

## LABORATORIO N°1: "DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS Y TITULACIÓN DE ANTISUEROS"

### 1.- INTRODUCCIÓN

El procedimiento de la determinación de los grupos sanguíneos es una de las metodologías habituales e imprescindibles para procesos médicos o clínicos como es la transfusión de sangre. La razón está en que el sistema inmunológico puede generar un rechazo por que reacciona a la presencia de agentes extraños. Este tipo de reacción esta mediada por anticuerpos y es fácilmente observable por reacciones de aglutinación. Se conocen más de 20 grupos de antígenos de los glóbulos rojos codificados en locus genéticos diversos, para los cuales existen múltiples variantes alélicas. El resultado son más de 200 antígenos eritrocitarios identificables.

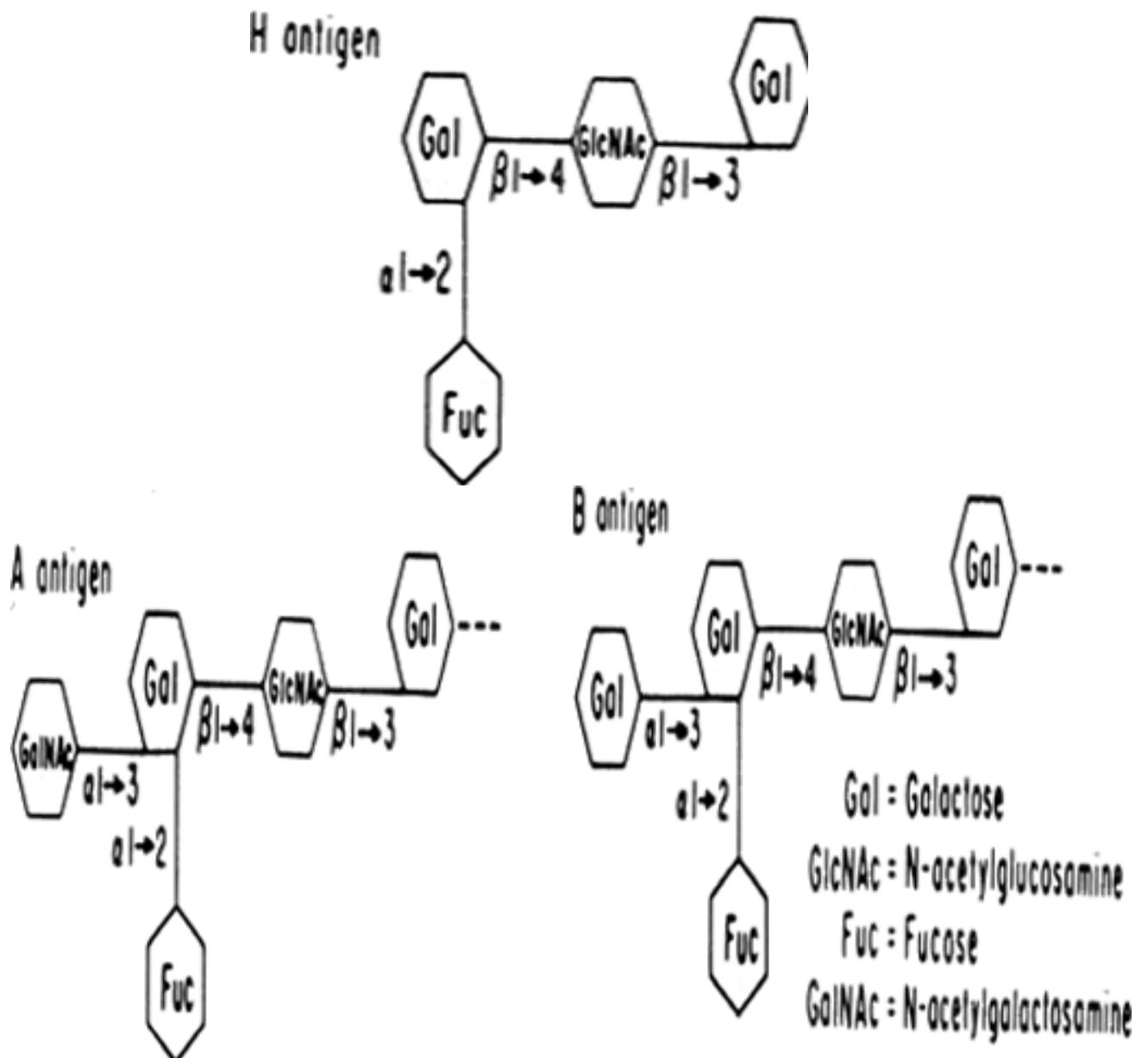
Estos antígenos varían en su inmunogenicidad. Los más importantes para efectos de transfusiones sanguíneas son los antígenos del sistema H / ABO y los del sistema Rhesus (Rh).

