

3202

nov

362.1784
B616
2002
C

CORFO - FONTEC

INFORME TÉCNICO FINAL

PROYECTO N° 201-2918

**DESARROLLO DE SOPORTES PARA
TIPIFICACION EN BANCOS DE SANGRE**

Diciembre 2002



362.1784
B 616
2002

o. Castillo Velasco 2902 Fono: 209-6770 Fax: 274-5462
E-mail: biosonda@biosonda.cl www.biosonda.com
SANTIAGO - CHILE

PRESENTACIÓN

En el último decenio, se constata que el país ha sabido enfrentar con éxito el desafío impuesto por la política de apertura en los mercados internacionales, alcanzando un crecimiento y desarrollo económico sustentable, con un sector empresarial dinámico, innovador y capaz de adaptarse rápidamente a las señales del mercado.

Sin embargo, nuestra estrategia de desarrollo, fundada en el mayor esfuerzo exportador y en un esquema que principalmente hace uso de las ventajas comparativas que dan los recursos naturales y la abundancia relativa de la mano de obra, tenderá a agotarse rápidamente como consecuencia del propio progreso nacional. Por consiguiente, resulta determinante afrontar una segunda fase exportadora que debe estar caracterizada por la incorporación de un mayor valor agregado de inteligencia, conocimientos y tecnologías a nuestros productos, a fin de hacerlos más competitivos.

Para abordar el proceso de modernización y reconversión de la estructura productiva del país, reviste vital importancia el papel que cumplen las innovaciones tecnológicas, toda vez que ellas confieren sustentación real a la competitividad de nuestra oferta exportable. Para ello, el Gobierno ofrece instrumentos financieros que promueven e incentivan la innovación y el desarrollo tecnológico de las empresas productoras de bienes y servicios.

El Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Productivo FONTEC, organismo creado por CORFO, cuenta con los recursos necesarios para financiar Proyectos de Innovación Tecnológica, formulados por las empresas del sector privado nacional para la introducción o adaptación y desarrollo de productos, procesos o de equipos.

Las Líneas de financiamiento de este Fondo incluyen, además, el apoyo a la ejecución de proyectos de Inversión en Infraestructura Tecnológica y de Centros de Transferencia Tecnológica a objeto que las empresas dispongan de sus propias instalaciones de control de calidad y de investigación y desarrollo de nuevos productos o procesos.

De este modo se tiende a la incorporación del concepto "Empresa - País", en la comunidad nacional, donde no es sólo una empresa aislada la que compite con productos de calidad, sino que es la "Marca - País" la que se hace presente en los mercados internacionales.

El Proyecto que se presenta, constituye un valioso aporte al cumplimiento de los objetivos y metas anteriormente comentados.

FONTEC - CORFO

ÍNDICE

	<i>Página</i>
ABREVIACIONES	2
1. RESUMEN EJECUTIVO	3
2. EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA	12
3. OBJETIVOS TÉCNICOS	25
4. METODOLOGÍA GENERAL	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES	34
7. IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS	35
8. BIBLIOGRAFÍA	37
9. ANEXO 1	39

ABREVIACIONES

ABO	Principal sistema de antígenos de grupo sanguíneo humano, que se encuentran localizados en la superficie de los glóbulos rojos y permiten clasificar a los individuos en los grupos A , B , AB y O .
AMC	Anticuerpo monoclonal
Anticuerpo	Proteína secretada por los linfocitos B al suero, que se sintetiza en respuesta a un antígeno y que interactúa específicamente con este.
Anti-Fc	Anticuerpo dirigido contra la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina
Antígeno	Cualquier sustancia que es capaz de provocar una respuesta de tipo inmunológico en los vertebrados.
BSA	Albúmina de suero de bovino
C	Complemento, conjunto de proteínas del suero que participan en la respuesta inmune frente a patógenos
C3d	Fragmento d del tercer componente del complemento
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
Epítopo	Sitio del antígeno al cual se une un anticuerpo
Eritrocito	Glóbulo rojo
IgG	Inmunoglobulina de la clase G
IgM	Inmunoglobulina de la clase M
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de Amonio
PBS	Amortiguador fosfato salino
pH	Grado de acidez de una solución
Rh	Sistema de antígenos de grupo sanguíneo humano, que permite clasificar a los individuos en Rh ⁺ (cuando el antígeno D ó Rh está presente) y en Rh ⁻ (cuando el antígeno está ausente).

1. RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo general de este proyecto, fue desarrollar y producir en Chile un nuevo sistema de tipificación de grupos sanguíneos humanos, alternativo al método tradicional consistente en reacciones de aglutinación en lámina o tubo, basada en el uso de soportes sólidos, bañados por anticuerpos policlonales y/o monoclonales dirigidos contra los principales antígenos de los grupos sanguíneos humanos de mayor importancia clínica que se expresan en los glóbulos rojos: ABO y Rh.

1.1 Grupos Sanguíneos Humanos

La clasificación de los grupos sanguíneos humanos establecida por los trabajos pioneros del inmunólogo Karl Landsteiner (Paul, 1999) a principios de este siglo, permitieron desarrollar técnicas de transfusión sanguínea, que han disminuido el riesgo de reacciones adversas provenientes del rechazo, por parte del sistema inmune del receptor, de la sangre incompatible transfundida. Actualmente se sabe que los principales sistemas de compatibilidad sanguínea son los grupos sanguíneos ABO y el Rh.

El **Sistema ABO** comprende el grupo de antígenos más importante de antígenos (A, B, AB y 0) que se expresan sobre la membrana de los glóbulos rojos. Su especificidad antigénica reside en estructuras de tipo oligosacáridas (azúcares), producto de la acción de varias enzimas (glucosiltransferasas) que actúan en secuencia sobre un sustrato oligosacárido de base (un tetrasacárido unido a una proteína integral de la membrana plasmática de los eritrocitos). Este sistema permite clasificar a los sujetos como A, B, AB y 0. En Chile los fenotipos de este sistema presentan la siguiente frecuencia: 0 (59,2%), A (29,5%), B (9,3%) y AB (1,99%) (Palomo y Pereira, 1995).

El **Sistema Rh** es uno de los sistemas de antígenos de grupo sanguíneo más polimórficos (compuesto por muchos genes que son alelos entre sí) puesto que se han descrito más de cuarenta antígenos diferentes, siendo comunes sólo cinco de ellos, denominados **D**, **C**, **c**, **E** y **e**. Sin embargo el más importante es el antígeno **D**, más conocido como **Rh**, su presencia determina que los individuos sean clasificados como Rh positivo (**Rh⁺**) y su ausencia como Rh negativo (**Rh⁻**). En Chile los fenotipos de este sistema presentan la siguiente frecuencia **Rh⁺** 94,7% y **Rh⁻** 5,3% (Palomo y Pereira, 1995).

1.2 Los Anticuerpos como Herramientas para la Tipificación de Grupos Sanguíneos

Los **anticuerpos** son proteínas producidas por los vertebrados en respuesta específica contra un **antígeno**. Por esta propiedad, han sido una herramienta fundamental en el desarrollo de ensayos de diagnóstico para numerosas patologías y sustancias en humanos, como es el caso de hormonas, receptores, toxinas, fármacos, antígenos tumorales y antígenos de grupos sanguíneos. Básicamente, cuando se dispone de un anticuerpo contra un antígeno, se tiene una sonda específica para buscar ese antígeno en diferentes matrices que pueden ser, orina, sangre, muestras de tejido, muestras de alimentos, etc.

Antes del advenimiento de la metodología de hibridomas para producir anticuerpos monoclonales en cantidades ilimitadas *in vitro* (Köhler y Milstain, 1975; Becker y De Ioannes, 2002), la principal fuente de anticuerpos para determinar el grupo sanguíneo de dadores y receptores de sangre, eran los anticuerpos provenientes de seres humanos inmunizados en forma experimental con sangre incompatible. Estos reactivos a pesar de ser específicos eran de difícil estandarización y por su origen humano, podían ser causa de la transmisión de enfermedades como el SIDA, Hepatitis y Enfermedad de Chagas, a los productores y operadores.

