrocitos
humanos sen
sibilizados.

Acción de
"bloqueo".

En 1945 Wiener publicó un método para detectar las aglutininas (IgG) anti - Rh (D), que se diferenciaba de los métodos ordinarios de aglutinación en la sustitución de la solución salina isotónica como diluyente de la prueba, por plasma o suero humano compatible. Es decir, la suspensión de eritrocitos era ajustada a una concentración del 2% empleando como diluyente suero o plasma humano. Más aún, el suero probado para la detección de aglutininas (IgG) anti - Rh (D) podía ser usado sin diluir o bien diluido con suero o plasma humano, para el caso de la titulación. Wiener propuso el nombre de conglutinación para ésta prueba, con el propósito de dis-
tinguirla de la prueba de aglutinación ordinaria.

Sin embargo, Coombs en 1945 argumentó que ésta terminología no debía ser empleada en la prueba de Wiener dado que, de acuerdo con Dean (1911), el término conglutinación se refe

ría a la reacción producida cuando se agregaban coloides bovinos (conglutininas) a eritrocitos tratados con sueros homólogos descomplementarizados. Más aún las conglutininas solo habían sido demostradas en los sueros de rumiantes.

En lugar de un suero hiperinmune preparado por la inmunización de un animal con eritrocitos humanos como inmunógeno, se podía emplear un suero humano normal que tuviera aglutininas naturales para los eritrocitos humanos.

Por otra parte, la coaglutinación se presentaba cuando un antígeno y un anticuerpo homólogos, bajo condiciones apropiadas aglutinaban eritrocitos de otras especies animales (1, 2, 3).

En 1945 Coombs y cols. al trabajar con suero antiglobulínico humano preparado en conejos, con eritrocitos sensibilizados por un anticuerpo globulínico incompleto, observaron que se producía una hemaglutinación fresca o ausencia de esta al emplear eritrocitos humanos lavados, no sensibilizados. El método originalmente descrito por Coombs, y cols., es el siguiente:

Se ponían dos gotas de una suspensión de eritrocitos humanos Rh (D) positivos en un tubo de ensayo, conteniendo un volumen igual de suero humano en estudio; que podía ser fresco o calentado a 56°C. de 30 a 60 minutos, también se emplea-

ban sueros controles negativos, los cuales no deberían tener aglutininas (IgG) Rh específicas contra los eritrocitos de prueba, así como un control constituido por dos gotas de solución salina isotónica. El tubo problema y los controles negativos se incubaban a 37 °C, de 30 a 60 minutos, tomando después una pequeña muestra con una pipeta Pasteur, la cual se observaba microscópicamente; si existía hemaglutinación, la prueba de la antiglobulina humana no se llevaba a cabo. Sin embargo, la ausencia de hemaglutinación indicaba dos posibilidades: primero, que el suero en estudio fuese compatible con los eritrocitos humanos probados; segundo, que el suero problema tuviera aglutininas demasiado débiles o incompletas, por lo que no eran detectadas por una reacción de hemaglutinación.

Para excluir estas dos últimas posibilidades se llevaba a cabo la prueba de la antiglobulina humana. Los eritrocitos no aglutinados en el primer paso, eran lavados tres veces con solución salina isotónica, después, se preparaba una suspensión final de eritrocitos no aglutinados al 2%. A ésta última se añadía un volumen igual de una dilución apropiada de suero antiglobulina humana (previamente inactivado a 56 °C de 30 a 60 minutos y absorbido con eritrocitos humanos tipo A, B y O). Esto se hacía para asegurar que el suero hiper-inmune a la dilución empleada, no tuviera aglutininas inespecíficas contra los eritrocitos empleados en la prueba. Después de un período de incubación a 37 °C., durante 30 a 60 minutos, los

tubos se leían macroscópicamente para ver la hemaglutinación.

En ese mismo año de 1945, Coombs, y cols., postularon que mediante el empleo de éste método se podía demostrar la sensibilización "in vivo" de los eritrocitos de niños con padecimientos hemolíticos, aún cuando no se hubiesen demostrado eglutininas libres en sus sueros, siendo necesario para ello exponer los eritrocitos sensibilizados por el isoanticuerpo anti-Rh, al suero antiglobulínico humano (1, 2).

Posteriormente Diamond y Abelson en 1945 mediante el uso de la antiglobulina humana, comunicaron la existencia de formas incompletas de eglutininas anti-C, anti-E, anti- \bar{C} , anti- \bar{E} .

El uso de la antiglobulina humana permitió la detección de otros sistemas antígeno - anticuerpo, en los que por diversas circunstancias, la reacción de sensibilización, no se observaba. Por ejemplo, Levine y Gilmore, en 1945 reportaron la existencia de eglutininas incompletas (IgG) anti-eritrocitos de carnero encontradas en casos de mononucleosis infecciosa.

En 1947 Coombs y cols., establecieron definitivamente que el método de la antiglobulina humana empleado para la detección de anticuerpos (IgG) anti - Rh, era una reacción espe

cífica antígeno-anticuerpo entre la antiglobulina humana y la globulina humana adsorbida a los eritrocitos Rh (D) positivos. Demostraron también que el anticuerpo presente en el suero del conejo inmunizado; el cual aglutinaba células sensibilizadas con el anticuerpo (IgG) anti-Rh (D), era un anticuerpo anti- γ -globulínico humano. Y que el anticuerpo (IgG) anti-Rh (D) estaba presente en la γ -globulina humana. Los autores sugirieron desde entonces que tal vez, pequeñas cantidades del anticuerpo (IgG) están contenidas en las globulinas α y β .

Las conclusiones anteriores fueron el resultado de los siguientes experimentos.

Cuando se trataron con sulfato de amonio sueros humanos completos que contenían el anticuerpo (IgG) anti-Rh (D), se encontró que el precipitado obtenido con un 33% de saturación, contenía una gran cantidad de γ -globulinas, y por consiguiente, la mayor parte del anticuerpo (IgG) anti-Rh (D), mientras que el precipitado obtenido entre el 33 y el 50% de saturación con sulfato de amonio, contenía una mayor cantidad de α y β y que en menor grado γ -globulinas. Este último precipitado una vez resuspendido, no sensibilizaba a los eritrocitos Rh (D) positivos tan fuertemente como lo hacía el primero.

En otro experimento, se observó, sorprendentemente que

un suero hiperinmune anti-albúmina humana preparado por el método de Cohn era capaz de producir la aglutinación de eritrocitos sensibilizados con el anticuerpo (IgG) anti Rh (D). Aparentemente el suero anti-albúmina humana era capaz de reaccionar inmunológicamente con el anticuerpo (IgG o anti-Rh (D)).

Para excluir lo anterior, se efectuó el siguiente experimento: se prepararon varios sueros hiperinmunes por inmunización a conejos con los diversos componentes protéicos de un suero humano: albúmina, α , β y γ - globulinas, los que fueron obtenidos por el fraccionamiento protéico de un suero humano total, ésto involucra procesos físicos y químicos, por ejemplo, la precipitación con sales, precipitación con solventes miscibles en agua, como el etanol, y electroforesis (1, 3, 8). Se siguió un esquema de inmunización aplicando cinco inyecciones con dosis de 0.1 mg. de proteínas administradas intraperitonealmente a intervalos de 4 días.

LOS SUEROS HIPERINMUNES

Fueron inactivados a 56°C de 30 a 60 minutos y luego absorbidos con eritrocitos humanos A. B. O. para usarlos en la prueba de neutralización frente a sus respectivas fracciones protéicas; albúmina, α , β y γ -globulinas, con el propósito de ver si eran específicos. Las cantidades equivalentes de los sueros hiperinmunes, fueron determinadas por

el método de proporciones óptimas, usando cantidades constantes de anticuerpo (1, 8, 12).

Del experimento anterior se vió que los sueros hiperinmunes preparados contra las diferentes fracciones protéicas humanas resultaban no ser absolutamente específicos frente a sus respectivas fracciones, además se vió que la neutralización de los sueros hiperinmunes con albúmina humana no afecta el título de la aglutinación de los eritrocitos de prueba sensibilizados con anticuerpos (Ig) anti-Rh (D). Sin embargo, la neutralización de los sueros hiperinmunes con las diferentes fracciones globulínicas γ , α y β en ese orden, no modificaban la capacidad para aglutinar los eritrocitos de prueba. Que demostró lo postulado por Coombs y cols. (3).

Posteriormente, en 1948, mediante la aplicación del método de la antiglobulina humana se pudo demostrar que la hemoglobinuria paroxística al frío, era debida a un auto-anticuerpo (IgG), denominado anticuerpo de Donath-Landsteiner, (6, 9).

C A P I T U L O II

PRUEBA DE COOMBS.

La prueba de la antiglobulina humana puede efectuarse en sus dos formas conocidas, la prueba directa de Coombs - (PDC) y la prueba indirecta de Coombs (PIC).

En primer lugar debemos tener en cuenta que la mayoría de los anticuerpos humanos denominados incompletos univalentes o bloqueantes, son de naturaleza globulínica de la clase (IgG). Si recordamos que la entrada de una proteína extraña (antígeno), a un individuo inmunocompetente provoca la producción de un anticuerpo específico contra ese antígeno, el anticuerpo producido radicará en la fracción globulínica del suero o plasma, de modo que cuando el antígeno y el anticuerpo se mezclan en proporciones adecuadas se producirá una reac

ción. Esta puede ser una hemaglutinación, si el antígeno es un factor sanguíneo existente en la superficie de los eritrocitos y el anticuerpo es capaz de reaccionar a él. Sin embargo, muchos anticuerpos no producen hemaglutinación en medio salino, aún en presencia de sus antígenos; eritrocitos específicos. En segundo lugar, si añadimos un anticuerpo antiglobulínico los eritrocitos humanos sensibilizados (revestidos) con anticuerpo (IgG) producirá la aglutinación de dichos eritrocitos. En otras palabras, el suero antiglobulínico humano es en realidad un suero hiperinmune que reacciona con el anticuerpo globulínico humano que se halla recubriendo la superficie de los eritrocitos ya descritos.

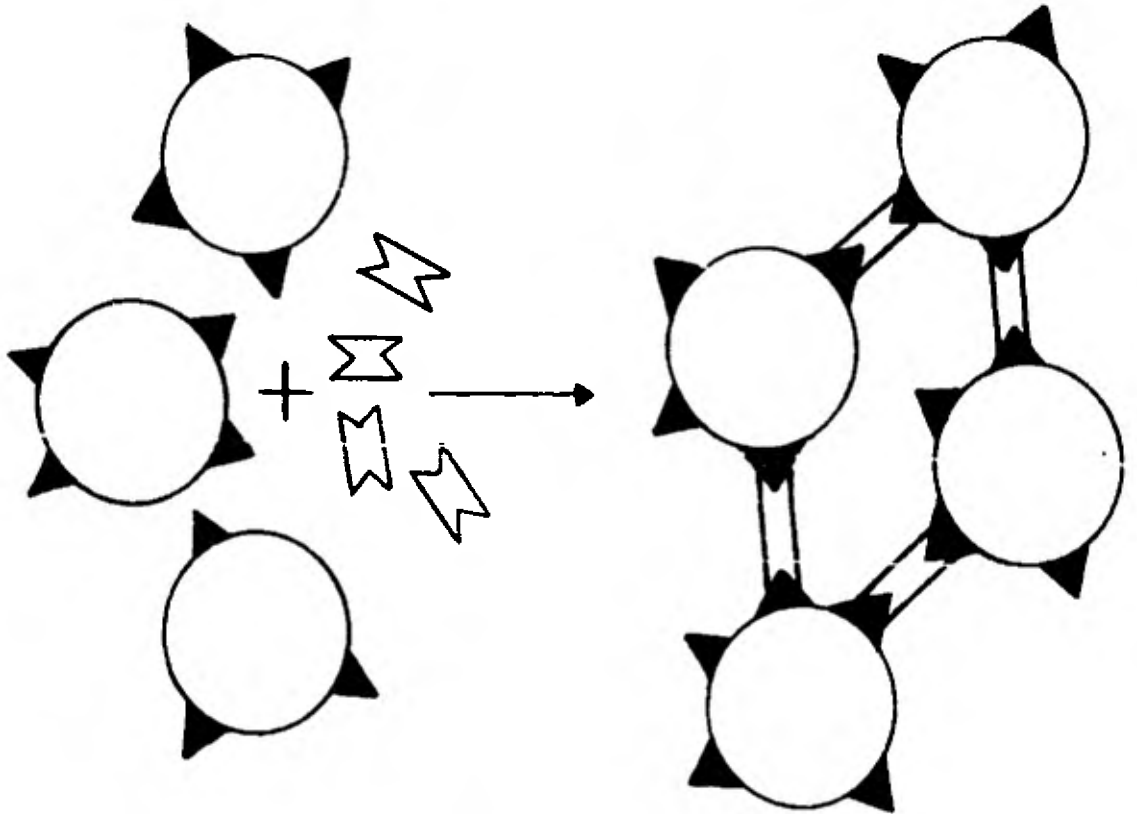
Prueba directa de Coombs (PDC). Sirve para detectar anticuerpos (IgG) adsorbidos "in vivo" a los eritrocitos que tienen en su superficie los antígenos específicos correspondientes. Por lo general, una prueba positiva muestra una hemaglutinación de la suspensión adecuadamente preparada de los eritrocitos sensibilizados, después de añadir el suero antiglobulínico humano.

