

LA DETERMINACION DE GRUPOS SANGUINEOS

(The Determination of Blood Groups).

Medical Research Council War Memorandum N° 9, 1943.

Este Memorandum ha sido publicado por un Comité de Investigaciones sobre Transfusión de Sangre nombrado por el **Medical Research Council**. Los principios técnicos de la determinación de grupos de sangre a los cuales hay que ajustarse estrictamente si han de evitarse errores en los grupos sanguíneos, se conocen mucho menos extensamente de lo que merecen ser conocidos. Los objetos del Memorandum son: (i) describir métodos que han dado resultados satisfactorios en manos expertas, (ii) recomendar ciertos métodos, y (iii) analizar las posibles fuentes de error inherentes a todas las determinaciones de grupos.

Principios del Diagnóstico de los Grupos Sanguíneos ABO.

Los dos aglutinógenos principales A y B determinan, por su presencia o ausencia en los eritrocitos humanos, el grupo sanguíneo; las aglutininas correspondientes anti-A y anti-B se encuentran en los sueros humanos apropiados. La hemoaglutinación se produce siempre que entran en contacto aglutinina y aglutinógeno homólogos. Por consiguiente, los eritrocitos desconocidos se comprueban para hallar su grupo sanguíneo con sueros anti-A y anti-B conocidos. Sin embargo, para conseguir los resultados más fidedignos, se comprueban no sólo los eritrocitos sino también el suero desconocido, proporcionando esta prueba doble una comprobación de errores técnicos o de anotación.

Los Sub-Grupos de A.

Los sub-grupos A_1 y A_1B y A_2 y A_2B pueden ser reconocidos por el hecho de que los glóbulos de sangres A_2 , y especialmente de A_2B , reaccionan más débilmente que los de A_1 y A_1B con sueros de prueba anti-A. Casi todos los sueros anti-A procedentes de donadores del grupo B y del grupo O, contienen las aglutininas alfa y alfa₁. Las alfa reaccionan con todos los sub-grupos de A mientras que las alfa₁, sólo reaccionan con los subgrupos de A_1 y A_1B . Para comprobar los subgrupos se obtiene alfa₁ libre de alfa, absorbiendo suero anti-A con una cantidad adecuada de glóbulos A_2 . Los sueros de 1 a 2% de personas A_2 y del 25% aproximadamente de las personas A_2B contienen la aglutinina alfa₁. Existe aún otra aglutinina, anti-O (alfa₂) que reacciona con todos los glóbulos O y con la mayor parte de los

A₂. Esto se encuentra muy de tarde en tarde con sueros A₁, B, y A₁B. Un cuadro ilustra los grupos y sub-grupos con sus aglutininas de suero que se presentan de ordinario y las posibles extra-aglutininas.

Métodos.

(1) **Método en Tubo.** 0.08 cm.³ de suero anti-A de título elevado diluido con una cantidad igual de solución salina normal y una cantidad semejante de suero anti-B de título elevado diluido, se hacen pasar mediante pipetas graduadas Pasteur a tubos de ensayo de 2" X 1/4" (aproximadamente 5.0 X 0.6 cm.). A cada tubo se añade 0.08 cm.³ de una suspensión al 5% de la sangre desconocida en citrato de sodio al 3%. Con porta-tubos adecuados y una disposición standard de estos últimos, pueden llevarse a cabo simultáneamente gran número de pruebas. En la misma forma deberán comprobarse, a modo de controles, glóbulos de grupos conocidos A.B y O. Los tubos se agitan y se dejan a temperatura ambiente durante dos horas. El contenido de cada tubo que no muestre entonces aglutinados indudables al tropezarlo con el dedo se examina microscópicamente. Las aglutininas en el suero se prueban con una técnica similar, empleando glóbulos conocidos de A₁ y B. En estas pruebas es importante buscar las reacciones A débiles con suero anti-A y no olvidar que en los sueros de los grupos A₂ y A₂B puede presentarse la aglutinina alfa₁.

