

DICNE  
2500

23 OCT. 1970



UNIVERSIDAD DE MONTERREY

Instituto de Ciencias

Naturales y Exactas

*Clasificación*  
040.54  
V145p  
1973  
c.1

*Título*

" PREVENCIÓN DE LA ISOINMUNIZACIÓN AL FACTOR  
Rho (D) CON GAMMA GLOBULINA "

**BIBLIOTECA**  
**UNIVERSIDAD DE MONTERREY**

Tesina que presenta

*Autor* JUANA DEL SOCORRO VALDES IRAHETA

En opción al título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

*Folio*  
**801030**

Monterrey, N. L.

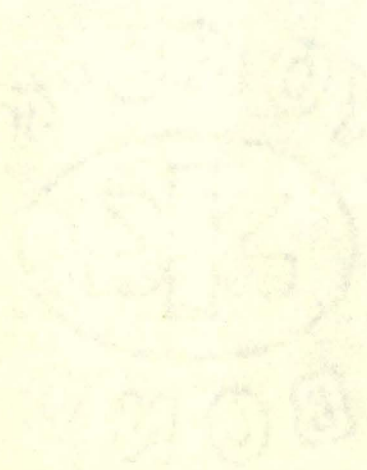
Diciembre de 1973.

800582

086/08

Con amor y agradecimiento  
a mis padres  
Alvaro Valdés  
Melany Iraheta de Valdés

Con cariño a mis hermanos  
Rosa Margarita  
y  
José Miguel.



Con especial agradecimiento  
a los señores doctores  
Mario González Ramos y  
Mario González y Rivera  
por sus consejos y dirección  
en la elaboración del presente  
trabajo.

Este trabajo se realizó en el  
Laboratorio Privado del  
Dr. Mario González Ramos  
de la Clínica Eugenio Sué  
en México, D. F.  
bajo la Dirección de los Srs.  
Drs.  
Mario González Ramos y  
Mario González y Rivera.

## INDICE

	Pag.
Introducción.....	1
Material y Métodos.....	8
Resultados.....	14
Comentario y Conclusiones.....	17
Bibliografía.....	19

## INTRODUCCION

El descubrimiento del factor Rho (D) en el año de 1940 - por Landsteiner y Wiener, (citado por 1) y el hallazgo simultáneo de la patogénesis de la enfermedad hemolítica del recién nacido -- por Levine en el año de 1939, (2) (3) constituyen uno de los avances científicos más importantes de nuestro siglo.

Las investigaciones de Landsteiner y Wiener se basaron - en la suposición de que en la sangre de Macacus rhesus podrían --- existir antígenos similares a los de la especie humana. Su experimentación se dirigió a obtener sueros de conejos y cobayos previamente inmunizados con sangre del macaco mencionado, que en contacto con sangre humana aglutinaban aproximadamente al 85% de las muestras; las personas cuya sangre mostraba aglutinación fueron denominadas Rho (D)positivas, el 15% restante que no mostró aglutinación estaba formado por individuos que se llamaron Rho (D) negativos.

La insospechada importancia de este factor sanguíneo en relación a su antigenicidad en la especie humana, pasó desapercibida hasta que Levine basado en el hallazgo de un suero humano inmune, con la misma especificidad que el suero obtenido en sus investigaciones por Landsteiner y Wiener, lo llevó a teorizar y proponer el hecho de que el factor Rho (D) es capaz de formar anticuerpos anti Rho y provocar por ende, la enfermedad hemolítica en el recién nacido.



Al mismo tiempo Wiener y Peters (4) demostraron que el mismo antígeno es capaz de causar reacciones transfusionales de mayor o menor severidad en pacientes Rho (D) negativos.

El concepto de la teoría de Levine, para la isoinmunización de mujeres Rho (D) negativas, se basa en que el feto hereda de su padre un gen dominante, que elabora este factor sanguíneo, mismo que su madre no tiene; es posible que durante el parto células fetales tengan acceso a la circulación materna estimulando así la producción de anticuerpos anti Rho. Su hallazgo dejó establecido que: el factor Rho es la causa de la gran mayoría de los casos de isoinmunización materno-fetal.

La imposibilidad para demostrar objetivamente lo anterior dependió del uso de técnicas inadecuadas para la detección de estos anticuerpos; los estudios posteriores al reporte de Levine fueron dirigidos principalmente al desarrollo de pruebas serológicas que permitieran demostrarlos.

Wiener y Race (5) demostraron la existencia de dos tipos principales de anticuerpos anti Rho: los salino-activos y los que se combinan con los eritrocitos bloqueando la aglutinación producida por el anticuerpo completo, pero que no producen aglutinación por sí solos. Diamond y Abelson (6) cambiando el medio salino por albúmina o suero, demostraron que los anticuerpos univalentes podían producir aglutinación. Coombs (7) en el año de 1945 al describir la técnica de la antiglobulina, dió un gran paso para lograr la solución del problema y, permitió que Hill (8) descubriera un tipo más de anticuerpo incompleto, "el cripto-aglutinoide", que aglutina los eritrocitos en un medio de elevado contenido proteínico; este anticuerpo puede demostrarse por la técnica de la antiglobulina, o bien de acuerdo con Morton y Pickles (9) modificando la superficie del eritrocito por medio de enzimas proteolíticas.

En este período, gracias al desarrollo de esta nueva tecnología serológica, hubo un gran avance en el conocimiento de antígenos, anticuerpos, reacciones antígeno-anticuerpos, sistemas de grupos sanguíneos y su forma de herencia básica. Se demostraron otros factores Rho, incluso factores recíprocos existentes en personas Rho (D) negativas.