Algunas de las aplicaciones de ésta prueba son: El diagnóstico de enfermedades hemolíticas del recién nacido; cuando se usa para probar la sensibilización de los eritrocitos del recién nacido, con anticuerpos elaborados por la madre y que pasan al hijo durante la gestación o al momento del

perto (5).

Además, la PDC, es útil en el estudio de las anemias - hemolíticas adquiridas, en las que un anticuerpo producido por el paciente recubre sus propios eritrocitos; la etiología en estos casos, es por un auto-anticuerpo que suele ser del tipo IgG. Otras de las aplicaciones de esta prueba es la investigación de las reacciones posttransfusionales, en donde el paciente, por causas de una inmunización previa al ser transfundido con una sangre para la cual tiene isoanticuerpos, provoca la hemólisis de la sangre del donador o de su propia sangre. Estas reacciones se pueden evitar en gran parte si se realizan las pruebas cruzadas.

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PDC.



Eritrocitos humanos sensibilizados "in vivo" por anticuerpos incompletos humanos.

Antiglobulina humana (Suero ----- Hemaglutinación de Coombs).

PRUEBA DE COOMBS DIRECTA.

Prueba Indirecta de Coombs (PIC). Es una prueba en dos fases, usada para detectar la presencia de anticuerpos in completos o univalentes (IgG), circulantes en el suero de per personas sensibilizadas a uno o más antígenos sanguíneos. En la primera fase de esta prueba, se permite que los antígenos se adsorban "in vitro" a los eritrocitos que contengan en la su superficie el antígeno correspondiente, en condiciones adecu das de incubación.

La segunda fase de esta prueba consiste en añadir el suero antiglobulínico humano a los eritrocitos sensibilizados "in vitro", lo que producirá una hemaglutinación.

Las aplicaciones principales de la PIC, son: el estudio de la inmunización producida durante el embarazo, cuando la madre y el feto tienen diferente Rh o grupo sanguíneo.

También se usa amplia y rutinariamente como un procedimiento sensible cuando se efectúan las pruebas cruzadas, para descubrir ciertas incompatibilidades, que otras técnicas no revelan. Así, como para detectar antígenos débiles o variantes del sistema Rh., la PIC., se usa también en la tipificación de diversos grupos sanguíneos con ciertos sueros hiperinmunes (anti-Duffy, anti-Kidd, anti-Kell, anti-Lutheran, anti-Lewis, anti-Diego), los cuales requieren la acción de la anti globulina humana para producir una hemaglutinación.

Existen modificaciones de la PIC., que, en algunos casos, tienen una sensibilidad aumentada gracias al uso de eritrocitos tratados con enzimas como la tripsina, papaína, ficina, y bromelina, facilita la hemaglutinación de los eritrocitos sensibilizados. No obstante, dicha modificación, no puede usarse para la detección de ciertos factores sanguíneos -- con los sueros hiperinmunes, como el anti-S, anti-M, anti-N, -- ya que son destruidos o quedan más sensibles por la acción de dichas enzimas.

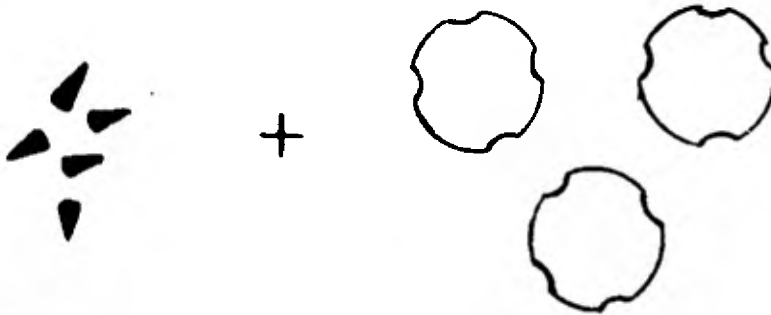
REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PIC.

1a. Fase:

Anticuerpos incompletos presentes en el suero de pacientes.

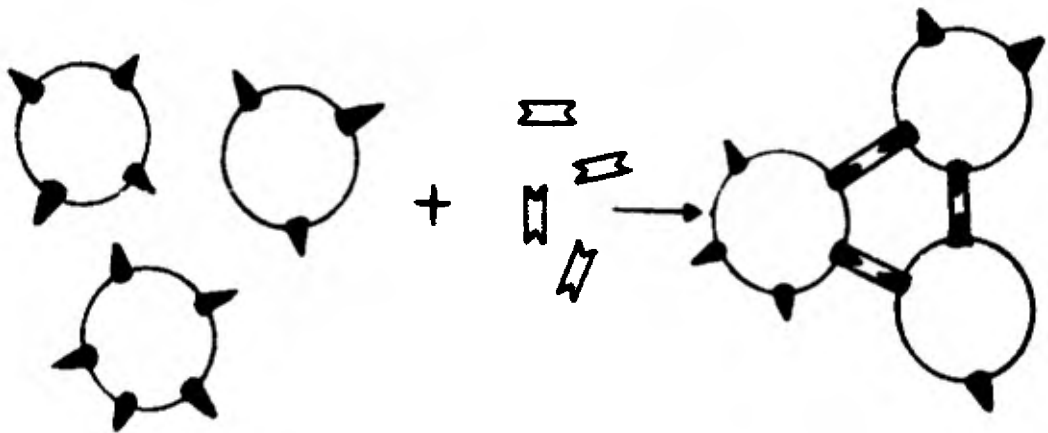
+

Eritrocitos humanos con el antígeno homólogo.



--- Eritrocitos humanos sensibilizados "in vitro",
 --- por el anticuerpo incompleto del suero del paciente.

2a. Fase:



Eritrocitos humanos sensibilizados "in vitro" por el anticuerpo incompleto del suero del paciente.

+

Suero Anti-globulina Humana.

--- Hemaglutinación.

PRUEBA DE CONSUMO DE LA ANTIGLOBULINA HUMANA

La acción de la globulina humana, sin combinar neutraliza a la antiglobulina humana e impide la actividad aglutinante sobre eritrocitos humanos sensibilizados "in vitro" por el anticuerpo (IgG), anti/Rh (D). Por tanto la variante denominada prueba de consumo de la antiglobulina humana ha sido empleada para demostrar otros tipos de padecimientos no hemolíticos, por ejemplo, la púrpura trombocitopenica idiopática - (PTI), agnasia globulinemica e hipoglobulinemias. El principio de la prueba para el caso de la PTI., consiste en agregar plaquetas lavadas con solución salina isotónica de un paciente, a un suero hiperinmune antiglobulínico humano, el cual luego se titula con eritrocitos humanos sensibilizados "in vitro" por el anticuerpo IgG anti-Rh (D). Si observamos una hemaglutinación podemos decir, que el título de anticuerpos antiplaquetarios (adsorbidos en plaquetas) es bajo, en el caso de que no se observe hemaglutinación, indicará; que la antiglobulina añadida fué consumida por los anticuerpos antiplaquetarios adsorbidos y su título estará elevado. La prueba debe ser cuidadosamente controlada empleando para ello, plaquetas normales, que se tratarán exactamente del mismo modo que las plaquetas del enfermo (9, 7).

Otra aplicación de la prueba, es en la investigación de los marcadores genéticos de los anticuerpos (alotipos Gm, Aa e Inv.), los que se estudian en forma rutinaria para los -

trasplantes de órganos. En la actualidad, la prueba de consumo de antiglobulina humana para este caso particular ha sido sustituido por la prueba de hemaglutinación pasiva, que es más fácil de manejar. (7).

ANEMIAS HEMOLITICAS AUTOINMUNES.

El reconocimiento de que ciertas alteraciones de la sangre eran debidas a un mecanismo de autoinmunidad derivada de observaciones efectuadas a principios de este siglo. En 1904 Donath y Landsteiner sugirieron que la hemoglobinuria paroxística al frío era ocasionada por un anticuerpo, una hemolisina que adsorbida en los hematíes humanos, a bajas temperaturas - provocaba su lisis por acción del complemento una vez que se calentaba de 30 a 37 °C. Widel y Cole., publicaron en Francia sus primeras observaciones y sugerían que la ictericia hemolítica adquirida podía ser debida a la formación de autohemaglutininas. Mas tarde Chauffar y Vincent insistieron sobre el papel de las hemolisinas como responsables de la anemia hemolítica aguda, asociada con la hemoglobinúria. Sin embargo la importancia de estas observaciones no fueron claramente demostradas hasta 1946 con la aplicación de la prueba de la antiglobulina humana, con lo que fué posible confirmar que los cuadros clínicos antes mencionados eran debidos a la presencia de autoanticuerpos. además se sabe actualmente que la anemia hemolítica adquirida, la púrpura trombocitopénica idiopática y ciertas granulocitopenias, todas ellas de etiología desconocida, así como las discrasias sanguíneas debidas a medicamentos, son resultado de un mecanismo inmune. La idea de que la PTI pueda tener una patogenicidad similar y ser debida a autoanticuerpos antiplaquetarios es mas reciente.

Los procesos autoinmunes que afectan a los eritrocitos son:

1.- Las anemias hemolíticas autoinmunes que pueden ser primarias o consecutivas a infecciones virales y linfomas.

2.- Hemoglobinuria paroxística al frío.

3.- Anemias hemolíticas autoinmunes, debidas a medicamentos.

1.- Anemias hemolíticas autoinmunes:

a).- Anemias hemolíticas autoinmunes tipo anti-cuerpo en caliente. Se sabe que són autoanticuerpos con especificidad definida; casi todos ellos están dirigidos contra antígenos Rh, específicamente el anti-E, que se pone de manifiesto mediante pruebas inmuquímicas como la elución del autoanticuerpo de eritrocitos de individuos sintomáticos, se ha visto que reaccionen de forma cruzada con las globulinas normales y tienen un coeficiente de sedimentación de 7 S.

Los anticuerpos que aglutinan en frío a los eritrocitos humanos, independientemente de su grupo sanguíneo, han sido denominados no específicos. Sin embargo, se ha demostrado que estos autoanticuerpos tienen una especificidad anti-I, para los antígenos I presentes en los eritrocitos de casi todos los humanos adultos, a excepción de los I-adultos y de los recién nacidos. Son universales y se les ha denominado aglutin

ninas fisiológicas, cuya acción es fijar unidades solubles del complemento, por lo que son potencialmente líticas.

La PDC., es típicamente positiva mediante el uso de sueros hiperinmunes, de especificidad anti-no γ -globulina y de amplio espectro.

La PIC., es positiva y no depende de la gravedad del enfermo, como en el caso de la anemia hemolítica tipo "anticuerpo caliente".

2.- Hemoglobinuria paroxística al frío.

El agente etiológico es el anticuerpo de Donath-Landsteiner (D-L), que es un anticuerpo bifásico (requiere de la reacción (frío - calor); se cree que es una macroglobulina 19-S (IgM), pero al paso por placenta sugiere que se trata de una inmunoglobulina IgG. Para ponerlo de manifiesto se efectúa la reacción de Donath-Landsteiner (frío-caliente), estas inmunoglobulinas pueden formarse en diferentes circunstancias, se admite que pueda estar asociado a enfermedades virales. La PDC., es típicamente positiva con el suero de Coombs de amplio espectro o de especificidad anti-no γ -globulina, en tanto que la PIC., es positiva, siendo necesaria la inactivación del complemento del suero en estudio, para evitar la hemólisis.

ENFERMEDADES AUTOINMUNES NO HEMOLITICAS.

Al igual que las anemias hemolíticas autoinmunes, sug

le haber casos primarios y consecutivos a infecciones, linfomas así como debidos a medicamentos. Básicamente abarca dos procesos autoinmunes. Los que afectan a las plaquetas y los que - afectan a los leucocitos.