(2) **Método en Loseta.** Sobre una loseta plana, blanca, de cristal opalino, calentada, se colocan en el espacio a la izquierda 0.05 cm.³ de suero anti-B de título elevado y una cantidad igual de suero anti-A de título elevado en el espacio a la derecha; a cada uno de ellos se añaden 0.05 cm.³ de la suspensión de glóbulos rojos. La loseta se hace oscilar suavemente para asegurar la mezcla, y se deja reposar durante 10-15 minutos. Al ser agitada, si hay aglutinación podrá observarse fácilmente sobre el fondo blanco. Los sueros desconocidos se prueban del mismo modo con glóbulos conocidos. En lugar de usar sangre diluida, puede asimismo usarse sangre sin diluir a condición de que la cantidad de sangre añadida sea suficiente para colorear la mezcla en un rosa ligero solamente. Con esta técnica debe hacerse la lectura en 2 a 4 minutos. Pasado este tiempo puede producirse pseudo-aglutinación.

Recomendación 1. El método en tubos es más de confianza, pero donde esto resulte impracticable se recomienda una técnica con loseta, utilizando sangre diluida. La sangre sin diluir no deberá ser empleada a menos que los investigadores hayan tenido larga experiencia de la técnica.

Recomendación 2. En el caso de sangre destinada a transfusión, los glóbulos deberán ser examinados en busca de aglutinógenos y el suero en busca de aglutininas. La doble comprobación es esencial.

Contrastación Directa.

La contrastación directa de los glóbulos del donador con el suero del receptor antes de la transfusión es sumamente importante. Sólo deberá ser omitida en casos de suma urgencia. La técnica recomendada es fundamentalmente la misma que ya ha sido descrita.

Propiedades Esenciales de los Sueros de Prueba.

El suero a emplear para la determinación de grupo debe llenar ciertas condiciones. (i) Título elevado. Sólo deberán usarse los sueros de título elevado, de preferencia contrastados con el standard del **Medical Research Council**. Pueden obtenerse standards en forma desecada. (ii) Capacidad de

reaccionar con glóbulos A_2 y A_2B . El suero anti-A deberá ser titulado con el fin de determinar su capacidad de reaccionar con glóbulos A_2B . (iii) Ausencia de aglutininas en frío. (iv) Ausencia de tendencia a producir formación de rouleaux. (v) Que no contengan grasa.

Conservación de Sueros de Prueba.

(i) Temperatura: los sueros de prueba deberán conservarse, a ser posible, congelados sólidos. Si se conservan de este modo su potencia se mantiene casi indefinidamente. Si se conservan a 2-4° C. su potencia se mantiene durante un período variable. (ii) Volumen: el suero deberá conservarse en frascos o ampollas que contengan cantidades adecuadas a las necesidades particulares de los investigadores que han de usarlos. Es más satisfactorio preparar frecuentemente pequeñas cantidades que mucho de una vez. (iii) Asepsia: la esterilidad es importante pero no deberá añadirse antiséptico alguno a los sueros de prueba. (iv) Suero para determinación de grupos desecado: el suero completamente desecado, bien sellado en ampollas bajo nitrógeno, se conservará indefinidamente sin refrigeración.

Posibles Fuentes de Error en las Determinaciones de Grupo Sanguíneo.

(a) Técnicas: los falsos resultados negativos pueden ser debidos a: (i) no haber empleado sueros de título elevado, (ii) no haber usado suero anti-A capaz de reaccionar con glóbulos A_2 y A_2B , (iii) no haber tenido en cuenta el factor tiempo, (iv) el uso de suero infectado. Los falsos resultados positivos pueden ser debidos a: (i) pseudo-aglutinación o formación de rouleaux, (ii) aglutinación en frío, (iii) al empleo de suspensiones de glóbulos infectadas, (iv) al uso de suero infectado. (b) Errores de anotación: estos sólo pueden ser evitados comprobando cuidadosamente en cada momento por aquellos a quienes corresponda hacerlo.

El Factor Rh.