La producción de anticuerpos monoclonales de ratón mediante técnicas de fusión somática, permitió en la década de los 80, la producción de anticuerpos específicos de los grupos A y B con alta especificidad y avidéz para la tipificación sanguínea en el ámbito de Bancos de Sangre (Becker, *et al.*, 1994). Estos anticuerpos por sus características de homogeneidad y estabilidad en el tiempo, permitieron por una parte bajar los costos de las determinaciones de grupos sanguíneos significativamente y por otra, simplificaron los procedimientos, puesto que por su alta calidad y potencia han disminuido la frecuencia de resultados falsos negativos en los Bancos de Sangre.

A pesar de los avances alcanzados por la introducción de los anticuerpos monoclonales, la tipificación de sangre humana mediante técnicas clásicas de aglutinación directa o mediante la reacción de anti-globulina humana o prueba de Coombs, para visualizar reacciones de aglutinación débiles, aún requiere de personal altamente calificado para que los resultados sean confiables. Por ejemplo, la reacción de Coombs, que permite aumentar la sensibilidad de las reacciones de aglutinación mediante la incorporación de un suero polyclonal de conejo o cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) humana, para detectar grupos sanguíneos débiles, consume mucho tiempo y trabajo que requiere esta técnica, debido a la necesidad de repetidos lavados de las muestra.

1.3 Métodos de Tipificación Sanguínea

El método tradicional de tipificación de los grupos sanguíneos humanos de importancia clínica, es la aglutinación de eritrocitos *in vitro*, esto es sobre una lámina de vidrio ó en un tubo de fondo curvo. En ella, los eritrocitos que presentan determinados antígenos en su superficie, son colocados en presencia de un antisuero de un dador o, de un reactivo tipificador formulado sobre la base de anticuerpos monoclonales de ratón, de esta forma, el eritrocito une estos anticuerpos ó, se sensibiliza y posteriormente, esta unión se estabiliza. Con este propósito, los medios en que se realiza esta reacción tienen

características particulares que estabilizan la reacción de aglutinación, tales como un pH, fuerza iónica y temperatura adecuadas.

Se han desarrollado procedimientos alternativos a la técnica clásica de aglutinación en lámina o en tubo, como es el método de microplacas. En este caso, placas de poliestireno de multipozos, son recubiertas con anticuerpos específicos de antígenos de glóbulos rojos. Esta técnica tiene la ventaja de disminuir el uso de los reactivos específicos, acortar el tiempo de los lavados, pero la lectura de los resultados requiere de personal especializado y microscopio para obtener lecturas confiables. Sin embargo, no posee características tecnológicas superiores a la técnica clásica.

Alternativamente a la metodología de microplaca, se han comenzado a usar soportes sólidos que incorporan anticuerpos, fundamentalmente por su mayor sensibilidad, facilidad en la lectura y porque es posible manejar un gran número de muestras con un personal menos entrenado. Justamente en este último punto, radica la ventaja fundamental de esta metodología por parte del Banco de Sangre por sobre la técnica clásica de aglutinación y de las microplacas. Además queda un registro que puede ser fotocopiado o registrado electrónicamente.

En forma resumida, esta técnica utiliza pequeñas esferas hechas de un material inerte poroso que no dejan pasar los glóbulos rojos a su interior. Mediante el uso de reactivos químicos específicos, las esferas se activan de manera que pueden reaccionar con los glóbulos rojos, atrapando los complejos inmunes.

Estas esferas se dejan decantar espontáneamente en un pequeño tubo de centrífuga formando un sedimento, que resiste la fuerza de una centrífuga de laboratorio sin deformarse y manteniendo sus propiedades de flujo entre las esferas. Una vez que el gel ha sedimentado, permanece estable por mucho tiempo y no requiere de refrigeración para ser almacenado, previo a su uso en el Banco de Sangre.

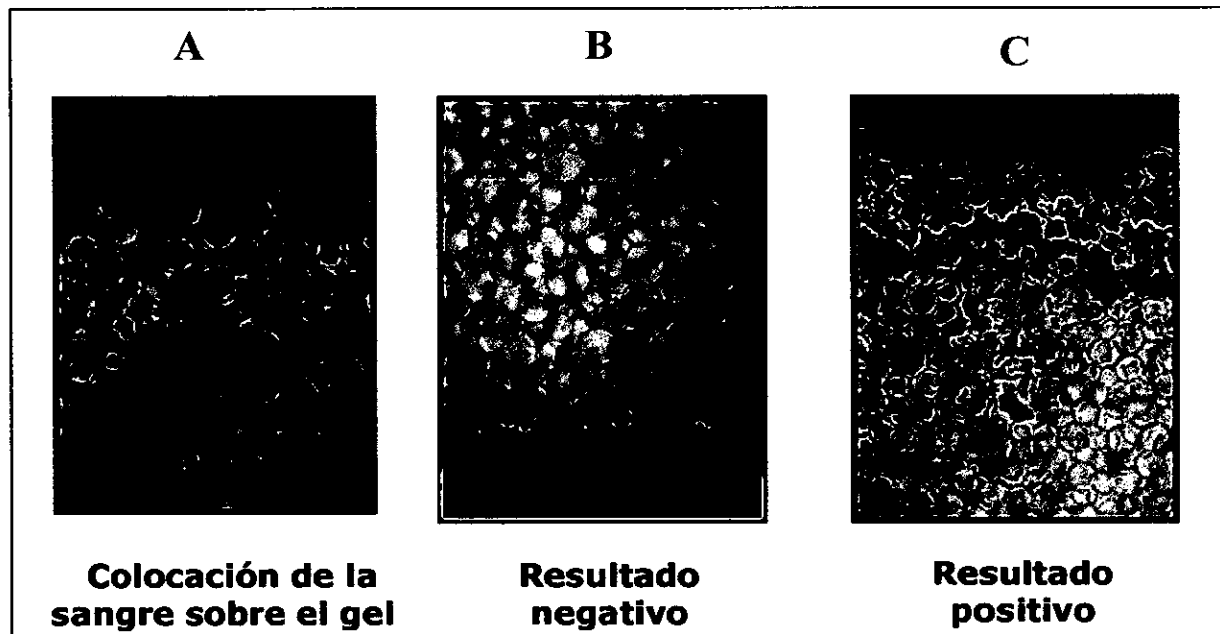
El principio en que se basa la utilización de soportes sólidos para el Banco de Sangre es simple y se muestra en la **Figura 1**. Si se deposita una capa de glóbulos rojos sobre la superficie del gel que no reaccionan con el anticuerpo unido al soporte sólido y este se somete posteriormente a un campo gravitacional moderado que no dañe los glóbulos rojos, los eritrocitos escurrirán por entre las esferas del gel hasta llegar al fondo del micro-tubo, donde quedarán como un punto rojo (resultado negativo). Por el contrario, si las células que se colocan sobre el soporte, reaccionan con el anticuerpo, su migración hacia el fondo del tubo se impedirá o se retardará significativamente, de tal manera que las células no llegarán al fondo del tubo (resultado positivo).

Como se observa en la **Figura 1**, los soportes sintéticos, por sus características de transparencia contrastan muy bien el color rojizo de los glóbulos rojos, facilitando enormemente su visualización en la columna, por lo tanto la evaluación de la reacción es mucho menos subjetiva que por medio de la reacción de aglutinación y requiere menos instrumentación que la técnica de microplacas cubiertas con anticuerpos.

En este proyecto planteamos desarrollar esta metodología para producir dos soportes o tarjetas: uno para tipificar ABO y Rh, y otro para la reacción de Coombs, que es la tipificación que consume más tiempo al ser desarrollada por la metodología tradicional. La reacción de Coombs, descrita a mediados del siglo pasado, permite determinar los llamados antígenos ocultos, que por su reacción de aglutinación muy débil pueden pasar inadvertidos y de esta forma ser clasificados como negativos, como es el caso de ciertos antígenos del grupo Rh. También la Prueba de Coombs se usa rutinariamente para determinar compatibilidad entre un dador y un receptor potencial.

Figura 1

Sistema de Tipificación Sanguínea en Soporte Sólido



Las ventajas de los sistemas de soporte sólido frente al método tradicional, esto es aglutinación directa de los eritrocitos por el reactivo tipificador sobre una lámina de vidrio o en un tubo de fondo redondo, son su mayor sensibilidad para pesquisar antígenos que se expresan débilmente, la facilidad y confianza en la lectura por parte del personal de los Bancos de Sangre y el ahorro de tiempo al permitir el manejo de un gran número de muestras en paralelo. Debido a estas ventajas, los sistemas de soporte sólido han sido introducidos exitosamente en los Bancos de Sangre de los países desarrollados y en nuestro país, por su alto costo, sólo son utilizados por clínicas privadas.