En la actualidad son estudiados mediante la prueba de consumo de la antiglobulina humana, usando un suero de Coombs de amplio espectro. Los agentes etiológicos para ambos casos - supuestamente son inmunoglobulinas humanas que reaccionan de - forma cruzada con las globulinas normales. Para este propósito se practica la prueba en sus dos formas: Directa, que es muy sensible, precisa, pero difícil de practicar, dado que se requieren grandes cantidades de sangre, e Indirecta que es sensible y a menudo positiva en la PTI. (4,6).

C A P I T U L O I I I

El suero antiglobulínico humano puede obtenerse mediante la inmunización de varias especies animales de laboratorio, cuando se inmunizan con la fracción globulínica humana. Los animales más usados son el conejo y la cabra. En nuestro caso pretendemos obtener dicho suero hiperinmune, siguiendo la técnica descrita originalmente por Coombs y cols. (1, 2, 3).

El esquema propuesto para la obtención del suero hiperinmune antiglobulínico humano es el siguiente:

A).- Obtención de los antígenos; en este caso de la fracción globulínica humana a partir de cuatro sueros humanos de individuos de tipo sanguíneo O Rh positivo, aunque puede usarse cualquier tipo de suero sin importar el grupo sanguíneo

y Rh. Nosotros usaremos el suero de individuos del grupo O - Rh positivo porque es fácil de obtener dado el alto índice en nuestra población, evita la producción de aglutininas inespecíficas anti-A y anti-B, y por consiguiente facilita la purificación de los sueros hiperinmunes a obtener (1, 2, 3, 5).

Para la obtención de los antígenos se usarán 2 métodos diferentes: precipitación por sales empleando el método de Proom y la precipitación por el método del etanol frío o método de Cohn.

B).- Evaluación de las fracciones globulínicas humanas usadas como inmunógenos: se hará la técnica de Electroforesis para ver si quedaron libres de otras fracciones proteínicas presentes en el suero humano, por ejemplo: la albúmina.

C).- Valoración de la cantidad de proteínas de las fracciones globulínicas; la determinación se hará por el método de Lowry, en caso de ser necesario se ajustarán las concentraciones de nuestros antígenos a una cantidad adecuada de proteínas para ser usadas en la inmunización de conejos.

D).- Inmunización de conejos, se emplearán dos esquemas de inmunización diferentes, así como un lote de tres conejos raza híbrida, Nueva Zelanda-California; para cada inmunógeno obtenido.

E).- Obtención y purificación de los sueros hiperinmunes antiglobulínicos humanos: se hará la evaluación electroforética de dichos sueros hiperinmunes, así como la inactivación y absorción de aglutininas inespecíficas al emplear eritrocitos humanos A, B y D.

F).- Comprobación de la efectividad de las antiglobulinas humanas obtenidas:

Se verificará la capacidad de estos sueros hiperinmunes por su capacidad de aglutinar eritrocitos humanos Rh - (D) positivos, previamente sensibilizados "in vitro" con el anticuerpo IgM anti-Rh (D) diluido 1:16 en solución salina isotónica. También se efectuarán pruebas de potencia y determinación del título de anticuerpos específicos de dichos sueros hiperinmunes.

G).- Aplicación de la prueba de Coombs en sus dos formas conocidas. Se usarán los sueros hiperinmunes obtenidos, en pruebas de rutina en el Banco de Sangre.

H).- Recopilación y análisis de datos obtenidos.

C A P I T U L O I V

MATERIAL Y METODOS:

1.- Suero fresco de cuatro individuos tipo sanguíneo-D Rh positivo.

Se prefiere el suero de este tipo de donadores por varias razones:

Es un suero fácil de conseguir debido al alto índice de individuos con este tipo sanguíneo en nuestra población, evita la producción de aglutininas inespecíficas anti-A y anti-B, pues no hay sustancias solubles A o B, como sucede en el suero de personas secretoras que tienen grupo sanguíneo A, B o AB. - En cuanto al factor Rh, puede ser de individuos Rh positivos o Rh negativos ya que no se alteran las propiedades de nuestros antígenos a obtener, en este caso la fracción globulínica huma

na que se obtiene por los métodos de purificación y separación mencionados a continuación.

Los métodos de separación y purificación empleados, son del tipo denominados como inespecíficos. Pues para éste -- propósito se usan sobre todo algunas de las propiedades fisico-químicas de los anticuerpos, en tanto que para los métodos específicos se requiere forzosamente de reacciones antígeno-anti cuerpo.

MÉTODOS:

Precipitación de globulinas humanas con alumbre -
potésico. (Método de Proom).

Precipitación de globulinas humanas con etanol -
frio (Método de Cohn).

En lo sucesivo nos referiremos como antígeno I a la -
fracción globulínica obtenida por el método de Proom y como an-
tígeno II a la fracción globulínica humana obtenida por el mé-
todo de Cohn.

Obtención del antígeno I:

La precipitación de proteínas en solución que se pro-
duce al añadir sales, se basa en la hidratación de los iones -

salinos agregados, y por consiguiente la deshidratación de las moléculas proteínicas (8, 12, 13)

T E C N I C A:

- 1.- Diluir 25 ml. de suero humano con 50 ml. de agua destilada.
- 2.- Agregar poco a poco 90 ml. de una solución al 10% de alumbre potásico en agua destilada, con agitación constante
$$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \quad \text{P.M.} = 948.7$$
- 3.- Ajustar el pH a 6.5 con NaOH 5 N. (20%) y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 30 min.
- 4.- Lavar el sedimento dos veces con 200 ml. de una solución salina isotónica, que contenga mertiolato 1:10,000.
- 5.- Suspender el precipitado lavado, en solución salina isotónica que tenga mertiolato (1:10,000), para un volumen final de 100 ml.

Obtención del antígeno II:

El método se basa en la disminución de la solubilidad de las proteínas en solución al agregar un solvente miscible en

agua, que provoca la disminución de la constante dieléctrica y por consiguiente el aumento de las fuerzas de atracción entre las moléculas solizadas de proteínas. El trabajar en condiciones; como bajas temperaturas, control de pH y fuerza iónica, previene la desnaturalización de las proteínas. En ocasiones agregan iones metálicos para separaciones más específicas, por ejemplo: el plomo, obtenido subfracciones de globulinas -- usadas en pruebas inmunoquímicas. (8, 11, 13).

T E C N I C A :

Todo el proceso se lleva a cabo en cueto frío a -- aproximadamente 5°C., todos los recipientes y reactivos deben enfriarse a esta temperatura antes de comenzar la precipitación. El etanol se agrega gota a gota mediante el embudo de separación lleva adaptado en el tubo de salida una pipeta capilar para que el tamaño de la gota sea pequeño, cuya velocidad debe regularse de manera que no se forme espuma. La cantidad de etanol que debe de agregarse en cada paso se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$V_{50} = \frac{C_2 \cdot V_p}{C_1 - C_2}$$

D O N D E :

V_{50} = Volumen de etanol al 50% que debe ser agregado a la solución de proteínas.

V_{pH} = Volumen de la solución de proteínas ajustado a un pH dado.

C_1 = Concentración de etanol (50%).

C_2 = Concentración final de etanol deseada.

PROCEDIMIENTO :

- Diluir un volumen de suero con tres volúmenes de agua destilada.

Dependiendo del pH que tenga esta solución, utilizar una solución 0.05 M. de ácido acético o de una solución 0.05M. de fosfato disódico para llevarla a un pH de 7.6 - 7.7.

- Colocar la solución en baño de hielo picado y sal gruesa, hasta que alcance la temperatura de 0-1 °C.

- Con agitación constante agregar etanol frío al 50%, gota a gota hasta tener una concentración final de 20%. Durante este paso y el período de precipitación, la temperatura debe mantenerse de 0 - 1 °C. Generalmente la temperatura del baño de hielo picado y sal gruesa es de 3 a 5°C. más baja. Si se observa que al ir agregando el etanol la temperatura de la mezcla aumenta más de un grado centígrado, se debe agregar el al-

cohol más lentamente. Para calcular el volumen de etanol que debe agregarse a la solución de proteínas, se aplica la siguiente ecuación:

$$V_{50} = \frac{2}{3} V_{\text{pH } 7.7}$$

D O N D E:

V_{50} = Volumen de etanol al 50% que debe ser agregado

$V_{\text{pH } 7.7}$ = Volumen de la solución de proteínas a pH de 7.7.

4.- Dejar la mezcla de etanol - proteínas durante toda la noche a temperatura de 0°C.

5.- Pesar los tubos de centrifuga de 50 ml., anotar el peso, colocarlos en un baño de hielo picado y sal para que se enfrien a 0°C., pasar la mezcla a estos, colocar los tubos en las camisas para frascos de 250 ml. rodeándolos con hielo picado y sal gruesa.

6.- Centrifugar a 0°C., durante 30 minutos a 3000 r.p.m., para reunir el precipitado.

7.- Desechar el sobrenadante. Colocar los tubos en for

ma invertida sobre un trozo de papel absorbente hasta que escurren perfectamente bien, lo cual se hace en cuarto frío.

El precipitado se designa como # 1, contiene la γ 2-globulina que puede separarse de la β y de la δ 1-globulina mediante dos precipitaciones más.

En nuestro caso, con el fin de obtener la mayor cantidad de globulinas séricas sólo se hace una precipitación y no las tres que indica el método original, donde se obtiene la fracción δ -globulínica pura el final.

EVALUACION ELECTROFORETICA DE LOS ANTIGENOS

E.- La electroforesis es un método que permite la identificación de proteínas en solución, aportando un criterio importante de homogeneidad o heterogeneidad.

El método se basa en la separación de proteínas de un suero por medio de un campo eléctrico, el proceso depende de la carga neta de la molécula de proteínas y en menor grado de su tamaño, la velocidad de migración hacia el cátodo o ánodo dependerá del pH y fuerza iónica del amortiguador, así como del soporte empleado. Este último puede bajo ciertas circunstancias modificar la movilidad electroforética de algunas proteínas, como la globulina IgA, Haptoglobulina y α_1 fetoproteína, por

inducir el efecto de electroosmosis, ejemplo de ello, son el agar y el acetato de celulosa (8, 10, 12, 18).

En nuestro caso, es necesario obtener un patron electroforético que muestre exclusivamente la fracción correspondiente a las globulinas humanas. Para esto se hace la electroforesis de los antígenos I y antígeno II así como de un suero humano total que sirve como control.

La electroforesis de los antígenos y la del suero humano total se hace sobre un soporte de agar, con amortiguador Barbital pH de 8.2 y fuerza iónica de 0.05.

T E C N I C A :

La técnica empleada en esta prueba es la misma que se usa en el primer paso de la Inmunolectroforesis, en donde primero se hace el fraccionamiento del suero por electroforesis y despues la doble difusión radial en el mismo soporte, por lo que se describirá más adelante en forma detallada en la evaluación de los sueros hiperinmunes antiglobulínicos humanos, frente a sus respectivos antígenos.

EVALUACION DE LOS ANTIGENOS.

Determinación de proteínas totales de los antígenos -

por el método de Lowry.

El método se basa en la reducción del reactivo del fe nol de Folin Ciocalteau de color amarillo oro, compuesto por sales de litio, del ácido fosfotúngstico-molibdico a un color intenso, debido a la acción oxidante del grupo fenol contenido en el aminoácido tirosina en condiciones de alcalinidad. Como todas las proteínas contienen tirosina en cantidad variable, esta determinación, se limita a la cuantificación de proteínas solubles que tengan una porción homogénea en el contenido de dicho aminoácido. (8, 9, 13).

Cuando se pone el ión Cu^{++} disuelto en tetrato, debilmente alcalino, a una solución alcalina de proteínas, previo el tratamiento con el reactivo de fenol diluido, se forma un complejo tipo Biuret, que junto con las cadenas aromáticas de las proteínas reducen el reactivo intensificando el color azul e incrementando con ello la sensibilidad del método de 10 a 100 veces, pudiéndose determinar cantidades de proteínas del orden de 30 a 100 $\mu\text{gr.}$ con precisión de $\pm 10\%$ (8, 16).

1.- Hacer una curva de calibración a partir de una solución patrón que contenga 700 $\mu\text{gr.}$ / ml. de albúmina purificada usando un amortiguador de Tris para hacer las diluciones, que se preparan como se indica en la siguiente tabla:

Tubo	Amortiguador(ml).	Albúmina	Conc. (µgr/ml).
1	1	1	350
2	1	-	175
3	1	-	87.5
4	1	-	43.7
5	1	-	21.8

Del tubo # 1 se toma 1 ml. de la mezcla y se pasa al tubo # 2, se mezcla perfectamente, tomar 1 ml. y pasarlo al tubo # 3, y así sucesivamente.

2.- Diluir los problemas, 1:100 en amortiguador de Tris.