Los eritrocitos humanos pueden contener además de los aglutinógenos A y B una variedad de componentes antigénicos, de los cuales el más importante es el factor Rh. El 15% de los sujetos Ingleses blancos, en cuyos eritrocitos falta este factor están predispuestos a formar una aglutinina contra este aglutinógeno si este se introduce en su circulación. Esto puede ocurrir en el embarazo o con las transfusiones. El ideal sería que las personas Rh-negativas sólo fuesen transfundidas con sangre Rh-negativa. No obstante, en la actualidad, este ideal debe ser considerado como impracticable.

Pruebas para Aglutinógenos y Aglutininas Rh.

Origen de los sueros de prueba: (i) Un animal, de preferencia el cobarra, puede ser inmunizado dándosele una serie de inyecciones de sangre del mono *Macacus rhesus*. (ii) Puede obtenerse suero de un ser humano que haya quedado inmunizado al antígeno Rh. Los sueros animales tienen que ser absorbidos (liberados de otros anticuerpos que actúan sobre los eritrocitos humanos) pero pueden ser producidos a voluntad. Con sueros humanos puede obtenerse una cantidad relativamente grande con poco esfuerzo pero, naturalmente, puede contener aglutininas anti-A o anti-B. De ser preciso, estos sueros humanos pueden ser absorbidos con sangre A o B Rh-negativa o neutralizados con la saliva humana apropiada (que contiene antígenos).

Método.

Un volumen de suspensión de sangre al 2% se coloca con un volumen del suero de prueba en un tubito de 7 mm. de diámetro. Es conveniente com-

probar los glóbulos por lo menos con tres sueros diferentes. Al propio tiempo se contrastarán glóbulos Rh-positivos y Rh-negativos conocidos con el mismo suero para que actúen como controles. Los tubos se dejarán por lo menos una hora y preferiblemente dos horas en un baño de maría o incubador a 37° C. Los sedimentos se examinan entonces con una lupa. Cuando la reacción es negativa, el sedimento se ve que es homogéneo y que tiene un borde circular netamente definido. Cuando la reacción es positiva el sedimento aparece granuloso y el borde dentado. Cuando los tubos han sido así examinados, se retira **delicadamente** un poco del sedimento de cada tubo por medio de una pipeta Pasteur y se extiende **delicadamente** sobre un porta. Se ven aglutinados con aquellas sangres que dan una reacción positiva. En caso de discrepancia entre los aspectos macroscópicos y los microscópicos es aconsejable creer en el resultado microscópico.

Al comprobar suero desconocido para aglutininas anti-Rh, se sigue un procedimiento similar utilizando dos sangres Rh-positivas conocidas y dos sangres Rh-negativas conocidas como glóbulos de prueba.

Algunos sueros que contienen aglutininas anti-Rh presentan "zonas" (cuya intensidad de aglutinación no está en proporción directa con la dilución). Puede ser por tanto necesario hacer pruebas con diluciones en serie del suero frente a sangres Rh-positivas conocidas.

Recomendaciones. (i) Las madres de niños que manifiesten signos de **erythroblastosis foetalis** no deberán recibir transfusiones de sangre a menos que se disponga de sangre Rh-negativa conocida del grupo ABC adecuado. En casos de urgencia, puede usarse plasma o suero en lugar de sangre completa. (ii) Los receptores de uno u otro sexo de los que se sospeche que han sido inmunizados al factor Rh no deberán recibir más transfusiones de sangre completa a menos que se disponga de sangre Rh-negativa de grupo ABO adecuado. (iii) Cuando se administran transfusiones a niños afectados de **erythroblastosis foetalis**, siempre que sea posible, deberá usarse sangre de un donador del grupo O Rh-negativo.

Entrenamiento del Personal.

Todas las determinaciones de grupo sanguíneo sólo deberán confiarse a personal que haya pasado por un período de entrenamiento suficiente en un laboratorio acostumbrado a este trabajo. Se insiste mucho en la necesidad de emplear personal entrenado, ya que hasta la fecha ha existido cierta tendencia a considerar que se puede enseñar a cualquiera a determinar grupos sanguíneos en pocos minutos. Es esencial, si han de evitarse errores, que quienes están haciendo determinaciones de grupos sanguíneos comprendan perfectamente los principios básicos del método.