1.4 El Mercado de Tipificaciones Sanguíneas

El mercado de tipificaciones sanguíneas, mueve una cantidad importante de recursos en el sector estatal y privado de salud. Debido a que no existe capacidad de producción nacional de los productos de última generación que proponemos, se ha demorado la implementación de la tecnología de soportes en Chile, por el alto costo que esto representa para el sector de salud porque se ha constituido un monopolio por parte de una empresa española. La innovación que nuestra empresa piensa introducir en el mercado Chileno y luego en el Latinoamericano, tiene costos significativamente menores y con calidad técnica equivalente o superior. La introducción masiva de esta tecnología en Chile, significará ahorros en mano de obra al requerir personal con menor experiencia para realizar esta actividad. La mayor simplicidad de este ensayo por otra parte, disminuirá los errores que se producen por las técnicas tradicionales.

El mercado latinoamericano para estos sistemas de tipificación es vasto, si tan sólo se considera que en Chile se realizan 1.000.000 de tipificaciones de grupo ABO y 300.000 reacciones de compatibilidad Rh, constituyéndose en la actividad más importante que se realiza en los Bancos de Sangre, ya que es el paso previo y fundamental que asegura la viabilidad de las transfusiones sanguíneas y por esta vía, la vida del paciente.

Creemos que el desarrollo de este proyecto permitirá producir los sistemas de soporte a un costo razonable para los Bancos de Sangre de los hospitales y clínicas del país, lo cual tendrá beneficios económicos y sociales para la población, al permitir que un diagnóstico tan vital y básico como es el grupo sanguíneo de un individuo, se realice con un sistema de tipificación de mayor seguridad, mejor tecnología y menor costo.

1.5 Principales Resultados del Proyecto

Desde el punto de vista tecnológico, entre los principales resultados del proyecto se destacan los siguientes:

1. Se estableció una red de proveedores de suministros de materias primas que incluye: proveedores de soportes, reactivos monoclonales anti-ABO, anti-Rh y sueros de conejo anti-IgG humana y anti-complemento (C3d) humano.
2. Se seleccionó un soporte sólido que cumple con los requisitos físico-químicos en cuanto a tamaño de la partícula, entrecruzamiento y límite de exclusión, para desarrollar el ensayo de tipificación.
3. Se estableció una formulación de los soportes para los grupos sanguíneos clásicos, ABO y Rh; también se logró la formulación para la prueba de Coombs. La evaluación de estas preparaciones con glóbulos rojos estándares demostró que ellas cumplen con los requisitos de inmunopotencia y especificidad exigidos por lo Bancos de Sangre.

4. Los soportes desarrollados muestran estabilidad en el tiempo, tanto desde el punto de vista del estado de suspensión de las partículas como de sus propiedades específicas como reactivo tipificador.

Desde el punto de vista comercial, entre los principales resultados del proyecto se destacan los siguientes:

1. Se iniciaron las gestiones frente al Instituto de salud Pública de Chile, con el propósito de obtener un certificado de libre venta en nuestro país.
2. Para avanzar en la comercialización de los kits de tipificación en el mercado Latinoamericano, en colaboración con un proyecto de Integral Chile, se está desarrollando una estrategia de comercialización de este tipo de ensayos para penetrar en el mercado Mexicano.

2. EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA

Biosonda S.A implementó a nivel laboratorio, un procedimiento que permite obtener soportes sólidos, para la determinación de antígenos de glóbulos rojos en Bancos de Sangre. Este método presenta ventajas sobre los métodos tradicionalmente usados en tipificación sanguínea, como son la aglutinación directa, aglutinación indirecta y sistema de placas. El propósito de este proyecto, fue llevar este desarrollo tecnológico a nivel piloto, para comenzar su producción masiva, introducirlo en el ámbito nacional e iniciar su exportación a países de la región.

La comercialización de estos kits estará a cargo de la empresa Comercial A&B, una empresa Chilena dedicada a la distribución y manufactura de reactivos y productos para uso en Hospitales, Clínicas y Laboratorios Clínicos. Esta empresa hoy día lidera el mercado de Banco de Sangre, representando en Chile a las empresas del Reino Unido, **Lorne Laboratories Ltda** y **Serologicals Ltd.**, ambas proveedoras de sueros y reactivos para uso en Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos. Además sustenta la representación de otras empresas relacionadas a la fabricación y distribución de material de precisión para laboratorio, **John Poulten Ltd.**

Serologicals U.K es en la actualidad uno de los principales proveedores en el ámbito mundial, de anticuerpos monoclonales (tecnología basada en la aplicación de ingeniería genética para la manufactura de biológicos) relacionados a la clasificación de grupos sanguíneos y otros grupos afines para tipificación en Bancos de Sangre. Comercial A&B importa los concentrados, fraccionando, envasando y formulando el producto final en sus propios laboratorios e instalaciones.

Productos similares a los que proponemos en este proyecto, están siendo comercializados por la empresa Española Grifolds, pero su elevado costo ha hecho que la mayoría de los Bancos de Sangre sigan usando las tecnologías tradicionales.

De acuerdo al estudio de costos que hemos realizado para este proyecto, en colaboración con Comercial A&B S.A., indican que la producción de estos soportes, utilizando la tecnología desarrollada por Biosonda, tiene costos muy competitivos para la introducción masiva de esta tecnología de punta en Chile. El beneficio más importante para los Bancos de Sangre es que esta nueva metodología, permitirá bajar los costos de los análisis, puesto que es más rápida e involucra menos mano de obra para su aplicación.

2.1 Fundamentación Teórica

2.1.1 Grupos sanguíneos humanos

La clasificación de los grupos sanguíneos humanos establecida a principios de siglo por el inmunólogo Karl Landsteiner (Paul, 1999) se basa en la presencia de ciertas moléculas -glicoproteínas- sobre la membrana de los glóbulos rojos, las cuales por su capacidad de provocar una respuesta inmunológica en un sujeto que no los posee, se denominan antígenos (Becker y De Ioannes, 1998; 2002).

La disciplina que se dedica al estudio de la respuesta inmunológica de los individuos frente a los antígenos presentes en eritrocitos se denomina Inmunohematología. Esta rama de la medicina, cuyo sostén es la actividad de tipificación de grupos sanguíneos que se realiza en los Bancos de Sangre, participa del diagnóstico y tratamiento de todas las patologías hemolíticas adquiridas o de naturaleza autoinmune (Palomo y Pereira, 1995).

Los antígenos de glóbulos rojos capaces de provocar una respuesta inmunológica en pacientes, requieren de un análisis individual y aunque se han identificado 19 sistemas de grupos sanguíneos, que suman alrededor de 200 antígenos, los de mayor capacidad inmunogénica, significancia clínica y frecuencia poblacional son el **Sistema ABO** y el **Sistema Rhesus** más conocido como Rh. Otros Sistemas de relevancia son el **Sistema Kell**, el **Sistema Duffy**, el **Sistema Lewis**, el **Sistema Kidd**, el **Sistema MNSc** y el **Sistema Lutheran**, entre los principales (Mollison, 1987).

El Sistema ABO: es el grupo de antígenos más importante de antígenos que se expresan abundantemente sobre la membrana de los glóbulos rojos. Su especificidad antigénica reside en estructuras de tipo oligosacáridas, producto de la acción de varias glucosiltransferasas que actúan secuencialmente sobre un sustrato base (un tetrasacárido unido a una proteína integral de la membrana plasmática de los eritrocitos). Este sistema permite clasificar a los sujetos como A, B, AB y O. En Chile los fenotipos de este sistema presentan la siguiente frecuencia: **O** (59,2%), **A** (29,5%), **B** (9,3%) y **AB** (1,99%) (Palomo y Pereira, 1995).

En la **Tabla 1** a continuación, se muestran los principales grupos de sistema ABO que determinan el fenotipo del individuo y su correspondiente genotipo, y en la **Figura 2**, se muestra los azúcares que definen el epítipo que da la especificidad a cada grupo y las relaciones de compatibilidad sanguínea cuando se realizan transfusiones.