2'.- Reacción de color:

Tomar 0.4 ml. de las diluciones de la solución patrón, 0.4 ml. de las diluciones de los problemas y 0.4 de amortiguador Tris para elaborar el blanco de reactivos, colocar estas cantidades en varios tubos, uno para cada dilución y problema.

3.- Agregar a cada tubo 2 ml. de la solución C. de trabajo, dejar en reposo 10 min.

4.- Poner entonces 0.2 ml. de reactivo de Folin-Ciocalteu a cada tubo, agitarlos vigorosamente y dejar en reposo

durante 45 min., temperatura ambiente.

5.- Leer los tubos de la dilución del patrón contra-blanco de reactivos a una longitud de onda de 750 nm. Trazar la curva patrón, poniendo en las ordenadas los datos de la densidad óptica y en las abscisas la concentración de proteínas expresadas en $\mu\text{gr/ml}$.

6.- Interpolar las lecturas de los problemas.

REACTIVOS:

Solución A: Na_2CO_3 al 20% en NaOH 0.1 N.

Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato de sodio y potasio 0.1 %.

Solución C: Se prepara con 50 ml. de la solución A + 1 ml. de la solución B.

Reactivo de feni de folin-Ciocalteu:

Se usan reactivos grado químico de gran pureza. En un matríz de dos litros de capacidad, poner: 100 gr. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 gr. de $\text{NaMo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 700 ml. de agua destilada. Añadir 50 ml. de H_3PO_4 al 85% y 100 ml. de HCl concentrado, mantener a reflujo suave durante 10 horas. después agregar 150 gr. de Li_2SO_4 y 50 ml. de agua destilada así como unas cuantas gotas

tas de Br. líquido. Se hierve sin condensador durante 15 min. para eliminar el exceso de bromo líquido. Dejar enfriar y aforar a 1 litro con agua destilada, filtrar y guardar el reactivo en frasco ambar con tapón de corcho o goma (16).

ESQUEMA DE INMUNIZACION.

Se emplean los lotes de tres conejos, raza híbrida - Nueva Zelanda-California, uno para cada antígeno y se inmunizan de la siguiente forma:

Antígeno I (fracción globulínica humana, obtenida por el método de Proom).

Se inyectan por vía intramuscular (IM), 5 ml. del antígeno en cada cojinete plantar trasero de los conejos. A los dos semanas de la inoculación hacer una sangría de prueba, - - usar para ello la vena marginal de los conejos.

Mezclar los sueros de los tres conejos, y determinar de forma clara el título de anticuerpos, por la técnica que se describirá más adelante.

Volver a inmunizar a los conejos dos veces más; usando la misma vía de inoculación, la misma dosis y el mismo intervalo de tiempo, efectuando las respectivas sangrías de prueba, cada vez que se administre el antígeno.

Esto se hace para seguir la respuesta inmune de los conejos y determinar, en que período de tiempo se alcanza la producción máxima de anticuerpos antiglobulínicos humanos.

Antígeno II (fracción globulínica humana, obtenida - por el método de Conn). El esquema de inmunización para éste - antígeno se representa en la siguiente tabla:

Día	Vía	Dosis (µgr/ml.)	Vol. Total (ml.)	Indicaciones
0	IM	200	2	Pierna izq.
14	IM	200	2	Pierna Der.
34	SC	200	2	Dorso o abdomen
44	IV	500	2	Vena marginal.
65	--	---	---	Ira. sangría.
65	IV	500	1	Vena marginal.
75	--	---	---	2da. sangría.
75	IV	500	1	Vena marginal.

IM = Intramuscular.

SC = Subcutánea.

IV = Intravenosa.

Las inoculaciones, por vía IM, se hacen añadiendo 1 ml. del adyuvante completo de Freund, para obtener un volumen total de dos ml.

NOTA: Los esquemas de inmunización usados en nuestro trabajo son resultado de la práctica y se emplean de forma rutinaria, en trabajos de investigación en el DIF.

Evaluación de los Sueros hiperinmunes antiglobulínicos humanos.

En lo sucesivo denominaremos como S-I al suero hiperinmune obtenido por inmunización, con el antígeno I (fracción globulínica, obtenida por el método de Proom), y como S-II (fracción globulínica obtenida por el método de Cohn).

La inmunolectroforesis es un método que permite determinar la especificidad y pureza de un suero hiperinmune, el cual se basa en la combinación de una electroforesis con una doble difusión radial en el mismo soporte (8, 12, 18).

Efectuar la inmunolectroforesis de S-I y S-II, frente a sus respectivos antígenos. Usar dos sueros humanos totales como controles.

T E C N I C A:

1.- En un matríz de 100 ml. de capacidad pesar 0.6gm de agar, y agregar 40 ml. de amortiguador dietil-barbiturato-acetato pH 8 y fuerza iónica de 0.05.

Colocar tres ml. en portachjetos limpios y desengrasados, sobre una superficie plana. Para desengrasar los portachjetos se deben poner en una solución alcohol-acetona, toda la noche y al día siguiente lavarlos con agua de la llave, y -

después con agua destilada.

a) Dejar solidificar el agar de los portaobjetos, facilitándose esto con la refrigeración, durante 15 a 20 min.

b) Quitar el portaobjetos de la refrigeración. Con un horarador hacer los cortes circulares y corte de los canales.

c) Quitar el gel de los cortes circulares, con una aguja hipodérmica, sin eliminar el gel de los canales.

d) Colocar el amortiguador en la cámara de electroforesis al nivel adecuado, usar las marcas de la cámara como referencia.

e) Dejar la cámara durante 10 min. a 2 mA. usando como puente, papel filtro.

f) Colocar con microjeringas tres μ l. de los antígenos y de los sueros humanos en diferentes pozos.

g) Colocar las laminillas en la cámara, el contacto con el amortiguador se establece mediante dos pedazos de papel filtro doblados en ángulo recto y colocados a ambos lados de tal forma que quede aproximadamente 1 cm. de la tira sobre el gel y 0.5 cm. dentro del amortiguador, no deben quedar burbu-

jas de aire entre el papel filtro y la superficie del gel, pues esto afecta el paso de corriente.

h) Tapar la cámara de electroforesis y conectar la fuente de poder ajustando la intensidad de corriente a 90V, 45mA.

i) Después de una hora sacar las laminillas de la cámara, con mucho cuidado para no tocar los bordes, ponerlas en la mesa de trabajo y con ayuda de un palillo quitar el agar de los canales.

j) Llenar los canales con los sueros hiperinmunes -- S-I y S-II, de forma que queden frente a sus respectivos antígenos y sueros humanos totales, usar 75 μ l, de estos sueros hiperinmunes para cada antígeno y suero humano total. Emplear para ello dos jeringas de insulina, una para cada suero antiglobulínico humano.

k) Dejar las laminillas en una cámara húmeda, durante 18 horas para que se lleve a cabo la inmunoprecipitación.

REACTIVOS:

Amortiguador de barbiturato sódico	88.26 grs.
Acetato sódico	56.20 grs.
Solución de timerosal al 10%	3.0 ml.
Agua destilada	3,000.0 ml.

Mezclar 800 ml. de la solución barbital-acetato, con 960 ml. de agua destilada y ajustar el pH a 8.2 con HCl 0.1 N.

Solución de Trabajo:

Solución de barbiturato-acetato diluida 1:2 con agua destilada, pH de 8.2 y fuerza iónica 0.05.

Purificación de los diversos sueros hiper_
inmunes.

La purificación específica conocida como absorción de Landestainer, designada como específica por intervenir en forma directa, una reacción antígeno-anticuerpo, se usa para eliminar cualquier tipo de aglutininas inespecíficas, que puedan estar presentes en algunos sueros hiperinmunes antihumanos, como son el suero antiglobulínico humano. (1,2,8,15).

T E C N I C A:

1) Incubar los sueros hiperinmunes a 56°C. durante 30 min. Con lo que se inactiva el complemento presente en estos sueros.

2) Lavar por separado eritrocitos humanos de grupo sanguíneo A, B y O, con solución salina isotónica (ssi), por lo menos tres veces. Usar 1 volumen de eritrocitos por cada "9 vol." de solución salina isotónica en cada lavado, centrifugando a 3500 r.p.m., 5 min. respectivamente hasta la obtención de un sobrenadante claro.

3) En dos tubos poner 1 vol. de eritrocitos tipo O, lavados y añadirles 9 vol. de cada suero antiglobulínico humano, por separado.

4) Mezclar bien e incubar a 37°C. durante 30 min.

5) Centrifugar los tubos a 3500 r.p.m., durante 10 - min. separar el sobrenadante.

6) Con el sobrenadante obtenido repetir los pasos 3, 4 y 5 para absorber los sueros hiperinmunes en eritrocitos tipo A y después en eritrocitos tipo B.

Después de las absorciones, realizar una prueba de comprobación, para ver si hubo la eliminación de aglutininas inespecíficas. Para esto se usan eritrocitos humanos al 2% de los diferentes grupos sanguíneos.

Poner por separado en tres tubos, dos gotas de anti-globulina humana, añadir a cada uno dos gotas de la suspensión al 2% de los eritrocitos A, B y O, respectivamente, incubarlos a 37°C., durante 30 min., y centrifugar a 3500 r.p.m., en un tiempo de 3 min. Si hay hemaglutinación en los tubos, repetir los pasos 3, 4, 5 y 6.

Cuando se efectúe la prueba de comprobación y la hemaglutinación, sea negativa; en todos los tubos, las aglutininas inespecíficas, habrán sido absorbidas en su totalidad.

Prueba de potencia de los sueros hiperinmunes.

La prueba se efectúa con los sueros hiperinmunes S-I y S-II obtenidos al inmunizar conejos con el antígeno I (preparado por el método de Proom) y antígeno II (Preparado por el método de Cohn) respectivamente, al emplear los dos esquemas de inmunización ya citados. La determinación se hace con la mezcla de los sueros de los tres conejos inmunizados respectivamente con el antígeno I y con el antígeno II, que corresponden a las sangrías de prueba efectuadas a diversos intervalos de tiempo; estas sangrías se realizan para ver como responden los conejos a un mayor número de inmunizaciones y si éstas provocan una mejor respuesta en la producción de anticuerpos específicos anti-globulina humana (12, 19, 20, 21).

T E C N I C A :

Inactivar los sueros hiperinmunes a 56 °C. durante 30 min.

Absorber las aglutininas inespecíficas de éstos sueros empleando la técnica de Landsteiner citada anteriormente.

Lavar eritrocitos humanos tipo D Rh (D) positivo, con solución salina isotónica, por lo menos tres veces. Usar 1 volumen de eritrocitos por cada nueve volúmenes de s.s.i. en ca-

da lavada, centrifugando a 3,500 r.p.m., durante 5 minutos, cada vez, hasta la obtención de un sobrenadante claro.

Preparar una suspensión de eritrocitos lavados al 4% v/v, en s.s.i.

Sensibilizar a los eritrocitos con el anticuerpo IgM anti-Rh (D), diluido previamente 1:16, en s.s.i. Para ello mezclar partes iguales de los eritrocitos ajustados al 4% en s.s.i., para eliminar el exceso de suero anti-Rh (D), sin reaccionar.

Efectuar la PIC., usando diluciones seriadas de los sueros hiperinmunes obtenidos, con los eritrocitos humanos anteriormente sensibilizados, como a continuación se indica:

Tubo	Suero hiperinmune (Suero de Coombs) (ml).	s.s.i. (ml.)	dilución
1	0.5	-	1:1
2	0.5	0.5	1:2
3	0.0	0.5	1:4
4	0.0	0.5	1:8
5	0.0	0.5	1:16
6	0.0	0.5	1:32
7	0.0	0.5	1:64
8	0.0	0.5	1:128
9	0.0	0.5	1:256
10	0.0	0.5	1:512

Del tubo número dos, que tiene 0.5 ml. de suero de Coombs y 0.5 ml. de s.s.i., mezclar bien y tomar 0.5 ml., y pasarlo al tubo número 4, así sucesivamente, hasta llegar al tubo número 10, descartar 0.5 ml. de ésta última dilución.

Agregar a cada dilución de los sueros hiperinmunes anti globulínicos humanos (suero de Coombs) 0.5 ml. de eritrocitos sensibilizados. Centrifugar a 1,500 r.p.m., durante 15 segundos, y leer las aglutinaciones en cada tubo.

Conjuntamente, a esta prueba deben correrse dos testigos negativos; 1 preparado con eritrocitos sensibilizados y con s. s.i., en lugar de suero de Coombs y otro con eritrocitos no -- sensibilizados y suero de Coombs.

C A P I T U L O V.

R E S U L T A D O S:

A).- Evaluación electroforética de los antígenos.