A continuación se presenta una reseña de estos dos sistemas que le permitirán comprender con mayor facilidad el práctico a realizar.

#### 1.1. Sistemas H y ABO

En estos sistemas los epítomos responsables son carbohidratos que aparecen como glicoesfingolípidos en la membrana plasmática y también como glicoproteínas. El gen H codifica la enzima fucosil transferasa, que agrega fucosa a una cadena oligosacárida precursora. Los tres últimos azúcares de la cadena se denominan antígeno H (Figura 1). En otro locus aparte está el sistema ABO, con tres alelos. El alelo A codifica una enzima transferasa que une N-acetil galactosamina a la cadena H, mientras que el alelo B codifica otra enzima transferasa que une una galactosa. El alelo O no produce la enzima transferasa y por tanto no modifica la sustancia H. El azúcar unido al carbono 3 de la galactosa determina la actividad antigénica. La galactosa no acepta azúcar en el carbono 3 a no ser que haya fucosa unida al carbono 2.

Figura 1. "Esquema de los residuos oligosacáridos de los sistema H/ABO"



Cabe destacar que estos genes son codominantes, es decir que, los individuos que expresan los alelos A y B tendrán oligosacáridos con los dos tipos de modificaciones. Así, se distinguen 4 grupos dependiendo de cómo se presenta el genotipo, teniendo: A, B, AB y O. La importancia asociada a las transfusiones de estos antígenos radica en que las personas de un grupo sintetizan anticuerpos frente a los oligosacáridos que no están en sus glóbulos rojos (Tabla 1). Estos anticuerpos, que se denominan isoaglutininas y que suelen ser IgM, aparecen en grandes cantidades en circulación sin necesidad de exposición previa a sangre de otros grupos. La razón parece estar en la reactividad cruzada de sustancias presentes en bacterias de la flora intestinal.

**Tabla 1: "Tabla de los antígenos eritrocitarios asociados a los grupos sanguíneos"**

Grupo sanguíneo	Genotipo	Antígenos eritrocitarios	Anticuerpos séricos
A	AA, AO	A	Anti-B
B	BB, BO	B	Anti-A
AB	AB	A y B	-
O	OO	H	Anti-A, Anti-B

### 1.2 Sistema Rhesus:

Se han identificado más de 40 antígenos del sistema Rh aunque no se sabe cuántos genes son responsables de este sistema. Son proteínas integrales de membrana con un contenido lipídico alto. D es el antígeno Rh más inmunogénico y por tanto el más importante a efectos transfusionales. La presencia de D da lugar al Rh+, mientras que la ausencia (d) da lugar al Rh-. Los anticuerpos anti D, que son IgG, aparecen en la circulación de los individuos Rh- sólo tras una exposición previa a sangre D, por ejemplo por una transfusión de hematíes o tras la gestación de un feto D.

### 1.3 Determinación de antígenos eritrocitarios y anticuerpos séricos

Antes de una transfusión se deben analizar los eritrocitos del receptor para ABO y D mediante antiseros anti-A, anti-B y anti-D. Simultáneamente se analiza el suero para detectar anticuerpos contra antígeno eritrocitarios (isoaglutininas), mediante hematíes A y B previamente tipificados. Las reacciones positivas dan lugar a la aglutinación de los glóbulos rojos. Para asignar un grupo sanguíneo, ambas pruebas deben dar un resultado coincidente. Los resultados discrepantes deben analizarse cuidadosamente. Un test adicional es la prueba cruzada, que examina la compatibilidad entre suero del receptor con los hematíes del/los donantes. Para ello, hematíes lavados del donante se mezclan con suero del receptor, se incuban, se centrifuga y se examina para hemólisis y aglutinación

## 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Analizar e interpretar reacciones de aglutinación.
- Determinar los grupos ABO y Rh (D) en hematíes.
- Determinar ABO en suero.
- Obtener antisueros para tipaje.
- Titular un antisuero.