Tabla 1

Fenotipo y genotipo del sistema ABO (no se incluyen los subgrupos)

Fenotipos	Genotipos
AB	AB
A	AA or AO
B	BB or BO
O	OO

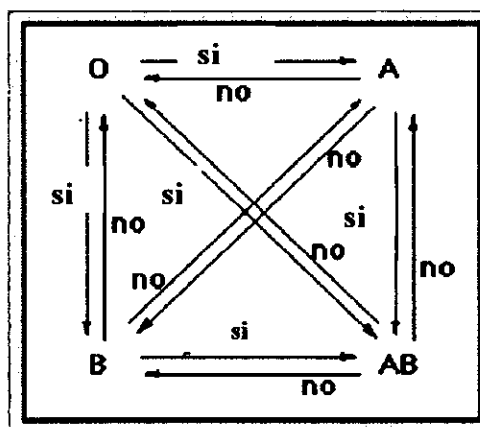
Figura 2

Estructura de los epítomos del sistema ABO y compatibilidad sanguínea

A

Trisacárido terminal	Grupo
Fuc—Gal—GlcNAc	O
Fuc \ Gal—GlcNAc / GalNAc	A, AB
Fuc \ Gal—GlcNAc / Gal	B, AB

B



En el esquema A, se muestran la cadena de azúcares que se expresa sobre la membrana de los eritrocitos y que determina que un sujeto sea del grupo sanguíneo o, A, B, ó AB.

En el esquema B, se presenta un cuadro que resume el tipo de transfusiones de acuerdo a la compatibilidad del sistema ABO. Las transfusiones compatibles se indican con Si y las incompatibles con No. Dentro de cada tipo de sangre las transfusiones son compatibles.

El Sistema Rh: es uno de los sistemas de antígenos de grupo sanguíneo más polimórficos, puesto que se han descrito más de cuarenta antígenos diferentes, siendo comunes sólo cinco de ellos, denominados **D**, **C**, **c**, **E** y **e**. Sin embargo el más importante es el antígeno **D**, más conocido como **Rh**, su presencia determina que los pacientes sean clasificados como Rh positivo (**Rh⁺**) y su ausencia como Rh negativo (**Rh⁻**). En Chile los fenotipos de este sistema presentan la siguiente frecuencia **Rh⁺** 94,7% y **Rh⁻** 5,3% (Palomo y Pereira, 1995).

Los anticuerpos dirigidos contra el sistema Rh, generalmente son detectados en las pruebas pre-transfusionales y en los controles de embarazadas Rh negativas.

2.1.2 Tipificación de grupos sanguíneos humanos mediante aglutinación

El método tradicional de tipificación de los grupos sanguíneos humanos de importancia clínica, es la aglutinación de eritrocitos *in vitro*. En ella, los eritrocitos que presentan determinados antígenos en su superficie, son colocados en presencia de un antisuero de un dador o, de un reactivo tipificador formulado sobre la base de anticuerpos monoclonales (Becker y De Ioannes, 1998), de esta forma, el eritrocito une estos anticuerpos ó, se sensibiliza y posteriormente, esta unión se estabiliza.

Con este propósito, los medios en que se realiza esta reacción tienen características particulares que estabilizan la reacción de aglutinación, tales como un pH, fuerza iónica y temperatura adecuadas. El método clásico de tipificación de grupos sanguíneos consiste en depositar la muestra de sangre sobre una lámina de vidrio o en un tubo de vidrio de fondo curvo, se agrega el reactivo tipificador y se observa la reacción de aglutinación, como se muestra en la **Figura 3**.

Figura 3

Determinación de grupos sanguíneos mediante aglutinación



2.1.2.1 El Test de Coombs

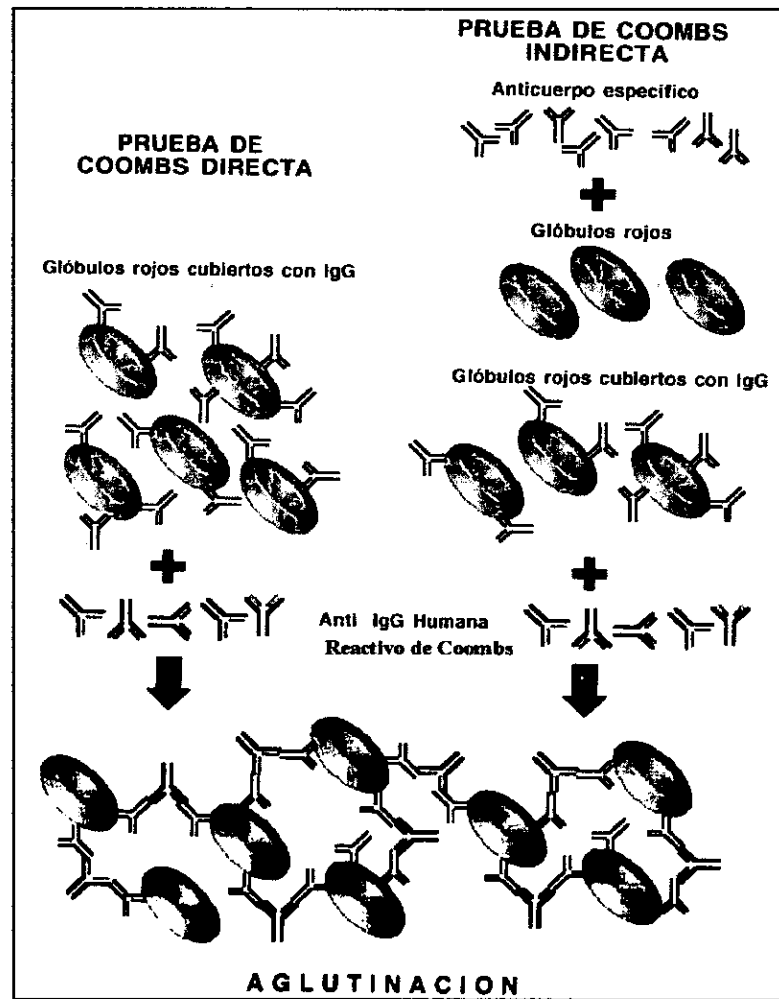
Uno de las pruebas básicas que se realiza en Bancos de Sangre, es la prueba de Coombs, también conocida como prueba de la anti-Inmunoglobulina humana, cuyo reactivo básico consiste en un suero de conejo o de cabra anti-Inmunoglobulina de la clase G humana -IgG- (Coombs, *et al.*, 1945). Actualmente, este tipo de reactivo también puede ser de naturaleza monoclonal (Becker y De Ioannes, 1998). Este ensayo permite determinar la presencia en el suero de un paciente, de anticuerpos que se han producido debido a algún trastorno de tipo hemolítico o debido a la transfusión de sangre no necesariamente compatible, los cuales se encuentran libres en el plasma o adheridos a la superficie de los glóbulos rojos.

La prueba de Coombs permite detectar estos anticuerpos preformados, tanto para el diagnóstico como para la prevención de trastornos hemolíticos provocados por incompatibilidad de grupos sanguíneos. Entre estos trastornos patológicos se destacan: la enfermedad hemolítica del recién nacido, provocada por una incompatibilidad sanguínea entre el feto y su madre; la reacción hemolítica transfusional y anemias hemolíticas autoinmunes inducidas por fármacos.

La prueba de Coombs se puede realizar de dos maneras: **directa** e **indirecta**, como se esquematiza en la **Figura 4**. La prueba de Coombs directa, consiste en la detección de inmunoglobulina adheridas *in vivo* a la superficie de los eritrocitos. La prueba de Coombs indirecta, consiste en la detección de inmunoglobulina adheridas *in vitro* a la superficie de los eritrocitos. En ambos tipos de ensayos, al adicionar el reactivo de Coombs, se produce una reacción de aglutinación de los eritrocitos distinguible visualmente por un observador con experiencia. El reactivo de Coombs tradicionalmente utilizado en Bancos de Sangre, se compone de una mezcla de anticuerpos de conejo o de cabra anti-IgG humana y anti-C3d, tercer componente del complemento humano, para aumentar su sensibilidad (Barker, 1982; Chaplin y Monroe, 1986; Holtz, *et al.*, 1986).