En la evaluación del antígeno II se apreciaron 4 bandas que, de acuerdo a nuestros sueros humanos totales empleados como controles nos hicieron concluir en la presencia de 4 subfracciones globulínicas; α_1 , α_2 , β y δ -globulinas exclusivamente. La ausencia de una banda de mayor movilidad hacia el ánodo y que correspondía a la fracción albúmina, presente en la electroforesis de los sueros humanos totales, nos permitió tener la certeza de que el antígeno II estaba libre de fracción albúmina y por consiguiente era adecuado para usarse como inógeno, en la obtención del suero de Coombs.

La evaluación electroforética del antígeno I fué poco -

satisfactoria, debido a la naturaleza de este antígeno, que resultó ser una solución muy densa con elevado contenido en sales de sulfato de aluminio y potasio. Por consiguiente, los resultados obtenidos, no fueron confiables. Sin embargo, para éste propósito, se sugiere efectuar la diálisis del antígeno, lo cual requiere repetir el proceso, por lo menos 3 veces (12).

En nuestro caso particular, no se hizo la diálisis del antígeno I, debido a que la presencia de ésta sal servía como adyuvante de este inmunógeno (7, 12).

Por otra parte; la evaluación del antígeno I se hizo en forma indirecta, al usar el respectivo suero hiperinmune designado como S-I (suero de Coombs obtenido mediante la inmunización de conejos con el antígeno I), frente a un suero total humano usado como control y un antígeno conocido (antígeno II) - mediante la técnica de inmunoelectroforesis, dando resultados satisfactorios.

Por lo tanto, dicho antígeno resultó ser un inmunógeno adecuado.

B).- Determinación de proteínas totales.

Como ya se mencionó, la cuantificación se hizo por el método de Lowry. Para ello se elaboró una curva patrón, usando una solución de albúmina de 300 μ gr/ml. de proteína, el resultado obtenido para el antígeno II fue de 31,500 μ gr/ml. de --

proteínas, a partir del cual se hicieron dos diluciones, para ajustarlo a concentraciones de 200 μ gr/ml. de proteína y de 500 μ gr/ml. de proteína, para ser usados como inmunógenos (ver esquema de inmunización, para el antígeno II).

La determinación de proteínas totales del antígeno I, no pudo llevarse a cabo, debido a que era una solución muy densa y turbia, y por consiguiente, no seguía la ley de Beer; involucrada en este tipo de determinaciones espectrofotométricas (13).

No obstante, se empleó como tal en la inmunización de conejos, de acuerdo al esquema citado para este antígeno.

C).- Evaluación inmunolectroforética de los sueros hiperinmunes S-I y S-II.

Se efectuó la prueba frente a 2 sueros humanos totales y frente a sus respectivos antígenos homólogos (antígeno II). Los resultados mostraron en el primer caso una línea de efectiva identidad, semejante a la obtenida con el antígeno homólogo y correspondía a la interacción globulina-antiglobulina.

Por otra parte, no se observó en ningún caso una banda que correspondía a la fracción albúmina, la cual estaba presente en los sueros humanos totales.

Por lo tanto, podemos decir; que los antígenos I y II fueron adecuadamente preparados y purificados según pudo demostrarse al evaluar mediante esta técnica los respectivos sueros hiperinmunes obtenidos, ya que solo mostraron tener especificidad para las globulinas humanas, que fueron los inmunógenos empleados para su obtención. También podemos decir, en base a lo anterior, que los sueros hiperinmunes S-I y S-II SON EN REALIDAD ANTIGLOBULINAS HUMANAS, y por consiguiente, pueden ser usados como sueros de Coombs de amplio espectro; ya que tienen especificidad anti- β y no- β globulina humana.

Pruebas de potencias de los sueros hiperinmunes anti-globulínicos humanos (Suero de Coombs I y Suero de Coombs II).

Se trabajó con una mezcla de los sueros hiperinmunes obtenidos en cada sangría de prueba de los conejos inmunizados con el antígeno I y antígeno II respectivamente (12). Los resultados obtenidos se exponen a continuación en las tablas 1 y 2. Los valores expresados en cruces de 1 a 4, representan la intensidad de la aglutinación en cada tubo.

TABLA No. 1.

Tubo	dilución del suero de Coombs.	sangría de prueba a los días:			
		14	28	42	52
1	1:1	++++	++++	++++	++++
2	1:2	+++	++++	+++	+++
3	1:4	++	+++	+++	++
4	1:8	++	+++	++	++
5	1:16	+	++	++	+

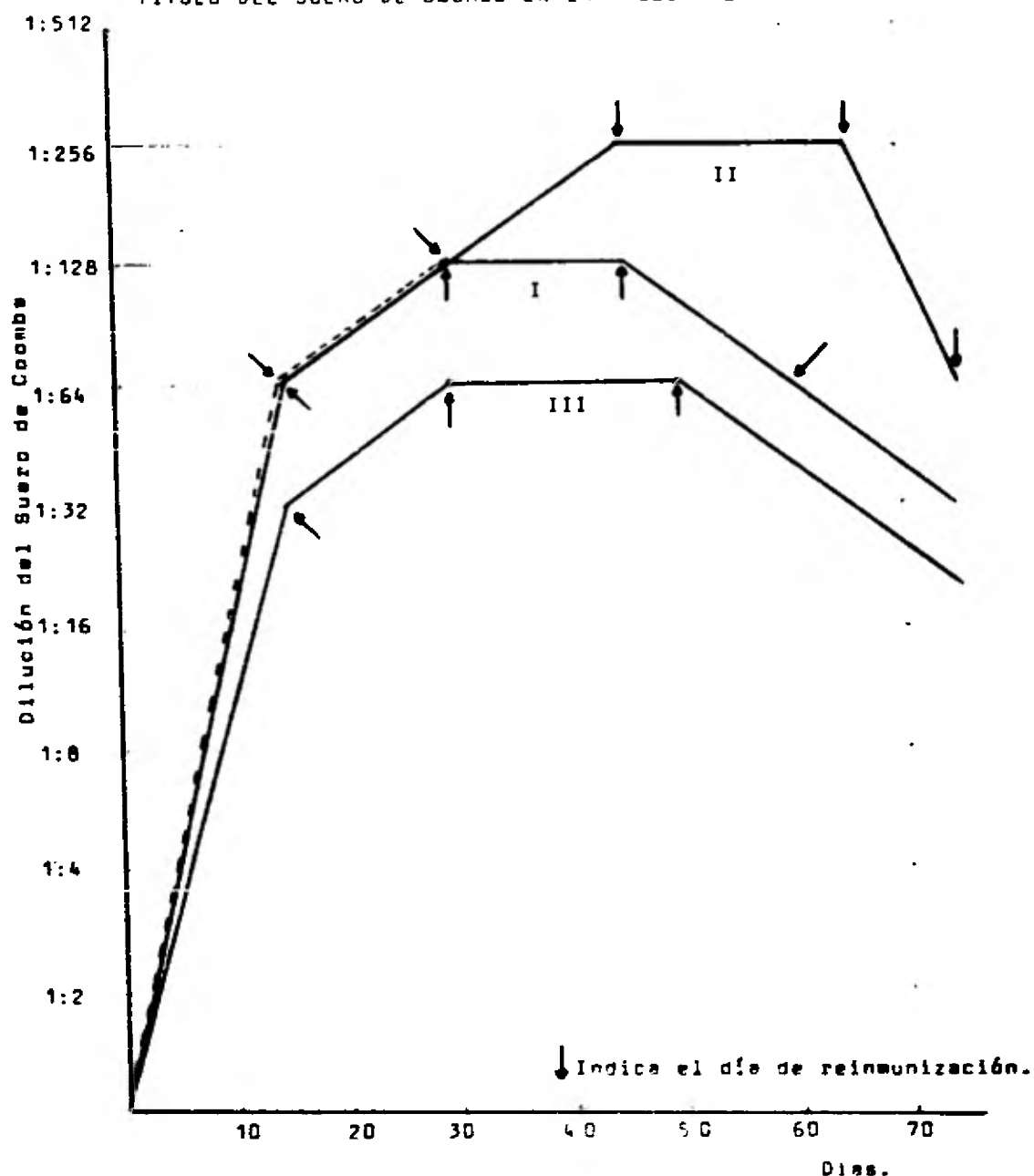
6	1:32	--+	++	++	+-
7	1:64	-	+	+	-
8	1:128	-	+	+	-
9	1:256	-	-	-	-

De los resultados anteriores se observó; que un estímulo antigénico aplicado en el día 14 produjo una elevación -- significativa en el título de estos anticuerpos específicos; antiglobulina humana, dicha respuesta enamnésica era de esperarse. La aplicación de un estímulo antigénico a los 28 días mantuvo constante la producción de anticuerpos específicos y men cionados, para ello el tiempo transcurrido entre la última dosis del inmunógeno y las sangrías de prueba, fué de 14 días. Sin embargo, la aplicación del inmunógeno a los 42 días, produjo un descenso en el título de estos anticuerpos al hacer la sangría de prueba a los 10 días, lo cual indicó que la adminis tración del antígeno I era demasiado rápida, produciendo proba blemente la neutralización del anticuerpo específico antiglobu lina humana "in vivo" (8, 19, 20, 21).

En base a lo anterior observamos que fué inútil aplicar más de 2 estímulos antigénicos después de los días 28 y 42 pues en este período de tiempo fué cuando se alcanzó la máxima producción de anticuerpos específicos antiglobulina humana, -- con un título de 1:128 (ver gráfica 1).

Gráfica # 1

TITULO DEL SUERO DE COOMBS EN LA PRUEBA DE POTENCIA.



- I. Suero de Coombs obtenido por inmunización con el AgI (Proom).
- II. Suero de Coombs obtenido por inmunización con el AgII (Cohn).
- III. Suero de Coombs reportado por Coombs y cols.

Tubo	Dilución de suero de Coombs.	Sangría de prueba los días.				
		14	34	44	65	75
1	1:1	++++	++++	++++	++++	++++
2	1:2	++++	++++	++++	++++	++++
3	1:4	+++	++++	++++	+++	+++
4	1:8	+++	+++	+++	+++	+++
5	1:16	++	+++	+++	++	++
6	1:32	++	++	++	++	++
7	1:64	++	++	++	++	+
8	1:128	-	++	++	++	+
9	1:256	-	-	+	+	-

En este caso se observó una respuesta similar a la obtenida con el antígeno I, es decir, hubo un incremento en el título de anticuerpos específicos antiglobulina humana. A consecuencia de la aplicación de los estímulos anigénicos en los días 14, 34 y 44, con el antígeno II, los periodos de intervalo de tiempo transcurrido entre la última dosis de este antígeno y las sangrías de prueba fueron de 20 y 10 días respectivamente, también se observó que la aplicación de este inmunógeno a los 44 días no incrementó el título de anticuerpos específicos al efectuar la sangría de prueba a los 21 días. No obstante, la aplicación de un estímulo antigénico a los 65 días, por

por vía IV. (Ver esquema de inmunización para el antígeno II), produjo un descenso en el título de anticuerpos específicos - del orden de una dilución al efectuar la respectiva sangría según la prueba a los 10 días.

Esto último pudo deberse a una saturación del sistema retículo endotelial de los conejos inmunizados y por consiguiente dar el efecto de neutralización del anticuerpo específico antiglobulina humana, citado en la evaluación de potencia del Suero de Coombs I.

Debido a lo anterior se observó que fué inútil aplicar más de 2 estímulos antigénicos por vía IV., después de los días 44 y 65, ya que en este período de tiempo se alcanzó la máxima elaboración de anticuerpos específicos con título de 1:256 (ver gráfica No. 1), y porque podía inducirse una amiloidosis secundaria en los conejos, como resultado de la administración rápida por vía intravenosa del inmunógeno II. Así mismo, se evitó un mayor consumo de dicho antígeno.

La conclusión obtenida, en base a los resultados obtenidos en las titulaciones del suero de Coombs I y II, es que el antígeno preparado según Cohn, provocó una respuesta inmune de mayor magnitud, independientemente de las características y elaboración de los dos sueros hiperinmunes, dado que en la elaboración del suero de Coombs I, desconocimos varias caracteris

ticas del inmunógeno empleadas, como son la concentración de --
proteínas y sus propiedades electroforéticas.

Determinación de los puntos de equivalencia de los -
sueros de Coombs. La determinación del punto de equivalencia
de un anticuerpo frente a su respectivo antígeno, nos indica -
en que momento, la concentración de ambos, es equivalente, y -
por lo tanto su interacción es completa. Ya que no hay inter-
ferencias debido a una mayor cantidad de antígeno en compara-
ción con el anticuerpo (efecto de prozona) y viceversa (efecto
de postzona) (8, 12).