## 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL:

### 3.1 Determinación de ABO y Rh (D) en hematíes

- 1) Preparar un portaobjetos y un tubo Eppendorf rotulado con las iniciales del individuo (se debe preparar uno por cada integrante del grupo). En este último se pipetea 1 ml de suero salino fisiológico.
- 2) Desinfecte un dedo con un algodón humedecido en alcohol al 70% y se pincha con la lanceta.
- 3) Sobre un portaobjetos se depositan tres gotas de aproximadamente 0.5 cm de diámetro (25-50  $\mu$ l) bien separadas. (Pueden realizarlo en portaobjetos separados si les complica trabajar con volúmenes tan pequeños)
- 4) Tomar 10  $\mu$ l de sangre y pipetearlos en el tubo eppendorf (maneje con delicadeza las micropipetas). Guardar a temperatura ambiente, se procesará al final.
- 5) Sobre cada gota de sangre del porta se pipetea 25  $\mu$ l de antisuero (cambie la punta de la micropipeta y mantenga un recipiente con alcohol yodado donde ira agregando las puntas sucias). El orden recomendable es anti-A, anti-B, anti-D.
- 6) Mezclar con una punta de pipeta durante unos segundos.
- 7) Determinar la aglutinación e interpretar el resultado. Puede visualizarse en el microscopio en caso de reacción muy débil.
- 8) Determinar la frecuencia de cada grupo en la clase y compararla con las frecuencias establecidas.

Grupo	% en la clase
A	
B	
AB	
O	
Rh negativo	

### 3.2 Lavado y preparación de eritrocitos al 2%

- 1) Rotular los tubos eppendorf de los 10  $\mu$ l de sangre con el grupo hemático obtenido (A, B, AB, O). (el que acaba de determinar).
- 2) Centrifugar el tubo 1 minuto a velocidad alta. (15.000 a 20.000 r.p.m) si la centrifuga no alcanza las velocidades señaladas, haga una razón de 2 a 3 ciclos)
- 3) Descartar el sobrenadante, realícelo con la micropipeta con cuidado de no pasar a llevar el pellet.
- 4) Resuspender el pellet y añadir 1 ml de suero fisiológico.
- 5) Repetir los pasos 2 y 3.
- 6) Resuspender en 490  $\mu$ l de suero fisiológico. A esto se denomina hematíes al 2% (v/v). Estos hematíes serán compartidos por todos los alumnos del grupo.

### 3.3 Determinación de ABO en suero o plasma

- 1) Centrifugar la sangre 5 minutos a 4000 r.p.m.
- 2) Extraer el suero (o plasma) y depositarlo en un tubo eppendorf.
- 3) Lavar y diluir hematíes A y B al 2% (v/v) en suero fisiológico.
- 4) Pipetear 50  $\mu$ l de suero en dos tubos de poliestireno de 10x70 o en dos pocillos. Pueden también prepararse controles negativos (suero fisiológico) y positivos (suero anti-A,B).
- 5) Pipetear 25  $\mu$ l de hematíes A en un tubo (o pocillo) y hematíes B en el otro y mezclar.
- 6) Centrifugar a 400xg 15 segundos.
- 7) Dispersar el pellet y determinar aglutinación.

### 3.4 Obtención y titulación de antisueros anti-A, anti-B y anti-A,B a partir de muestras de plasma.

- 1) Tomar 5 tubos de sangre anticoagulada con EDTA elegidos al azar.
- 2) Centrifugar la sangre 5 minutos a 400xg.
- 3) Extraer cuidadosamente el plasma y depositar en un tubo eppendorf rotulado con el número de la muestra. El pellet celular se reserva por si fuera necesario posteriormente.
- 4) En una gradilla colocar 15 tubos de poliestireno de 10x70 (5 filas x 3 columnas) (o utilizar una placa microtiter de fondo en U)

- 5) Pipetear 50  $\mu$ l de cada plasma en los 3 tubos (pocillos) de cada fila (Tabla de resultados).
- 6) En los 5 tubos de la primera columna pipetear 25  $\mu$ l de hematíes A. En las columnas 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> pipetear 25  $\mu$ l de hematíes B y O respectivamente. Puede procesarse una 4<sup>a</sup> columna de tubos si se hubieran encontrado hematíes AB (será un control positivo).
- 7) Incubar 5 minutos.
- 8) Centrifugar a 400xg 15 segundos.
- 9) Dispersar el pellet y determinar aglutinación. (Si se ha trabajado en placa, dispersar el pellet con una pipeta y observar al microscopio invertido, centrándose en el fondo del pocillo). Calificar cada tubo o pocillo con -, + y ++ según la aglutinación observada y anotar en la tabla de resultados.
- 10) Preparar pooles de antisueros anti-A, anti-B y anti-A,B mezclando todos los obtenidos en el grupo de prácticas.
- 11) Titular los pooles de antisueros obtenidos (uno cada pareja de prácticas). Para ello, llevar a cabo una dilución seriada 1/2 y analizar la aglutinación de una cantidad constante de hematíes A o B, tal y como se describe a continuación.
- 12) Tomar 8 tubos y rotular 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128.
- 13) Pipetear 50  $\mu$ l de suero salino fisiológico en todos los tubos excepto en el rotulado como 1.
- 14) Pipetear 50  $\mu$ l de antisuero en el primer y segundo tubo y mezclar. Del segundo tubo tomar 50  $\mu$ l y pasarlos al siguiente, y así sucesivamente. Descartar 50  $\mu$ l del último tubo.
- 15) Pipetear 25  $\mu$ l de hematíes que correspondan y mezclar.
- 16) Incubar 5 minutos.
- 17) Centrifugar a 400xg 15 segundos.
- 18) Dispersar el pellet y determinar aglutinación. Anotar en la tabla.
- 19) El título del antisuero será la inversa de la máxima dilución aglutinante.