Figura 4

La Prueba de Coombs

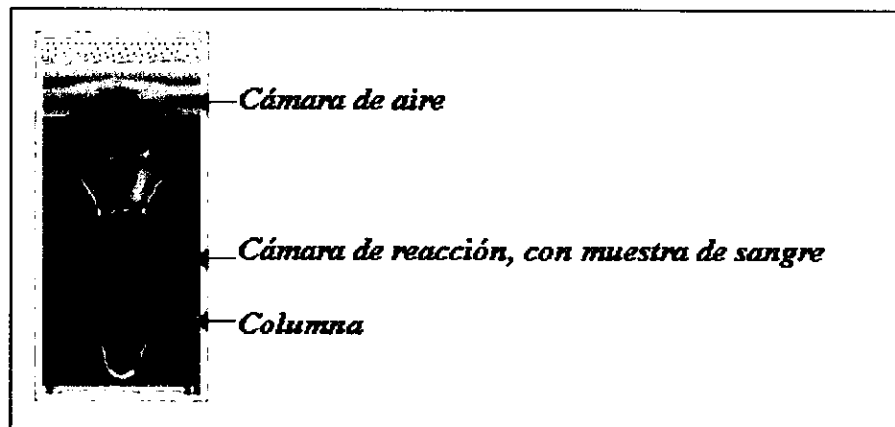


2.1.3 Uso de soportes sólidos para tipificación en Bancos de Sangre

Los geles son matrices de diferente origen, naturales o sintéticas, a las cuales se les pueden pegar proteínas o grupos cargados mediante reacciones químicas específicas. En el caso específico de este proyecto, se trata de matrices a las cuales se les pueden absorber anticuerpos. El sistema utilizado para colocar estos geles se muestra en la **Figura 5**, esta compuesto por una tarjeta plástica que contiene columnas en que se distinguen 3 partes: la cámara de reacción, donde se produce el encuentro entre los glóbulos rojos que en su superficie tienen los antígenos de grupos sanguíneos y los anticuerpos específicos para tipificar dichos antígenos; la cámara de aire y la columna que contiene el gel en donde quedará fijada la reacción entre los antígenos y los anticuerpos.

Figura 5

Sistema de soporte sólido para tipificación de grupos sanguíneos



El principio en que se basa la utilización de geles para el Banco de Sangre es simple. Si se deposita una capa de glóbulos rojos sobre la superficie del gel que no reaccionan con el anticuerpo unido al soporte sólido y éste se somete posteriormente a un campo gravitacional moderado, que no dañe los glóbulos rojos, los eritrocitos escurrirán por entre las esferas del gel hasta llegar al fondo del microtubo, donde quedarán como un punto rojo. Por el contrario, si las células que se colocan sobre el soporte, reaccionan con el anticuerpo absorbido a las esferas del soporte, su migración hacia el fondo del tubo se impedirá o se retardará significativamente, de tal manera que las células no llegarán al fondo del tubo (véase **Figura 1**).

Justamente en este último punto, radica la ventaja fundamental de esta metodología por parte del Banco de Sangre por sobre la técnica clásica de aglutinación y de las microplacas. Además queda un registro que puede ser fotocopiado o registrado electrónicamente.

Los geles, por sus características de transparencia contrastan muy bien el color rojizo de los glóbulos rojos, facilitando enormemente su visualización en la columna, por lo tanto la evaluación de la reacción es mucho menos subjetiva que por medio de la reacción de aglutinación y requiere menos instrumentación que la técnica de microplacas cubiertas con anticuerpos.

Una reacción positiva se visualiza porque los glóbulos rojos avanzan solamente un par de milímetros desde la superficie hacia el fondo del tubo, si la reacción es más débil, los glóbulos pueden migrar más o menos hacia el fondo del tubo dependiendo de la afinidad que los anticuerpos tengan por ellos, de tal manera que es muy fácil asignar la nomenclatura que se usa en el Banco de Sangre para reacciones fuertes, en base de cuatro cruces para las reacciones intensas a +/- para las más débiles, requiriendo personal menos especializado y menos equipamiento para la lectura de los resultados.

En este proyecto se planteó utilizar en primera instancia esta metodología para la Reacción de Coombs, por ser ésta la que consume más tiempo al ser desarrollada por la metodología tradicional.

Como se mencionó anteriormente, la reacción de Coombs, descrita a mediados del siglo pasado, permite determinar los llamados antígenos ocultos, que por su reacción débil pueden pasar inadvertidos por las reacciones de aglutinación, como es el caso de ciertos antígenos del grupo Rh.

También se usa rutinariamente para determinar compatibilidad entre un dador y un receptor potencial. En este caso se busca la presencia de anticuerpos en un receptor de una transfusión, que reaccionan con los glóbulos rojos del dador. Si esto ocurre, significa que el dador de los glóbulos rojos posee antígenos que no se encuentran en el receptor, esta situación es potencialmente peligrosa puesto que al transfundir los glóbulos rojos incompatibles al receptor, se desarrollará una respuesta inmune que puede poner en peligro la vida del receptor.

Estas reacciones en muchos casos, son muy débiles para ser visualizadas por una aglutinación directa y requieren ser intensificadas por medio de una anti-inmunoglobulina humana producida en conejos o cabras; de tal manera que los anticuerpos que se han unido a la membrana de los glóbulos rojos del dador después de ser incubados con el suero del receptor reaccionan con la anti-inmunoglobulina y ahora se podría observar una reacción de aglutinación.

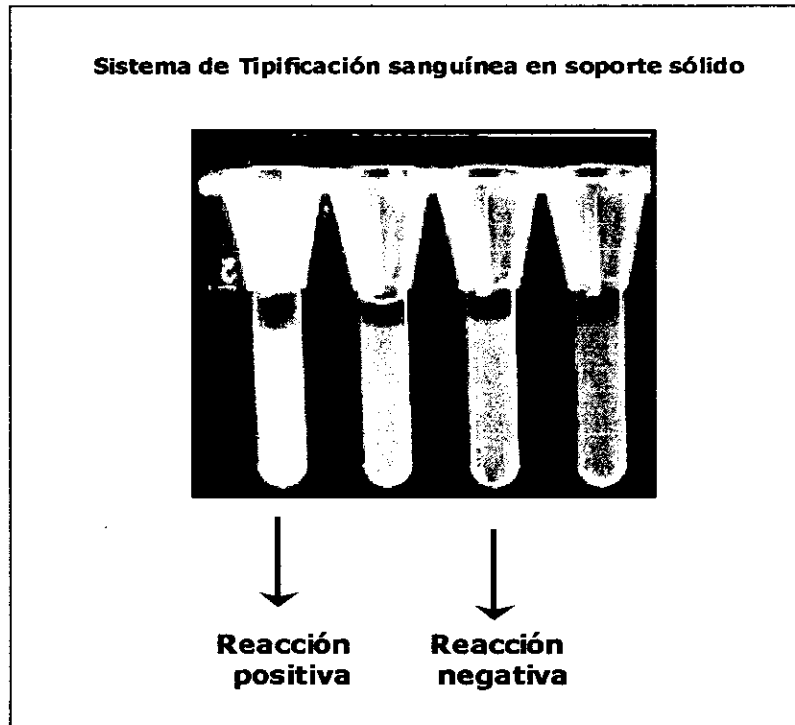
Este procedimiento parece en teoría fácil de realizar, pero requiere de bastante experiencia y tiene el inconveniente de requerir un paso de lavado que consume tiempo y encarece el examen, además la visualización de los resultados requiere de una persona con mucha experiencia la cual se obtiene después de un entrenamiento prolongado. Las microplacas se pueden usar para este propósito pero requieren del uso de un microscopio.

Además de la facilidad para visualizar la reacción inmunológica, el uso de soportes sólidos evita el paso de lavado ya que después de incubar los glóbulos rojos del dador de la sangre con el suero del receptor, se requiere simplemente colocar la mezcla de reacción sobre la columna. Al centrifugar la mezcla de anticuerpos con glóbulos rojos, los anticuerpos que no han reaccionado quedan sobre la superficie del gel permitiendo a los eritrocitos cubiertos por los anticuerpos específicos avanzar por el gel y ser capturados por la anti-Inmunoglobulina presente en el gel (**Figura 6**).