Esta determinación se efectuó para ajustar el título
de anticuerpos específicos de nuestros sueros hiperinmunes, -
con el propósito de obtener resultados óptimos en posteriores
pruebas de rutina.

El método empleado fué similar a la prueba de poten-
cia efectuada con los sueros de Coombs, pero en este caso la -
dilución del suero anti-Rh (D), no fué constante. De la dilu-
ción 1:16 se hicieron diluciones seriadas con las cuales se -
sensibilizaron eritrocitos humanos homólogos, que posteriormen-
te se probaron con diluciones respectivas de los sueros de - -
Coombs I y II.

Las diluciones del suero anti-Rh (D) fueron hechas de
la siguiente forma:

Tubo	Dilución g. c. suero anti-Rh(D)	Suero anti-Rh (D) ml.	S.S.I. ml
1	1:16	1	-
2	1:32	1	1
3	1:64	-	1
4	1:128	-	1
5	1:256	-	1
6	1:512	-	1
7	1:1024	-	1

Del tubo No. 2 se tomó 1 ml. y se pasó al tubo No. 3, se mezcló bien y se repitió el proceso hasta el tubo No. 7 don se desechó 1 ml.

A las diluciones anteriores, se agregaron 1 ml. de eritrocitos humanos homólogos para sensibilizarlos, de acuerdo a la técnica mencionada.

Se realizó la prueba de Coombs usando los sueros hiperinmunes S-I y S-II obtenidos por la reinmunización de los conejos a los 14 días con los antígenos I y II a partir del día en que el título había bajado, sangrándolos por punción cardíaca al décimo día. Al igual que en la prueba de potencia, se trabajó con la mezcla de sus sueros.

En este caso también se usaron 2 controles negativos para cada dilución, preparados con eritrocitos sensibilizados-

más solución salina isotónica, y con eritrocitos normales y --
 suero de Coombs. Además se valoró el punto de equivalencia de
 un suero de Coombs comercial.

Se obtuvieron los siguientes resultados, representados
 en las tablas 3, 4, 5 y en la gráfica a número 2.

TABLA No. 3
 SUERO DE COOMBS I

Dilución del suero de Coombs. (↓)	Dilución del suero anti-Rh (D) (→)						
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1:16	+	++	++	+++	+++	++	+
1:32	+	++	++	+++	+++	++	+
1:64	-	-	+++	++++	+++	-	-
1:128	-	-	-	++++	-	-	-
1:256	-	-	-	-	-	-	-

TABLA No. 4.
 SUERO DE COOMBS II

Dilución del suero de Coombs. (↓)	Dilución del suero anti-Rh (D) (→)						
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1:16	+	+	++	++	++	++	+
1:32	+	++	+++	+++	++	++	+
1:64	+	++	+++	+++	+++	++	+

1:128	-	-	-	++++	+++	-	-
1:256	-	-	-	++++	-	-	-
1:512	-	-	-	-	-	-	-

TABLA No. 5

SUERO DE COOMBS COMERICAL

Dilución del suero de Coombs.	Dilución del suero anti-Rh (D)						
	(↓)			(→)			
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1:16	+	+	++	++	+++	++	+
1:32	+	++	+++	+++	+++	++	+
1:64	+	++	+++	+++	+++	++	+
1:128	-	-	++	++	++++	-	-
1:256	-	-	-	-	++++	-	-
1:512	-	-	-	-	-	-	-

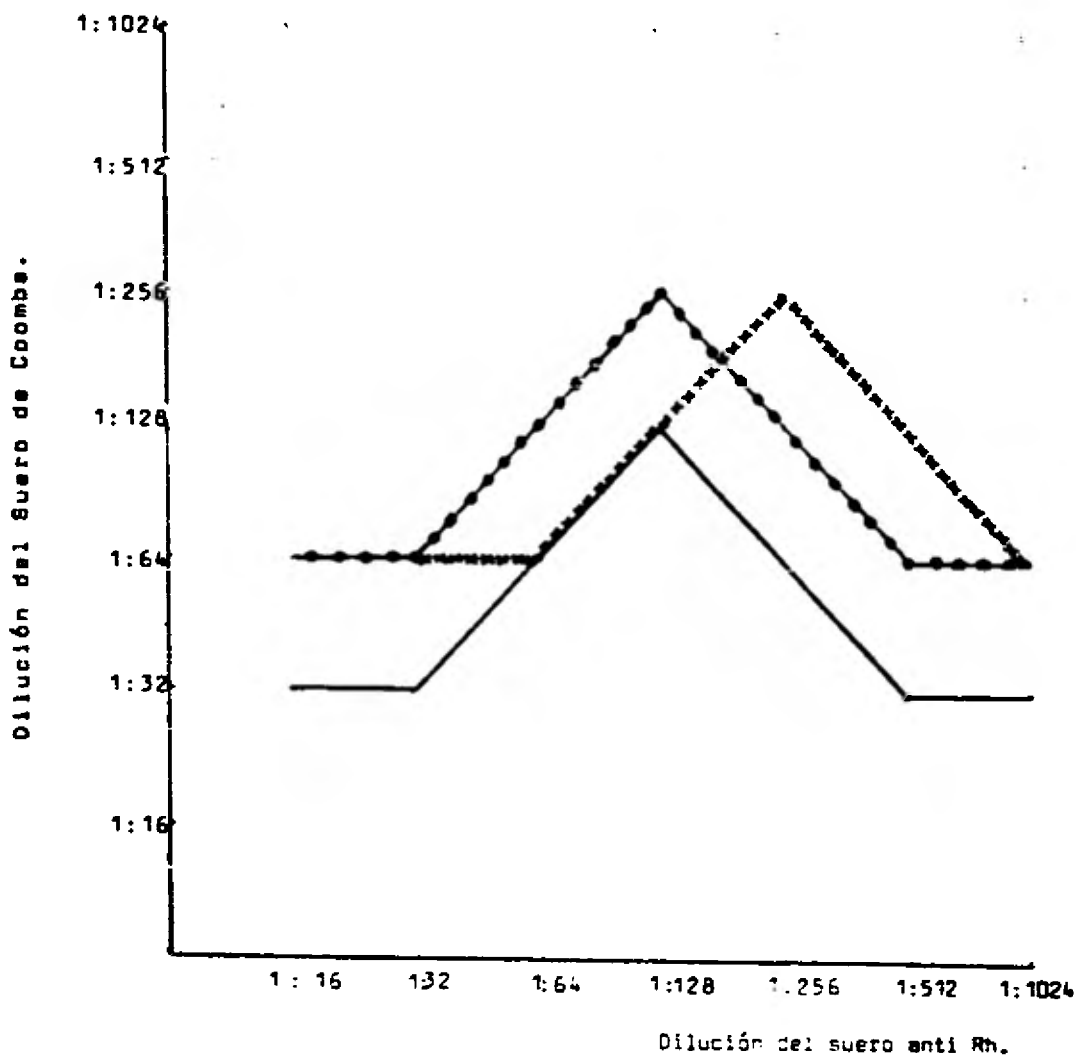
Observaciones de los resultados obtenidos:

El suero de Coombs I diluido 1:128 fué capaz de detectar anticuerpos incompletos anti - Rh (D), cuando estuvo sensibilizando eritrocitos humanos homólogos a diluciones de 1:128. Por lo tanto, el título de anticuerpos específicos del suero de Coombs I, al trabajar en condiciones óptimas fué de 1:128.

El suero de Coombs II tubo un comportamiento similar.

Gráfica # 2

DETERMINACION DEL PUNTO DE EQUIVALENCIA DE LOS SUEROS
HIPERINMUNES OBTENIDOS.



— Suero de Coombs I
-o-o-o Suero de Coombs II
xxxxxx Suero de Coombs (Control Comercial).

solo que el título fué de 1,256. Esto era de esperarse, debido al efecto inmunopotenciador del adyuvante completo de Freund presente en el inmunógeno II, que ha mostrado mayor efecto que el adyuvante constituido por sales minerales de aluminio y potasio contenidas en el antígeno I (7, 8).

Por otra parte, el suero de Coombs comercial tuvo un título de 1,256, pero este fué capaz de detectar anticuerpos incompletos diluidos 1,256, siendo ligeramente más sensible que el suero de Coombs II y el suero de Coombs I.

Pruebas de control de calidad de los sueros
de Coombs.

Las pruebas de control de calidad de un producto determinado constituyen la base principal para saber si este funciona adecuadamente, teniendo la certeza de que proporcionaré resultados confiables. Para efectuar lo anterior fué necesario ajustar los sueros hiperinmunes, diluyéndolos para obtener 8 dosis aglutinantes (título/8 = Dilución final). Tomando en cuenta que una dosis aglutinante es la más pequeña de suero hiperinmune que produce una aglutinación con intensidad de (+)

La estandarización de los sueros se hizo en base a los resultados obtenidos por Coombs y Cole, ellos vieron que la mayoría de sus sueros fueron activos a diluciones de 1:64, excepto el suero anti-pseudoglobulínico, que resulto ser menos activo. En la práctica emplearon sueros con 8 dosis aglutinantes, porque consideraron que era mejor estandarizarlos para pruebas de rutina. (1, 2, 3).

En nuestro caso, los sueros de Coombs I y II que habían presentado títulos de 1:128 y de 1:256 respectivamente, cuando se ajustaron para la obtención de 8 dosis aglutinantes, quedaron con diluciones finales de 1:16 y de 1:32.

Las pruebas de control de calidad que hicimos a los sueros hiperinmunes, una vez ajustados con 5 dosis aglutinantes, tuvieron como objetivo determinar su actividad en la detección de antígenos más débiles, como los subgrupos del sistema Rh. Además, eran sueros de amplio espectro; que abarcaban la fracción anti-no β -globulina, por lo que se probaron usando como antígeno el suero hiperinmune anti-Lewis, encontrado en dicha fracción globulínica humana (9, 15).

DESCRIPCION DE LAS PRUEBAS:

Prueba de Coombs con subgrupos del sistema Rh.

Se usaron tres muestras de eritrocitos humanos tipo - O Rh positivos, que se denominaron con los números 1, 2, y 3, a los cuales se les determinó el subgrupo con el uso de los sueros anti-C, anti-E y anti- \bar{E} , obteniendo los siguientes resultados:

Muestra de Eritrocitos.	1	2	3
Aglutinación con anti-E	+++	++++	++
Aglutinación con anti-C	++++	-	++++
Aglutinación con anti- \bar{C}	++++	++++	-

1.- Las muestras fueron sensibilizadas con los sueros hiperinmunes de subgrupo, previamente diluidos 1:8 en s.s.i. - Para ello se usó la técnica respectiva ya descrita: los eritrocitos de la muestra 1 fueron sensibilizados con el suero anti-

\bar{c} , los eritrocitos de la muestra 2 con el suero anti-E y - los eritrocitos de la muestra 3 con el suero anti-C. Posteriormente fueron probados con los sueros de Coombs en forma similar a la determinada del punto de equivalencia. El mismo proceso se hizo empleando un suero de Coombs comercial - frente al suero anti- \bar{c} . Los resultados obtenidos fueron re presentados en las tablas 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, así como en las gráficas 3a y 3b.

TABLA NO. 5.

SUERO DE COOMBS I.

(S.C.I)

Dilución del suero anti- \bar{c} (↓)	Dilución del S.C.I. (→)						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
1:8	-	+	+	++	+++	-	-
1:16	-	+	++	+++	++++	-	-
1:32	-	+	++	+++	++++	+	-
1:64	-	+	+	++	++++	-	-
1:128	-	-	-	-	++	-	-

TABLA No. 6.