Tabla de resultados

HEMATÍES	A	B	O
PLASMA			
Plasma 1			
Plasma 2			
Plasma 3			
Plasma 4			
Plasma 5			

Titulación

Dilución:	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Agglutinación (++, +, +/-, -)								

**Formato de Entrega de Informes:**

- Papel tamaño carta.
- Letra Arial 10.
- Márgenes 2 cm por cada lado.
- Los títulos y subtítulos deben ir en negrita.
- Escritura a espacio simple.
- El número total de hojas no debe sobrepasar las 15, incluyendo portada e índice.

**El informe debe incluir:**

- 1) **Tapa:** (según el formato de Universidad De Las Américas)
  - Título. (nombre de la guía)
  - Integrantes. (Nombre y apellidos)
  - Nombre docente: **Alejandra Arancibia D.**
  - Fecha de realización del práctico
- 2) **Índice.**
  - Especificar la página en la que se encuentra cada uno de los capítulos del informe.
- 3) **Introducción:**
  - Indicar el marco teórico del estudio realizado.
  - Especificar los objetivos generales y específicos del trabajo realizado.
- 4) **Parte Teórica:**
  - Indicar según indique cada guía el desarrollo bibliográfico que se hizo con respecto a cada uno de los temas señalados.
- 5) **Materiales y Métodos:**
  - Presentar las actividades realizadas y los medios empleados en su desarrollo incluyendo fotos, gráficos, esquemas, láminas, etc. Citar la bibliografía consultada en el caso de ser necesario.
- 6) **Resultados y Discusiones:**
  - En esta parte se mostrar en forma de tablas todos los resultados de las mediciones realizadas.
  - Posteriormente realizar una breve discusión con fundamento teórico de lo observado en el laboratorio.
  - Ej. Si entre dos muestras problemas observó un cambio de color cual es el principio químico que lo hizo cambiar y mostrar ese tipo de reacción para lo cual debe utilizar bibliografía.
- 7) **Discusiones y recomendaciones:**
  - Presentar las conclusiones obtenidas y posibles recomendaciones que el alumno pueda aportar.

## 8) Bibliografía:

Al final de cada informe se deberá detallar la bibliografía consultada en base al siguiente modelo.

- **Libros.**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR 1; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 2; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 3; ETC.** Año de publicación. Título de la publicación. Editorial. Ciudad y país de publicación. \_\_ Pág. (páginas del texto).

Ej: Matissek, R., Schnepel, F. N. y Steiner, G. 1998. Análisis de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.: pp. 1 y 229-232.

- **Revistas u otra publicación periódica:**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR 1; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 2; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 3; ETC.** Año de publicación. Título de la publicación. EN REVISTA: Editorial. pp.: \_\_ - \_\_ (páginas citadas).

Ej: Mazziatelli, M., and A. Shubert. 1990. Effect of several VAM endophytes and artificial substrate on vitropropagated *Vitis berlandisi* x *rupestris* 1103. En revista: Agric. Ecosyst. Environ. 29:279-283.

- **Webbibliografía:**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR.** Disponible en: Página web.

SORIA A., Elia M., REYES E., Carlos, OCCEGUERA A., Zenaida *et al.* **MICORRIZACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Sacharum officinarum*).** *Agric. Téc.* [online]. oct. 2001, vol.61, no.4 [citado 02 Septiembre 2007], p.436-443. Disponible en la Web: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-28072001000400005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072001000400005&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0365-2807.

**NOTA:**

**No se aceptaran como bibliografía o fuente de información.**

[www.google.cl](http://www.google.cl)

[www.google.com](http://www.google.com)

[www.rincondelvago.com](http://www.rincondelvago.com)

[www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

[www.yahoo.com](http://www.yahoo.com)

[www.altavista.com](http://www.altavista.com)

Ni otro tipo de web de dudosa fuente