Una reacción negativa se visualiza porque los glóbulos rojos del dador avanzan hasta el fondo del tubo, como se muestra en la **Figura 6**. En una reacción fuertemente positiva, se observa que los glóbulos rojos penetran pocos milímetros en el gel y migraciones intermedias indican reacciones con menor intensidad.

Una vez establecidas las condiciones para producir soportes sólidos de calidad uniforme, activados con anti-inmunoglobulina humana y anti-complemento para desarrollar la reacción de Coombs, extenderemos su uso para la determinación de grupos sanguíneos ABO y Rh.

Figura 6



La fotografía muestra un sistema de tipificación en geles preactivados con anticuerpos anti-grupos sanguíneo humano del sistema ABO. En la reacción positiva, se observa que los glóbulos rojos penetran pocos milímetros en el gel, migraciones intermedias indican reacciones con menor intensidad. En la reacción negativa, se observa que los glóbulos rojos avanzan hasta el fondo del tubo.

3. OBJETIVOS TÉCNICOS

3.1. Establecer una red confiable y eficiente de proveedores de suministros de materias primas

3.2 Preparación de los anticuerpos y vehículos del soporte sólido

- i) Estudio sistemático de diferentes soportes y proveedores para elegir el más adecuado para el propósito de este desarrollo tecnológico.
- ii) Selección del proveedor de suero de conejo hiper-inmune anti IgG humana y anti complemento anti-C3d humano. Para los grupos sanguíneos ABO y Rh se seleccionarán proveedores confiables y con calidad compatible para este producto
- iii) Selección de los reactivos para la producción del soporte sólido, tamaño de partícula entrecruzamiento y límite de exclusión

3.3 Purificación de los anticuerpos

- i) Determinación de las condiciones de formulación de los anticuerpos

3.4 Formulaciones de los soportes

- i) Establecimiento de la formulación principal para la prueba de Coombs y de grupos sanguíneos clásicos: ABO y Rh.
- ii) Determinación de la especificidad de cada soporte
- iii) Determinación de la inmunopotencia de los concentrados por medio de aglutinación de eritrocitos estándares.

- iv) Determinación de las condiciones óptimas de activación e.g. pH, temperatura, tiempo y concentración de proteínas, para alcanzar la sensibilidad requerida en el ensayo.
- v) Con el propósito de disminuir los costos de los antisueros, se estudiarán las condiciones para utilizar más de una vez las soluciones de anticuerpos.
- vi) Diseño de microtubos para la sedimentación del gel y condiciones de llenado.

3.5 Evaluación del prototipo en el ámbito de laboratorio

El prototipo se evaluará en nuestro laboratorio, contra un panel de glóbulos rojos estándares proveídos por Comercial A&B S.A., Se evaluará su sensibilidad y especificidad.

3.6 Evaluación del prototipo en el ámbito de Bancos de Sangre

Una vez completada la evaluación en nuestro laboratorio, se realizarán evaluaciones en paralelo con los ensayos corrientemente usados en el Banco de Sangre. Con este propósito se cuenta con la colaboración varios Bancos de Sangre de la Región Metropolitana.

3.7 Estudios de estabilidad

- I) Materia prima y concentrados para eliminar la contaminación bacteriana y pérdida de actividad debido al almacenamiento.
- ii) Productos elaborado, se estudiará el efecto de la temperatura y diferentes tiempos en la estabilidad del producto.

4. METODOLOGÍA GENERAL

4.1 Elección de un soporte sólido adecuado.

Diferentes soportes sólidos de origen comercial, fueron evaluados desde un punto de vista fisico-químico en cuanto a tamaño del gel hidratado, porosidad, compactabilidad, solubilidad en tampones de uso habitual para ensayos de tipificación de grupos sanguíneos, condiciones de visibilidad y transparencia *versus* opacidad. También se evaluó la capacidad de retención de eritrocitos

4.2 Purificación de los anticuerpos

Se utilizó el procedimiento general descrito por Harlow y Lane, (1988). Básicamente, se determinó las condiciones óptimas de clarificación de los antiseros, compatibles con la formulación del gel. En el caso de los anticuerpos monoclonales se formularon a partir de las soluciones madres con los colorantes aceptados como norma internacionalmente para la tipificación: anti-A, azul; anti-B, amarillo y AB, con el color natural del gel. En el caso del reactivo de Coombs se utilizó verde.

4.3 Formulaciones de los soportes

Se establecieron las condiciones para la formulación de los reactivos de tipificación ABO, Rh y Prueba de Coombs, tales como amortiguador de la reacción, estabilizantes, preservantes, pH, temperatura y tiempos de activación de los geles y concentración de proteínas.

También se determinó la actividad de los sueros anti-IgG humana, con relación a la concentración de proteínas y pureza. Su potencia se evaluó mediante

reacciones de aglutinación con muestras de sangre estándares que expresaban débilmente el antígeno Rh.

La inmunopotencia de los concentrados se determinó mediante reacciones de aglutinación con paneles de eritrocitos estándares, que expresen los diferentes antígenos Rh, atendiendo a la presencia de grupos con antígenos que se expresan débilmente.

4.4 Pruebas de estabilidad de los soportes

Una vez obtenidas las formulaciones para cada uno de los soportes tipificadores, se dejaron muestras de ellos a 4° C para evaluar periódicamente su sensibilidad y especificidad en el tiempo.

5. RESULTADOS

5.1 Establecer una Red Confiable y Eficiente de Proveedores de Suministros de Materias Primas

Se realizaron búsquedas en sitios web en Internet, encontrándose diversas empresas que comercializan reactivos para tipificación sanguíneas A, B, O, Rh y sueros anti-IgG y anti C3d, de tipo monoclonal y/o policlonal.

Se solicitaron muestras de las distintas preparaciones de los productos destinados a la tipificación ABO, Rh y para la Prueba de Coombs, en diferentes formulaciones y se evaluó sus características intrínsecas como reactivo tipificador (potencia y sensibilidad) y también, su costo relativo. Se seleccionó dos proveedores para reactivos ABO y Rh, y también uno para los reactivos de la prueba de Coombs, con los cuales se desarrolló los prototipos.

5.2 Preparación de los Anticuerpos y Vehículos del Soporte Sólido

5.2.1 Reactivos ABO y Rh

Los vehículos ensayados para los diferentes anticuerpos fueron tampón fosfato salino (PBS), solución de baja fuerza iónica (LIS), solución diluyente ABO, y Diluyente Rh. Dependiendo del tipo de reacción, mezclas de PBS con soluciones comerciales diluyentes dieron los mejores resultados de visualización de las reacciones de aglutinación de los eritrocitos en el gel. Las diluciones de cada reactivo se ajustaron en base a la sensibilidad de acuerdo a glóbulos rojos que expresan débilmente los antígenos de interés, especialmente para evaluar el sistema Rh.

Para determinar la sensibilidad y especificidad de cada reactivo, se realizó un estudio con un número en torno a 100 muestras de glóbulos rojos, lográndose óptimos resultados. Este estudio se realizó simultáneamente con la elección de los soportes, mediante una matriz con las diferentes combinaciones. Los resultados en comparación con los sistemas convencionales y con los geles comerciales fueron muy satisfactorios.

5.2.2 Prueba de Coombs

Esta reacción permite detectar reacciones débiles y determinar incompatibilidades que no corresponden a grupos clásicos ABO y grupos raros Rh. Por lo tanto, para potenciar la reacción de aglutinación, se deben agregar proteínas y/o polímeros para disminuir la repulsión natural de los glóbulos rojos. Al mismo tiempo, se debe determinar la concentración óptima del suero anti-inmunoglobulina de conejo (reactivo de Coombs propiamente tal) y del monoclonal anti complemento (anti-C3d) que permite aumentar la sensibilidad del reactivo, cuidando de no producir reacciones falso-positivas.

Con este propósito, se analizaron cada una de las tres variables en forma independiente (proteínas, suero anti-IgG humana y monoclonal anti-C3D) y una vez alcanzado el óptimo con una variable, se incorporó la otra hasta alcanzar el máximo de sensibilidad, considerando el costo final de los kits.

La formulación final que incluye los potenciadores, colorantes y solución iónica óptima, se ensayó contra un panel de glóbulos rojos y anticuerpos débiles con muy buena sensibilidad. Los resultados de las pruebas de campo informadas verbalmente por el Banco de Sangre de la Pontificia Universidad Católica de Chile, fueron satisfactorias.