Dilución del suero anti-E (↓)	Dilución del S.C.I. (→)						
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1:8	-	-	+	++	+++	+++	-
1:16	+	+	++	++	++++	+++	+

1:32	+	+	+	++	++++	++	-
1:64	-	+	-	-	++	+	-
1:128	-	-	-	-	+	-	-
1:256	-	-	-	-	-	-	-

TABLA No. 7

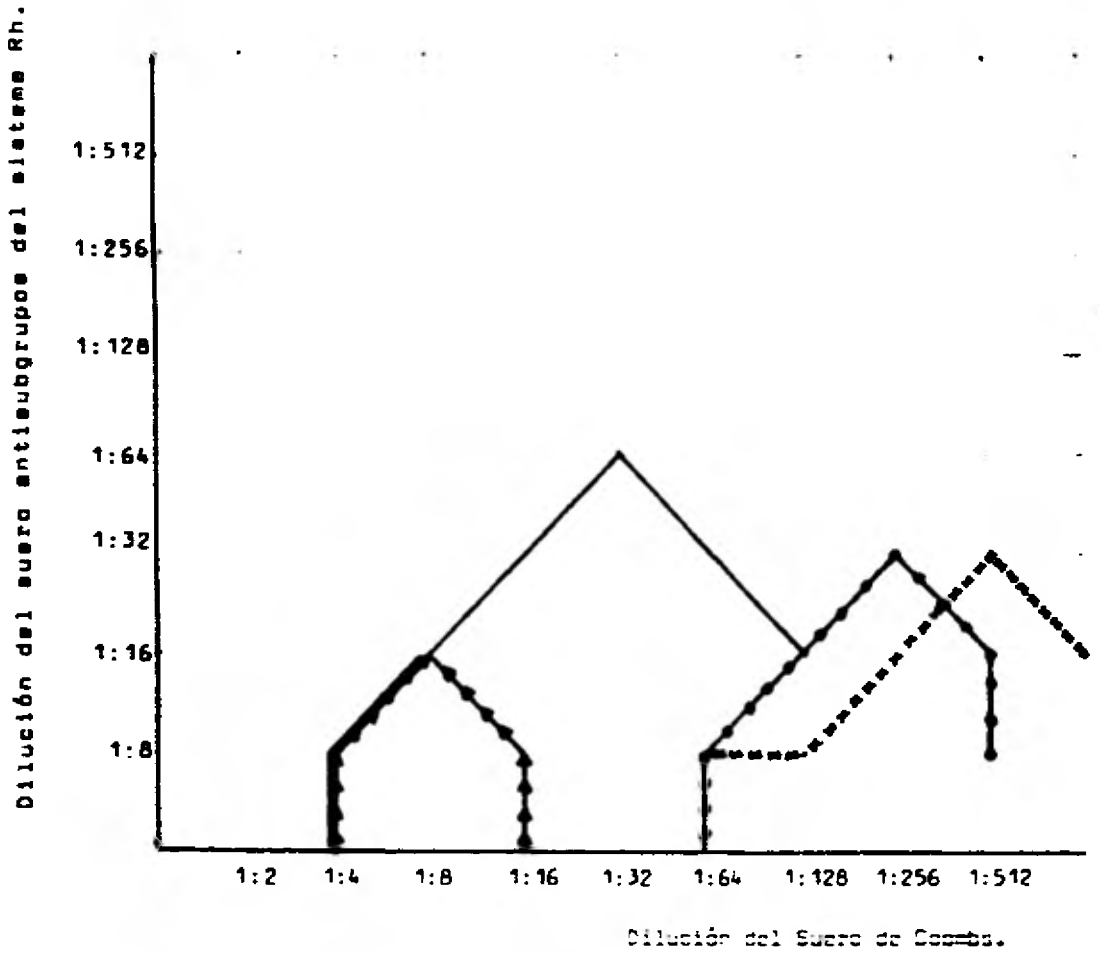
Dilución del suero anti-C (↓)	Dilución del S.C.I. (→)			
	1:2	1:4	1:8	1:16
1:8	-	++	++++	+
1:16	-	+	++++	++
1:32	-	+	++	-
1:64	-	-	+	-

TABLA No. 8

Dilución del suero anti-C. (↓)	Dilución del S.C. (control comercial) (→)				
	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1:8	+	++	+++	++	++
1:16	++	++	+++	++++	++
1:32	+	+	++	++++	+
1:64	+	+	++	+++	-
1:128	-	-	+	+	-

Gráfica # 3a

SUERO DE COOMBS I FRENTE A SUBGRUPOS DEL SISTEMA RH.



- Eritrocitos sensibilizados con anti-D.
- o-o-o- Eritrocitos sensibilizados con anti-C.
- Eritrocitos sensibilizados con anti-E.
- xxxxxx Eritrocitos sensibilizados con anti-D. Suero de Coombs (comercial).

SUERO DE COOMBS II

(S.C. II)

Tabla No. 9

Dilución del suero (↓) anti- \bar{c}	Dilución del S.C. II (→).						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1:8	-	-	+	++	+++	++	-
1:16	+	+	++	++	++++	+++	+
1:32	+	-	-	+	+++	++	-
1:64	-	-	-	-	++	++	-
1:128	-	-	-	-	+	-	-

Tabla No. 10

Dilución del suero (↓) anti-E.	Dilución del S. C. II (→).				
	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1:8	+	++	++	+++	++++
1:16	+	++	++	++++	++++
1:32	+	+	+	+++	++
1:64	-	-	-	++	+

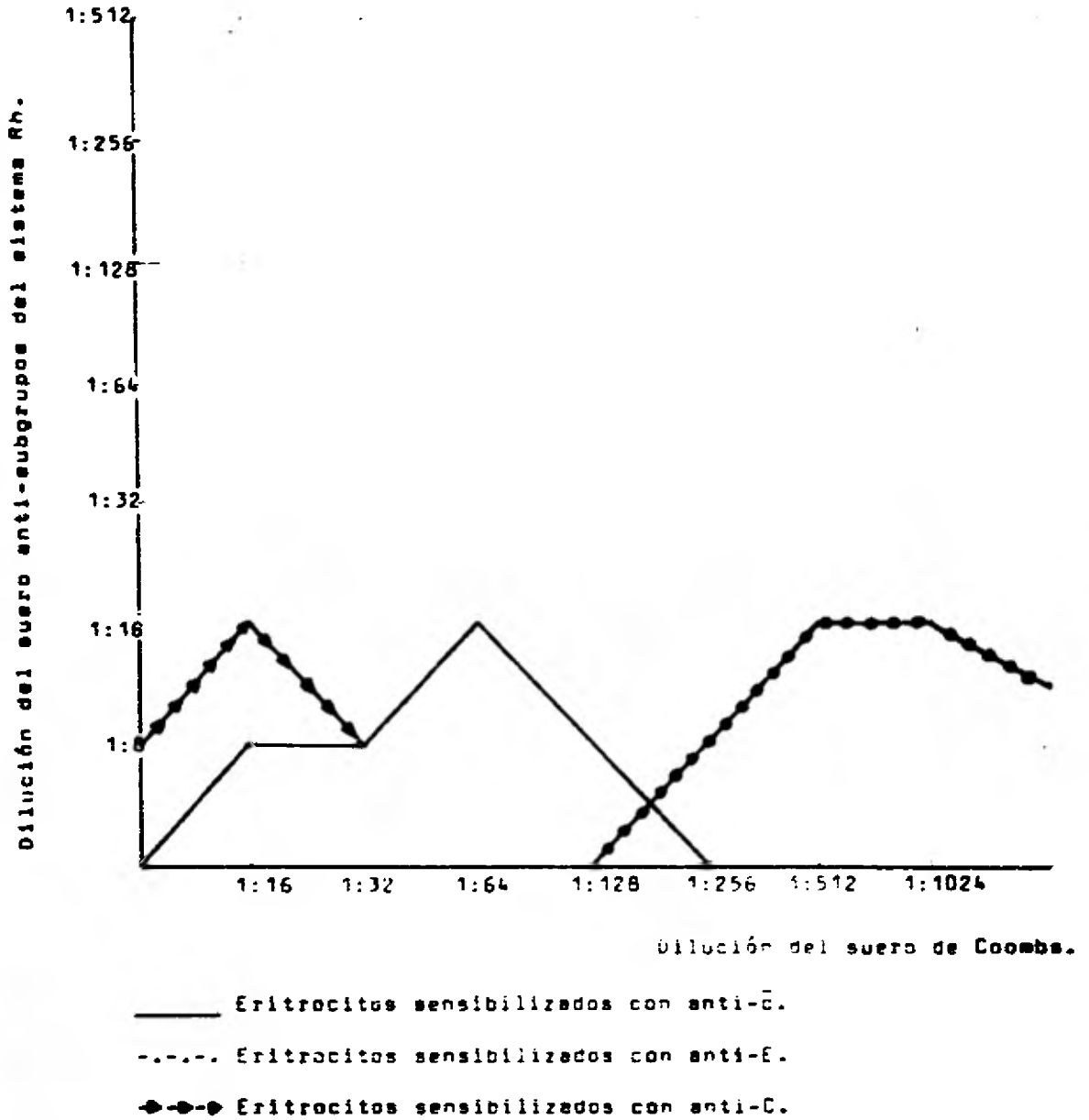
Tabla No. 11

Dilución del suero (↓) anti-C.	Dilución del S.C. II (→).				
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1:8	+	+	++	++++	+

1:16	-	+	+++	++++	-
1:32	-	-	+	++	-
1:64	-	-	-	+	-
1:128	-	-	-	-	-

Grafica # 3b.

SUERO DE COOMBS II FRENTE A SUBGRUPOS DEL SISTEMA RH.



OBSERVACIONES

El suero de Coombs I, tuvo la capacidad para detectar anticuerpos incompletos de los subgrupos del sistema Rh. El título para la detección de el anticuerpo incompleto anti- \bar{C} (diluido 1:64) fué de 1:32, para el anti-E (diluido 1:32) fué de 1:256 y para el anti-C (diluido 1:16) fué de 1:6.

El suero de Coombs II mostró un comportamiento similar al suero de Coombs I. Los títulos para el anti- \bar{C} (diluido 1:16), fué de 1:64, para el anti-E (diluido 1:16) fué de 1:1024 y para el anti-C (diluido 1:16) fué de 1:16.

Sin embargo, el suero de Coombs comercial usado como control tuvo un título mayor frente al suero anti- \bar{C} , en comparación a nuestros sueros hiperinmunes. Pero aún así vimos que estos eran adecuados para ser empleados en las pruebas de rutina en banco de sangre.

Prueba de Coombs para la detección de eritrocitos sensibilizados con suero anti-Lewis^a.

Para determinar si los sueros de Coombs I y II eran capaces de detectar anticuerpos incompletos que radicaban en la fracción no- β -globulina, se usó el suero hiperinmune anti-Lewis^a, adsorbido previamente a eritrocitos humanos homólogos. Se usó este suero, ya que fué el único que pudimos conseguir.

La prueba fué muy similar a las anteriores, pero en este caso se emplearon 2 métodos en medios de reacción distintos; por un lado se hizo la determinación en s.s.i. y por el otro se agregó suero humano fresco como fuente de complemento (15). El suero fué de individuos AB Rh (D) positivo, el cual previamente se cruzó con los eritrocitos sensibilizados con el suero anti-Lewis^a, dando una prueba negativa.

Los resultados obtenidos se mostraron en las tablas 13, 14, 15 y 16, también en las gráficas 4a y 4b.

TABLA No. 13

Suero de Coombs I (Prueba en s.s.i.)								
Dilución del suero (↓) anti-Lewis ^a .	Dilución del S.C.I. (—→)							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
1:2	-	-	+	+	+++	++	-	

1:4	+-	+-	+	++	+	-	-
1:8	+	+	++	+++	+	+	-
1:16	+	+	++	++	+	+-	-
1:32	+-	+	+	+	-	-	-
1:64	-	-	+-	+	-	-	-

TABLA No. 14
 SUERO DE COOMBS I
 (PRUEBA CON SUERO HUMANO)

Dilución del ANTI- LE ^A (↓)	Dilución del suero de Coombs (→)							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1:2	-	+-	+	++	+	+	+-	-
1:4	+-	+	+	+	+	+	+	-
1:8	+	++	++	++	++	+	+-	-
1:16	+	+	++	++	+++	++	+	+-
1:32	+	+	+	++	++	+	-	-
1:64	+	+-	+-	+	+	+-	-	-

TABLA No. 15
 SUERO DE COOMBS II .
 (PRUEBA EN S.S.I.)