PRUEBAS EN BUSCA DE FACTOR Rh Y SU ANTICUERPO

(Tests for the Rh Factor and its Antibody)

Por G. L. Taylor, *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 36, 225-226, marzo, 1943.

Este trabajo, que da cuenta de la labor realizada por el autor bajo los auspicios del **Medical Research Council**, en el Equipo Serológico del **Galton Laboratory** de Cambridge, no puede abreviarse mucho y se reproduce a continuación con sólo unas cuantas modificaciones y omisiones.

La presencia de antígeno Rh en los eritrocitos se descubre mediante aglutinación al ser añadido suero que contenga la correspondiente aglutinina anti-

Rh. Los sueros para determinar grupos se obtienen (i) del conejo o cobaya inyectados con eritrocitos de *Macacus rhesus*; (ii) de madres de niños eritroblastósicos o de personas que hayan sufrido reacciones hemolíticas a la transfusión debidas a Rh.

La preparación de sueros animales es difícil. Pocos sueros humanos son bastante fuertes, pero, en opinión del autor, resultarán probablemente los más convenientes y se prepararán de las madres de niños eritroblastósicos.

Descubrimiento de anti-Rh. Se calienta suero durante quince minutos a 56° C. y a continuación se mezcla con glóbulos de dos donadores fuertemente positivos, por lo menos, con glóbulos negativos y con glóbulos del donador del suero; algunos sueros aglutinan sus propios glóbulos y éste es un control necesario. Los glóbulos positivos y negativos conocidos, deberán pertenecer al grupo O para evitar la posibilidad de reacciones debidas al sistema de grupos A-B-O. La mayor parte de las pruebas de determinación de grupos se hace en un porta, loseta o placa, pero para trabajar con Rh hay que usar tubos. Los tubos del autor miden dos pulgadas de largo por un cuarto de pulgada de diámetro (aproximadamente 5.0 X 0.6 cm.) y en ellos se prepara una serie de diluciones crecientes del suero. En el primer tubo el suero está sin diluir; en el segundo, diluido 1:2; en el tercero, 1:4 y así sucesivamente en 6 ó 7 tubos. A cada tubo se le añade un volumen de suspensión de eritrocitos (1 a 2% de sangre completa) de un donador fuertemente positivo. Los glóbulos y el suero se mezclan tomando un tubo y moviendo con el dedo, y en cada tubo se coloca una tapa de cristal para evitar la evaporación y que sirva de lugar para marcar los datos de las pruebas. A otras series idénticas se les añaden glóbulos de un segundo sujeto fuertemente positivo, glóbulos negativos, y glóbulos del donador del suero. Si el donador es la madre de un niño eritroblastósico, y si lo permiten los grupos A-B-O, y si se dispone de glóbulos, el suero se titula asimismo con glóbulos del niño y del padre. Los tubos se conservan a temperatura ambiente y una serie idéntica en la incubadora a 37° C. Algunos sueros humanos anti-Rh reaccionan mejor a temperatura ambiente y otros a temperatura del cuerpo. La inmensa mayoría lo hace mejor a temperatura del cuerpo que a temperatura ambiente.

Al cabo de una hora, o mejor al cabo de dos, se hace la lectura. El carácter del sedimento en el fondo del tubo da una buena idea de si hay grumos o no. Se quita la tapa y se examina el sedimento con una lupa de mano, pero el diagnóstico final se basa en el examen microscópico. Se necesita el mayor cuidado y delicadeza al pasar una parte del sedimento a un porta de microscopio; la más ligera torpeza puede echar a perder algunas de las reacciones más débilmente positivas y registrarse un falso negativo. Las buenas reacciones se ven fácilmente; los glóbulos de reacción débil pueden causar dificultades. Al sedimentarse, los glóbulos se agregan y un principiante puede tomar por una verdadera aglutinación una agregación grumosa de glóbulos; tales agregaciones se van deshaciendo gradualmente. El autor recomienda este procedimiento porque: (i) la titulación indica la concentración de cualquier anticuerpo presente, (ii) un suero, cuando está sin diluir, no reacciona con algunos glóbulos positivos pero, al ser titulado, da reacciones definidas en algunas diluciones.