5.3 Formulaciones de los soportes

5.3.1 Prototipo de soporte para antígenos ABO

Se evaluaron las propiedades de los geles mediante microscopía de luz equipada con contraste de fase, para determinar el tamaño, forma y transparencia de geles de distinta naturaleza y procedencia. Finalmente se optó por geles mixtos de acrilamida-agarosa, tanto por sus propiedades mecánicas como por su transparencia, que permite una óptima visualización de las reacciones de aglutinación de eritrocitos.

5.3.2 Prototipo de soporte para antígenos Rh

Debido a las altas concentraciones de proteínas que incluye este reactivo, se analizaron diferentes soportes, optándose por los geles mixtos de agarosa-poliacrilamida, ya que a pesar que tenían algunos problemas de viscosidad, el resultado de otros geles no era lo suficientemente mejor para justificar incluir un gel diferente en el kit.

5.3.3 Prototipo de soporte para test de Coombs

Esta prueba es la más compleja del panel, ya que requiere de altas concentraciones de potenciadores y proteínas para alcanzar la sensibilidad requerida para detectar anticuerpos débiles y la presencia de antígenos raros. En este caso, se controló la composición del medio para que el gel cumpliera con la función de atrapar los glóbulos rojos agregados por la anti-inmunoglobulina y, dejara escurrir hacia el fondo de la columna los casos de muestras negativas ..

5.3.4 Prototipo de soporte para prueba inversa

Este mismo criterio se aplicó en el desarrollo de la reacción inversa. Los geles usados fueron los mismos que en la prueba ABO.

5.3.4.1 *ABO Rh, prueba inversa*

De acuerdo a la opinión de diferentes usuarios de los Bancos de Sangre, el mejor arreglo sería el logrado por una tarjeta plástica de seis pocillos con sello de plástico aluminio. Con la siguiente configuración: A, B, Rh IgM, Rh IgM/IgG, y dos capilares para las pruebas inversas de control de aglutininas en el dador, la primera con glóbulos rojos A1 y la segunda con glóbulos rojos B. Cada pocillo se llenó con 50 microlitros de una suspensión de gel.

5.3.4.2 *Tarjeta tipificación recién nacidos*

Debido a que los recién nacidos no tienen anticuerpos propios contra el sistema ABO, no se requiere la prueba inversa, pero si se debe incluir una capilar con reacción de Coombs y una columna con el gel control sin anticuerpos para pesquisar aglutinaciones inespecíficas que se presentan en sangre de cordón umbilical.

El capilar con reactivo de Coombs es para determinar la presencia de anticuerpos anti Rh que atacan los glóbulos rojos Rh positivos del hijo por la madre (incompatibilidad Rh). La configuración óptima es A, B, AB, Rh, Coombs, Control Coombs. La optimización de esta tarjeta en base a la ausencia de falsos positivos en Coombs y la reacción AB se resolvió satisfactoriamente, colocando los diluyentes apropiados para eliminar la reacción positiva falsa sin perder sensibilidad.

5.3.4.3 Tarjeta Coombs

También posee 6 capilares con un volumen de gel de 50 μL , se ha logrado óptima sensibilidad incluyendo un colorante verde al gel que permite distinguir el gel de los otros y contrastar el color de los glóbulos rojos.

5.4 **Estabilidad de las Tarjetas y los Reactivos**

Para lograr una buena estabilidad de las tarjetas, se logró sellar térmicamente la parte superior de las tarjetas con un film de aluminio, de otra manera el gel se deshidrataría arruinando la tarjeta. Se ha logrado un sistema de sellado con una alta eficiencia. Otro tema importante fue el rotulado de las tarjetas, para lo cual se diseñaron etiquetas autoadhesivas para ABO, Rh y Coombs, las cuales funcionan perfectamente.

6. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo del proyecto, se alcanzaron todos los objetivos planteados en el plan original, lo que permite concluir lo siguiente:

1. Se estableció una red confiable y eficiente de proveedores de suministros de materias primas que incluye: proveedores de soportes, reactivos monoclonales anti-ABO, anti-Rh y sueros de conejo anti-IgG humana y anti-complemento (C3d) humano.
2. Se seleccionó mediante diversos análisis fisicoquímicos y microscópicos, un soporte sólido (gel) que cumple con los requisitos requeridos en cuanto al tamaño y homogeneidad de las partículas, entrecruzamiento y límite de exclusión, para desarrollar el ensayo de tipificación.
3. Se estableció una formulación óptima en cuanto a sensibilidad y especificidad de los soportes para los grupos sanguíneos clásicos, ABO y Rh; también se logró la formulación para la prueba de Coombs.
4. La evaluación de los soportes prototipo con preparaciones de glóbulos rojos estándares, habituales y también con muestras que expresan débilmente algunos antígenos de interés clínico, demostró que ellos cumplen con los requisitos de inmunopotencia y especificidad exigidos por lo Bancos de Sangre.
5. Los geles desarrollados muestran estabilidad en el tiempo, tanto desde el punto de vista del estado de suspensión de las partículas como de sus propiedades específicas como reactivo tipificador.

7. IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Como se explicó ampliamente en el proyecto original, para llevar adelante este proyecto, dado que es un nuevo mercado para ella, nos hemos asociado con **Comercial A&B**. La incursión de Biosonda como productor de reactivos de tipificación sanguínea abre amplias posibilidades de aumentar nuestra actividades y diversificar campos de actividad por la vía de nuevos productos para el mercado nacional.

Los clientes de nuestro producto, son los Bancos de Sangre Chilenos que realizan más de un millón de tipificaciones al año, y alrededor de un millón de reacciones de Coombs en ese mismo período. Comercial A&B posee cobertura nacional y atiende un segmento importante del mercado nacional (aprox 30%). La asociación con Biosonda, permitirá aumentar su cobertura nacional y ampliar el mercado a países latinoamericanos.

El producto que hemos desarrollado, técnicamente tiene una geometría adecuada a los usuarios Chilenos lo cual facilita su uso, su precio debería ser muy competitivo, debido a lo innovativo del material que se ha usado y ha cumplido satisfactoriamente todas las pruebas de inmunopotencia y especificidad exigidas por los Bancos de Sangre. Actualmente, se están realizando las gestiones frente al Instituto de salud Pública de Chile, con el propósito de obtener un certificado de libre venta en nuestro país, como consta en un documento adjunto en el **ANEXO 1**, de este informe.

Evidentemente la implementación de procesos innovativos conlleva inversiones, estas serán cubiertas en parte por Comercial A&B a nivel nacional y en lo que respecta a capacidad productiva por Biosonda, nuestra empresa ha realizado cuantiosas inversiones a nivel de capacidad de I&D y productivas por medio de un proyecto de Infraestructura Línea 2 FONTEC-CORFO, que ha permitido aumentar significativamente el equipamiento y las condiciones de trabajo.

Para la fase exportadora, estamos trabajando con grupos exportadores en proyectos PROFOS de CEPRI, que nos darán la asesoría para penetrar mercados latinoamericanos, estas actividades incluyen la participación como proyectos asociativos en ProChile para acciones específicas a nivel internacional. Biosonda asumirá el liderazgo en la fase exportadora con el apoyo fundamental de Comercial A&B. También, para avanzar en la comercialización de los kits de tipificación en el mercado Latinoamericano, en colaboración con un proyecto de Integral Chile, se está desarrollando una estrategia de comercialización de este tipo de ensayos para penetrar en el mercado Mexicano.

7. BIBLIOGRAFIA

- Barker, J. Serologic comparison of a monoclonal anti-C3d with commercial antiglobulin reagents. *Transfusion* **22** : 507 (1982).
- Becker, M.I., Juica, J., Jamett, A., Tzichinovsky, S., Barros, S., Aguayo, J., De Ioannes A.E. Development of anti-human B blood group monoclonal antibodies suitable for blood typing reagent. *Hybridoma* **13** : 304 (1994).
- Becker, M.I., De Ioannes, A.E. Antígenos. Capítulo 2. Libro de Inmunología. Ed. Universidad de Talca. Págs. 97-114. (1998).
- Becker, M.I., De Ioannes, A.E. Anticuerpos Monoclonales Capítulo 23. Libro de Inmunología. Ed. Universidad de Talca. 1ª Edición, Págs. 607-630. (1998).
- Becker, M.I., De Ioannes, A.E. Anticuerpos Monoclonales Capítulo 23. Libro de Inmunología. Ed. Universidad de Talca. 2ª Edición, Págs. 719-735. (2002).
- Chaplin, H., Monroe, M. Comparisons of pooled polyclonal rabbit anti-human C3d with four monoclonal mouse anti-human C3ds. *Vox Sang.* **50** : 42 (1986).
- Coombs, R., Mourant, A., Race, R. Detection of weak and incomplete Rh agglutinins: a new test. *Lancet*, II: 15. (1945).
- Harlow, E., Lane, D. Antibodies. A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. (1988).
- Hermanson, G.T., Krishna Mallia, A., Smith, P.K. Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, New York (1992).