Dilución del anti-Le ^B . (↓)	Dilución del suero de Coombs (→)								
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1:2	+	+	+	+	++	+	+	-	-
1:4	+	+	+	++	++	++	++	+	-

1:8	+-	+	+	++	+++	+	+	+	++
1:16	-	-	-	+	++	+	+	+	+
1:32	-	-	-	+	+	++	+	-	-

TABLA No. 16
 SUERO DE COOMBS II
 (PRUEBA CON SUERO HUMANO)

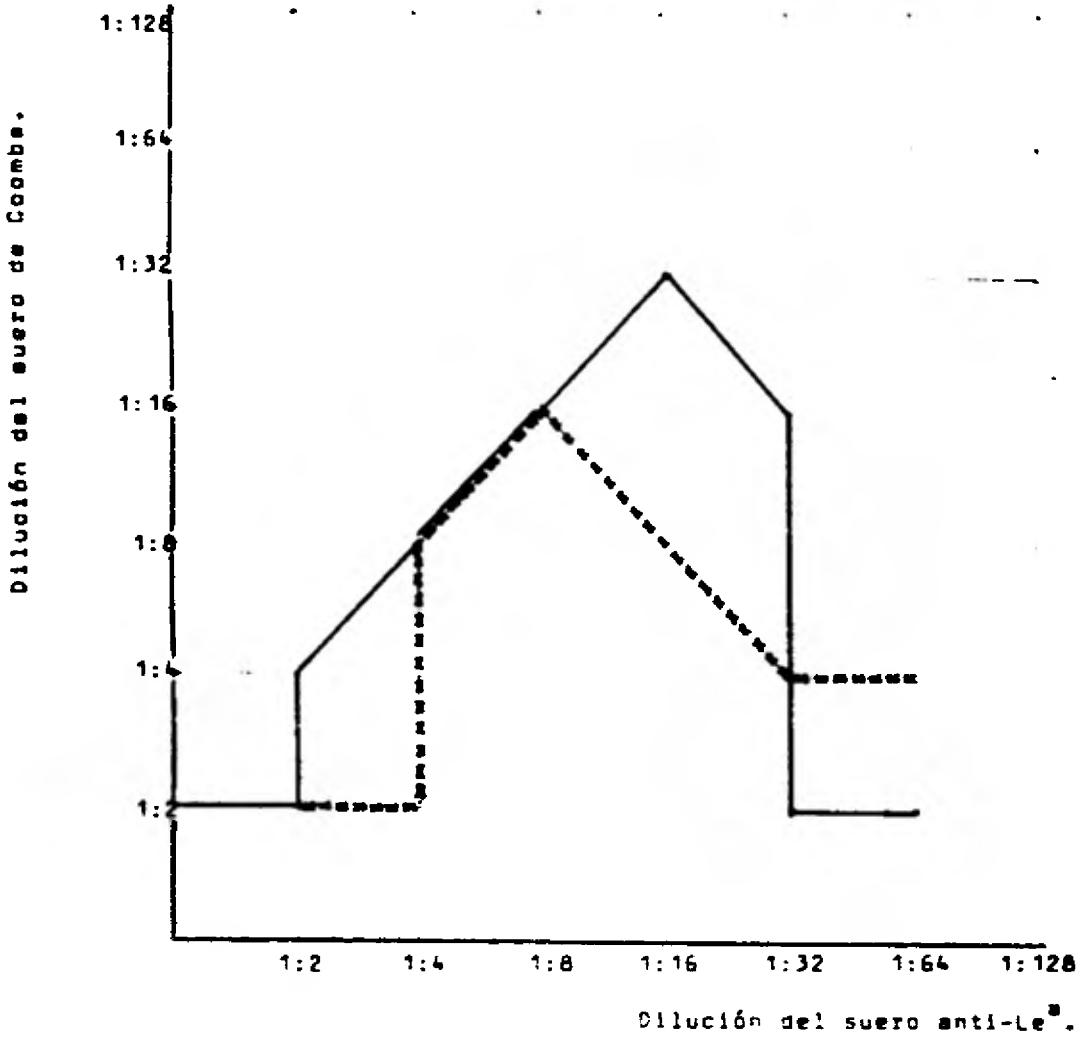
Dilución del anti-Le ^a .	Dilución del Suero de Coombs (→)								
(↓).	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
1:2	-	-	+-	+	++	++	+	-	
1:4	-	-	+	+	+	++	+	+	
1:8	-	+-	+	+	++	++	+	+-	
1:16	+	+	+	+	+++	++	+	-	
1:32	+-	+	+	++	++	+++	+	+	
1:64	-	+	+	++	+++	+	+	+-	
1:128	-	+	+	+	++	+	-	-	

OBSERVACIONES:

Los resultados de la prueba de Coombs en este caso fueron mejor cuando se agregó suero fresco como fuente de complemento, ya que se produjo un aumento del título para los sueros de Coombs I y II en una dilución. Ver gráficas 4a y 4b.

Gráfica # 4a.

PRUEBA DE COOMBS CON GR. SENSIBILIZADOS CON SUERO ANTI-LE^B
S-I

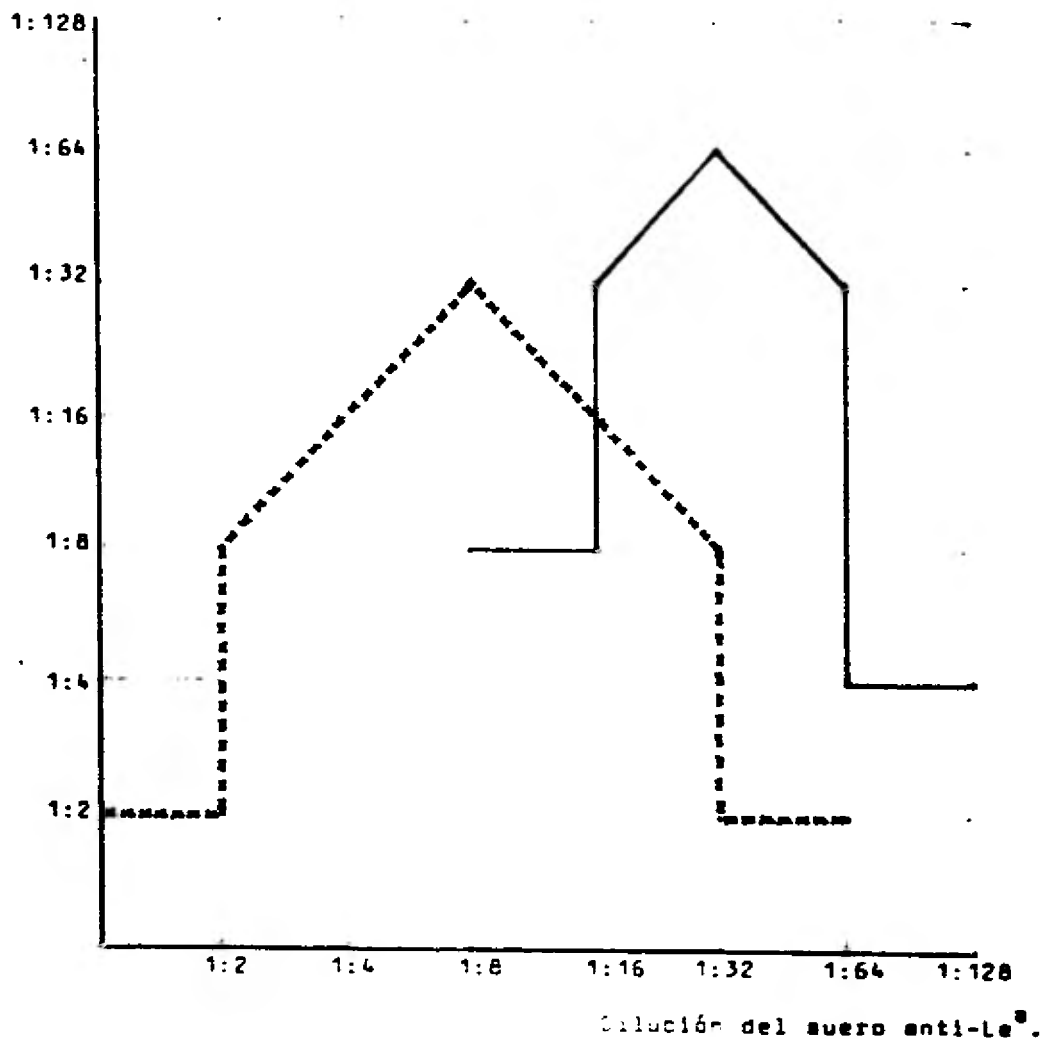


———— Prueba con Complemento.

XXXXXX Prueba sin complemento.

Gráfica # 4b.

PRUEBA DE COOMBS CON GR.SENSIBILIZADOS CON SUERO
ANTI-LE^a. S-II



———— Prueba con complemento.
XXXXXX Prueba sin complemento.

C A P I T U L O VI.

CONCLUSIONES:

1.- La preparación de los antígenos I y II fué bastante satisfactoria en las condiciones utilizadas, porque los sueros hiperinmunes obtenidos con estos antígenos trabajan de manera adecuada, aunque no fué posible establecer una comparación total de ambos antígenos; debido a que al antígeno I no se le cuantificaron las proteínas totales, ni se le hizo electroforesis.

2.- Ambos antígenos contenían las fracciones β y γ -globulínicas, según puede demostrarse por inmunolectroforesis de los sueros hiperinmunes respectivos, así como la ausencia de la respuesta inmune frente a la albúmina, lo cual comprueba la efectividad de los métodos de purificación.

3.- La respuesta inmune de los conejos inoculados, fué bastante satisfactoria, de acuerdo a los títulos obtenidos de anticuerpos específicos.

4.- La respuesta inmune de los conejos inoculados, con antígeno II y adyuvante completo de Freud, fué más satisfactoria en términos de título de anticuerpos específicos, dadas las condiciones empleadas en la preparación de los sueros hiperinmunes.

5.- Las pruebas de control de calidad resultaron satisfactorias para ambos sueros hiperinmunes, en comparación con un suero control de reactividad estandarizada, aunque se recomienda revisar, tanto la obtención de los antígenos, así como los esquemas de inoculación.

6.- Tanto el título de anticuerpos específicos, como los resultados de control de calidad indican que el suero hiperinmune II presenta algunas características más satisfactorias que el suero hiperinmune I, pero ambos son adecuados para las pruebas de rutina de un Banco de Sangre.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- COOMBS R.A; MOURANT and RACE. A new test weak and incomplete Rh agglutinins. LANCET. 7, 15, 1945.
- 2.- COOMBS R. A; MAURANT and Race. A new test for detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Brith. j. Exp. - Path. XXVI, 255 - 1945.
- 3.- COOMBS R.A; MOURANT and RACE. On certain properties of antisera prepared human serum and its various protein fractions; Their use in the detection of sensitilisation of human red cells with incomplete Rh antibody, and on nature of -- this antibody J. Path. Bact. 59, 105, 1947.
- 4.- LDM B. and MESSETER L. Antiglobulin test in low - ionic strength salt solution for rapid antibody screening and crossmatching. Vox Sang. 26, 53, 1974.
- 5.- ROMANO E; HUGES, JONES and MOLLISON. Direct anti-globulin reaction in A.B.O. Haemolytic disease of the newborn. Brit. Med. Jour. 1, 524, 1973.
- 6.- The interpretation of a positive direct anti globulin test. Path. Journal of Haematology. Annotation. 39, 157 1978.

7.- FUDENBERG, HUGH H. and STITES. D. Manual de Inmunología Clínica Ed. El Manual Moderno. 2a/ Edición. México, D. F.; 50 377, 531, 1980.

8.- KABAT E. A; MAYER M. M.; Inmunología experimental. ED. La Prensa Medica Mexicana. 1ra. Edición. México, D.F. 14, 526, 607, 656, 660, 723, 1968. (826 y 830).

9.- DAVIDSON J. and Henry J; Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Ed. Salvat, 6ta. Edición. México, D. F. 566, - 580., 1969.

10.- GORDON B.L. Introducción a la Inmunología. Ed/ - El Manual Moderno, 2da. Edición. México, D.F. 27, 54. 1975.

11.- COHN and STRONGW.L. Preparation and properties of serum and plasma proteins. +V A system components of Biological Tissues and Fluids. J. Biol. Chem. 27, 459. 1945.

12.- CLAUSER J. Técnicas Inmunológicas para la identificación y estimación de macromoléculas. ED. El Manual Moderno. México, D. F. México, D. F. 22, 30, 42, 88, 94, 96. 1975.

13.- NORBERT TIETZ. Química Clínica Moderna. Ed. Interamericana. 1ra. Edición. México, D. F., 178 - 184, 193 - 194 211 - 236. 1972.

14.- CONN S. Bioquímica Fundamental. 3ra. Edición. Mé-
xico, D. F. 596., 1977.

15.- ALLEN PALMER. Manual de Immunohematología. Revi-
sión concisa de principios y procedimientos de laboratorio.
Hyland, 45 - 69, 70 - 75. 1963.

16.- LOWRY, O.H., ROSE BROUGH N.J., FARR L, Y RANDALL
R.J., J. Biol. Chem 193, 265. 1951.

17.- Folin O. Y CIOCALTEU V. J. Biol. Chem. 73, 627.
1927.

18.- HIRSCHFELD J. The Gc. System immunoelectrophore-
tic studies of normal human sera with special reference to a -
new genetically determined system (Gc) thesis In proy. Aller-
gy. 6. 24. 1962.

19.- SWEET L. C., ABRAOMS G.A. and JOHNSON A.G. 94, -
105. 1965.

20.- TEILUM G. Am. J. Path. 32, 945. 1956.

21.- HANSON L.A. Int. Arch. Allergy Appl Immunol. 18.
241. 1961.