Cuando las pruebas sugieren que hay anti-Rh, el suero se mezcla con glóbulos positivos de otros cuatro o cinco donadores y con una o dos clases de glóbulos negativos, y si reacciona con todos o con casi todos los positivos y con ninguno de los negativos, parece seguro que existe anti-Rh. Cuando todos los positivos reaccionan y los negativos no, una simple suma da exactamente las probabilidades de que el suero contiene anti-Rh. El autor aconseja esta técnica de titulación en pruebas de compatibilidad directas entre el suero del receptor y los donadores potenciales de glóbulos.

Con buenos sueros, los eritrocitos pueden agruparse para Rh mediante métodos similares a los ya descritos. La titulación no es necesaria y un suero que requiere titulación no se usará. Se mezcla un volumen de suero con un volumen de eritrocitos y para evitar cualquier tendencia a dar falsa aglutinación, se añade un volumen de solución salina. Los tubos de prueba se conservan a temperatura ambiente o a la temperatura de la incubadora, según la que sea mejor para los sueros en uso. Deberá evitarse reunir anticuerpos y antígenos de los grupos A-B-O, ya que de otro modo no puede hacerse la determinación de grupo Rh. Anti-A o anti-B en un suero puede ser absorbido por una mezcla con glóbulos apropiados, por ejemplo, con glóbulos A Rh-negativos se eliminarán los anti-A y quedarán anti-Rh. Mezclando el suero con la saliva de una persona que secrete el antígeno apropiado, también se eliminarán los anticuerpos A-B-O. Alrededor del 80% de las personas secretan en la saliva los antígenos A-B-O presentes en sus glóbulos rojos. Si se dispone de cantidades de sueros Rh de todos los cuatro grupos de sangre, no hay necesidad de la absorción.

No deberán diagnosticarse glóbulos como negativos a menos que hayan sido comprobados con tres sueros anti-Rh fuertes por lo menos. Algunos sueros reaccionan bien con todos menos con algunos glóbulos Rh-positivos. Un suero puede reaccionar bien con los glóbulos de *x* y mal o no reaccionar en absoluto con los de *y*, mientras que otro reacciona bien con *y* y mal con *x*. Si un suero tiende a dar ligeras reacciones positivas falsas, el referido a las reacciones dadas por otros sueros ayudará al diagnóstico.

Las pruebas de Rh son difíciles y necesitan considerable experiencia, pero irá dejando de ser un arte para pasar a ser una ciencia cuando se disponga de buenas cantidades de sueros realmente fuertes, y estos han de venir de los clínicos que tienen a su cargo madres de niños eritroblastósicos.

En el Equipo del autor, se ha examinado sangre de 49 madres de niños eritroblastósicos; 43 fueron Rh-negativas y en los sueros de 37 de ellas se encontró anti-Rh. En una muestra tomada al azar de 49 mujeres sólo es de esperar que haya 7 u 8 Rh-negativas. No hay duda alguna de que el factor Rh desempeña un papel especial en la producción de la mayor parte de los casos de **erythroblastosis foetalis**.

HEMOGLOBINOMETRIA Y EL USO DEL HEMATOCRITO:

Informe presentado al Traumatic Shock Committee del Medical Research Council.

(Haemoglobinometry and the Use of the Haematocrit: A Report to the Traumatic Shock Committee of the Medical Research Council).

British Medical Journal, 1, 209-212, 20-2-43.

Desde hace algunos años se ha renovado el interés por el problema del "shock" por heridas. Con el desarrollo de la técnica de la transfusión de sangre en gran escala, y especialmente con la introducción de la transfusión de plasma, se consiguieron grandes adelantos en el tratamiento de este estado. Era sin embargo evidente que todavía se precisaba mucha labor de investigación, y de acuerdo con ello, el **Medical Research Council** nombró un Comité para el estudio del "shock" traumático. Como quiera que dicho organismo observara en seguida que la falta de uniformidad de métodos para determinar los diversos constituyentes de la sangre estorbaba al progreso de dicho estudio, se nombró un subcomité para que informase sobre el método en uso. En el presente informe se exponen los hallazgos y recomendaciones de dicho sub-comité.