ISBT-ICSH Working Party (International Society of blood Transfusion and International Committee for Standardization of Blood Transfusion. International reference polyspecific anti-human globulin Reagen-s. *Vox. Sang.* **53** : 241 (1987).

Mollison, P.L. Transfusión de sangre en medicina clínica. Edit. Reverté. 7º Ed. (1987).

Palomo, I., Pereira, J. Fisiopatología de las citopenias inmunes. Editorial Universidad de Talca. (1995).

Palomo I., Becker, M.I. Anticuerpos. Capítulo 5. Libro de Inmunología. Ed. Universidad de Talca. Págs. 115-152. (1998).

Paul, W. Fundamental Immunology. 4ª Edición. Editorial: Lippincot- Raven Press, New York, (1999).

Voak, D., Nilsson, U. Report of studies on monoclonal anti-IgG antibodies. *J. Immunogenetics* **17** : 331 (1990).

Wong, S.S. Chemistry of protein conjugation and cross-linking. Editorial: CRC Press, Inc. London. (1993).

ANEXO 1

Solicitud de Comercialización de los Soportes de Tipificación Presentada al Instituto de Salud Pública de Chile

CERTIFICADO

Alfredo E De Ioannes III RUT 4.852.557-1, Gerente General de Biosonda S.A, RUT 96.632.300-0 certifica que el producto Type Para determinación del grupo ABO / Rh de Recién Nacidos. Bio Type A-B-AB-DlgM/IgG- Control- Coombs. mediante la tecnología de geles, ha sido desarrollado por la Empresa Biosonda S.A. y es producido en las instalaciones de la empresa ubicadas en Eduardo Castillo Velasco 2902. La empresa Comercial A&B S.A. es el distribuidor exclusivo de estos productos.

Se extiende el presente certificado a petición de la Empresa A&B con el propósito de obtener certificado de libre venta por parte del Instituto de Salud Pública de Chile.

Santiago 07 de noviembre de 2002

Dr. Alfredo De Ioannes
Gerente General

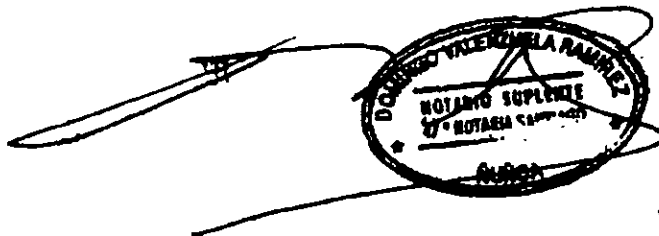
pp.

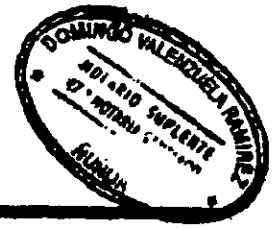
BIOSONDA S.A.
BIOTECNOLOGIA



EDUARDO CASTILLO VELASCO 2902, FON0 (56-2) 209 6770 FAX (56 2) 274 5462
Email biosonda@biosonda.cl
SANTIAGO CHILE

Autorizo la firma de don Alfredo Emilio De Ioannes III CI 4.852.557-1 quien declara que se encuentra actualmente facultado para representar a BIOSONDA S.A. Santiago, 28 de Noviembre del 2002.- CJ



**A
&
B**

Bio-Type

Para determinación del grupo ABO / Rh de Recién Nacidos.
A-B-AB-DIgM/IgG- Control- Coombs.

PRINCIPIO

El fenotipo ABO de un individuo es determinado por la aglutinación de sus glóbulos rojos en la presencia de suero Anti-A, Anti-B y Anti-AB. (Prueba directa). En adultos, la confirmación del grupo ABO puede llevarse a cabo por la reacción del suero de este individuo con una suspensión de glóbulos rojos A₁ y B. (Prueba Inversa).

Debido a que la presencia de estos anticuerpos no ocurre antes de los 4-6 meses de vida, la prueba inversa no puede llevarse a cabo en recién nacidos.

Los antígenos A y B no se encuentran totalmente desarrollados en los recién nacidos, motivo por el cual sus reacciones de aglutinación pueden ser más débiles y subgrupos no pueden ser identificados.

La tarjeta Bio-Type Recién Nacido le permite al usuario efectuar la prueba directa, determinación del grupo Rh y la prueba de Coombs directo.

Los pacientes que presenten un grupo D (-) pueden ser llevados a D^o de acuerdo a las normas de cada institución.

REACTIVO

La tarjeta Bio-Type Recién Nacido contiene anticuerpos Monoclonales Anti-A (Línea celular BIRMA-1), Anti-B (Línea celular KLB-2), Anti-AB (Línea celular BIRMA-1, ES-4, ES-15), Anti-D IgM/IgG (Anti-D IgM línea celular TH-28 y Anti-D IgG derivado de la línea celular MS-26).

El pocillo 5, AHG contiene suero de Coombs Poliespecífico con fracción anti-IgG obtenida de conejos inmunizados con IgG humana purificada, y anticuerpos Monoclonales Murinos Anti-C₃d. (BRIC 8).

Glóbulos rojos sensibilizados con fracción de complemento C₄d no reaccionan con este reactivo.

Este pocillo ha sido diseñado para detección de muestras con Coombs Directo Positivo (+).

PRECAUCIONES

Este reactivo contiene 0.1% p/v Azida de Sodio. Puede ser tóxico al ser ingerido y reacciona con las tuberías de plomo y cobre.

ALMACENAGE

Almacenar entre 18-25°C.

El reactivo se mantendrá estable por todo el período indicado.

TOMA DE LA MUESTRA

Sangre de cordón o punción de talón puede ser utilizada. Generalmente no es necesario lavar la sangre previo a su clasificación. Cuando se utilice sangre de cordón debe evitarse la contaminación con gelatina de Wharton.

La muestra de sangre debe ser extraída en forma aseptica y preferentemente en Citrato, EDTA, Heparina o CPD-A. Para obtener resultados confiables se recomienda el uso de sangre fresca.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Preparar una suspensión de Glóbulos Rojos al 1% en la solución I de la siguiente forma:

En un tubo de ensayo limpio, colocar 1 ml de "Solución I" y 10 ul de sedimento de glóbulos rojos.

PROCEDIMIENTO

No utilizar tarjetas que presenten deshidratación o variación en su presentación al examen ocular.

No utilizar muestras hemolizadas o contaminadas.

1.- Identificar cada tarjeta con el nombre del paciente. Retirar el sello que recubre la tarjeta.

2.- Añadir 50 ul de glóbulos rojos suspendidos al 1% en solución I a los pocillos 1 al 6.

3.- Centrifugar por 10 minutos a la velocidad indicada.

4.- Leer y anotar los resultados.

INTERPRETACIÓN

Las muestras positivas se presentan como una línea roja en la superficie del reactivo, (4+) o dispersadas a través del pocillo (1-3 +).

Las muestras negativas forman un botón compacto en el fondo del pocillo.

La reacción en el tubo control debe ser negativa.

En el caso que diera positiva, la reacción en el tubo D(Rh) es inválida y debe ser repetida de la siguiente forma:

Lavar los glóbulos rojos en solución salina tibia o solución I. Luego proceder a preparar nuevamente la solución de trabajo al 1%.

Una reacción positiva en el tubo Coombs, indica que los glóbulos rojos de la muestra se encuentran sensibilizados.

BIBLIOGRAFIA

-Race RR Sanger. Blood groups in man. 6th ed Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1975: 178

-Guidelines for the Blood Transfusion Services H.M.S.O. Second Edition, 1993, chapter 3.