Se estudia primero brevemente la complejidad de la química de la hemoglobina. En la sangre venosa normal, la hemoglobina existe principalmente en dos formas —oxihemoglobina (O_2 -Hb) y hemoglobina reducida (Hb). También puede encontrarse en la sangre normal hasta 3% de metahemoglobina (met-Hb) formada por la reducción del hierro ferroso en O_2 -Hb o Hb. En los habitantes de ciudades o en las personas que fuman mucho también puede existir hasta 3% de carboxyhemoglobina (CO-Hb); ésta es 210 veces más estable que O_2 -Hb y no lleva oxígeno. En el envenenamiento por monóxido de carbono de 20 a 50% del total de Hb puede ser CO-Hb. Durante el tratamiento con ciertos medicamentos, especialmente con sulfanilamida, tanto met-Hb como sulfahemoglobina (S-Hb) pueden hallarse en cantidades apreciables. Ninguno de estos compuestos lleva oxígeno a los tejidos. La presencia simultánea de varios de estos compuestos en lo que da lugar a las dificultades en la determinación de la hemoglobina.

Existen cinco tipos de métodos usados para la determinación de la hemoglobina: (a) aquéllos que comprenden el análisis de gas son seguros en manos experimentadas, pero no son apropiados para uso general. Miden la capacidad de oxígeno de la sangre. (b) Los métodos colorimétricos son aquellos en los cuales el color que aparece en la solución de ensayo se compara con un standard. En (c) los métodos foto-métricos y (d) foto-eléctricos es la cantidad de luz que pasa por la solución lo que se calcula. Ambos tipos se encuentran sujetos a diversas fuentes de error de las cuales es una de ellas el factor humano. Este error se elimina en los métodos foto-eléctricos en los que la cantidad de luz transmitida se mide mediante una célula foto-eléctrica. La célula misma no obstante, introduce nuevos errores.

El quinto tipo consiste en (e) métodos para determinar el contenido en hierro de glóbulos rojos lisados bien lavados. El sub-comité considera que este es el método mejor de comprobar todos los demás y prefiere el método de titulación de hierro férrico con sulfato titanoso (Klumpp, 1934).

Para todas las determinaciones se recomienda tomar sangre venosa sin estasis, aunque si es preciso utilizar sangre capilar se puncionará el lóbulo de la oreja, mejor que la yema del dedo.

Como existiese una falta de estandarización en los instrumentos de que se dispone en el comercio, el sub-comité recurrió a la **British Standards Institution**. En unión de la misma investigación estandarizaron el hemoblobinómetro de Haldane-Gowers, instrumento sencillo y muy conocido en el que se emplea CO-Hb. El sub-comité recomienda el empleo de instrumentos que respondan a su especificación B. S. (Standard Británico) N° 1079-1942. En ella se han definido con exactitud las formas de pipetas, tubos de dilución y tubos de color. Los instrumentos pueden ser comprobados para su conformidad con este standard por el **National Physical Laboratory** (Laboratorio Físico Nacional). Es de esperar que la adopción de este standard pueda conducir a la uniformidad que es esencial si han de compararse los resultados hematológicos. Donde no se disponga de CO, el método de hematina ácida de Sahli puede ser empleado. La **British Standards Institution**, se propone estandarizar asimismo este instrumento. El sub-comité hace notar que el standard que ahora se propone es solamente un standard **interino**, hasta que haya sido definido otro más satisfactorio, relacionado con la hemoglobina total en la sangre humana normal.

El hematocrito se emplea para determinar tanto la proporción relativa de células a plasma como el volumen total de glóbulos rojos en un volumen dado de sangre. Desde aquí, conociendo asimismo el recuento total de hemáties, el volumen corpuscular medio de los mismos puede ser calculado. Se recomienda el método de Wintrobe & Landsberg (1935).