En el año de 1955 Levine (citado por 10) reportó que de los 49 anticuerpos conocidos, 23 habían sido causa de enfermedad hemolítica del recién nacido, en la actualidad solamente el sistema Rho establece 20 fenotipos y 36 posibles genotipos. (Tabla No. 1)

Sin embargo, a pesar de este elevado número de anticuerpos potencialmente productores de eritroblastosis fetal o enfermedad hemolítica del recién nacido, más del 99% de los casos son producidos por el principal factor Rho o antígeno "D".

# Rh-Hr FENOTIPOS Y GENOTIPOS

TIPO Rh		20 Rh-Hr FENOTIPOS									36 GENOTIPOS POSIBLES					
designación	frecuencia aprox. %	reaccion con anti						asignación			frecuencia aproximada %	Wiener		Fisher race		frecuencias aproximadas %
		R <sub>h</sub> <sup>o</sup> D	r <sub>h</sub> <sup>i</sup> C	r <sub>h</sub> <sup>ii</sup> E	hr <sup>i</sup> c	hr <sup>ii</sup> e	hr <sup>iii</sup> f	wiener	fisher	race		Wiener	Fisher race	Wiener	Fisher race	
negativo	15 %	-	-	+	+	+	rh	cde/cde	14.4	rr		cde cde		14.4		
		+	-	+	+	+	rh <sup>i</sup> rh	Cdecde	0.46	r <sup>i</sup> r		Cde cde		0.46		
		-	+	-	+	-	rh <sup>i</sup> rh <sup>i</sup>	Cde/Cde	0.0036	r <sup>i</sup> r <sup>i</sup>		Cde Cde		0.0036		
		-	+	+	+	+	rh <sup>ii</sup> rh	cdE/cde	0.38	r <sup>ii</sup> r		cdE cde		0.38		
		-	+	+	-	-	rh <sup>ii</sup> rh <sup>ii</sup>	cdE/cdE	0.0025	r <sup>ii</sup> r <sup>ii</sup>		cdE cdE		0.0025		
		-	+	+	+	-	rh <sup>i</sup> rh <sup>ii</sup>	Cde/cdE	0.006	r <sup>i</sup> r <sup>ii</sup>		Cde cdE		0.006		
		-	+	+	+	+	rh <sub>1</sub> rh	CdE/cde	0.008	r <sup>1</sup> r		CdE cde		0.008		
		+	+	-	+	-	rh <sub>1</sub> rh <sup>i</sup>	CdE/Cde	0.0001	r <sup>1</sup> r <sup>i</sup>		CdE Cde		0.0001		
		+	+	-	-	-	rh <sub>1</sub> rh <sup>ii</sup>	CdE/cdE	0.0001	r <sup>1</sup> r <sup>ii</sup>		CdE cdE		0.0001		
		+	+	-	-	-	rh <sub>1</sub> rh <sub>1</sub>	CdE/CdE	0.000001	rr		CdE CdE		0.000001		
positivo	85 %	-	-	+	+	+	Rh <sub>0</sub> rh <sub>0</sub>	cDe/cde	2.1	R r	R R	cDe/cde	cDe/cDe	2.05	0.073	
		+	-	+	+	+	Rh <sub>1</sub> rh	CDe/cde	35.0	R <sup>1</sup> r	R <sup>1</sup> R	R <sup>1</sup> r <sup>i</sup>	CDe/cde CDe/cDe cDe/Cde	32.7	2.3	0.03
		-	+	-	+	-	Rh <sub>1</sub> Rh <sub>1</sub>	CDe/CDe	19.0	R <sup>1</sup> R <sup>1</sup>		R <sup>1</sup> r <sup>i</sup>	CDe/CDe	CDe/Cde	18.5	0.5
		-	+	+	+	+	Rh <sub>2</sub> rh	cDE/cde	12.2	R <sup>2</sup> r	R <sup>2</sup> R	R <sup>2</sup> r <sup>ii</sup>	cDE/cde cDE/cDe cDe/cdE	11.4	0.8	0.027
		-	+	+	-	-	Rh <sub>2</sub> Rh <sub>2</sub>	cDE/cDE	2.4	R <sup>2</sup> R <sup>2</sup>		R <sup>2</sup> r <sup>ii</sup>	cDE/cDE	cDE/cdE	2.25	0.15
		+	+	+	-	-	Rh <sub>2</sub> Rh <sub>2</sub>	CDE/cDE	13.5	R <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> r <sup>i</sup>	R <sup>2</sup> r <sup>ii</sup>	CDE/cDE CDe/cdE cDE/Cde	12.9	0.4	0.2
		+	+	+	+	+	Rh <sub>2</sub> rh	CDE/cde	0.17	R <sup>2</sup> r	R <sup>2</sup> R	R <sup>2</sup> r <sup>i</sup>	CDE/cde CDE/cDe CDe/CdE	0.15	0.01	0.0005
		+	+	-	+	-	Rh <sub>2</sub> Rh <sub>2</sub>	CDE/CDe	0.19	R <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> r <sup>i</sup>	R <sup>2</sup> r <sup>ii</sup>	CDE/CDe CDE/Cde CDe/CdE	0.16	0.02	0.008
		+	+	-	-	-	Rh <sub>2</sub> Rh <sub>2</sub>	CDE/cDE	0.07	R <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> r <sup>ii</sup>	R <sup>2</sup> r <sup>i</sup>	CDE/cDE CDE/cdE cDE/CdE	0.06	0.002	0.003
		+	+	-	-	-	Rh <sub>2</sub> Rh <sub>2</sub>	CDE/CDE	0.0004	R <sup>2</sup> R <sup>2</sup>		R <sup>2</sup> r <sup>i</sup>	CDE/CDE	CDE/cdE	0.0004	0.0004

Desde el año 1943 Levine (11) observó que la incidencia de inmunización al factor Rho (D) era afectada por la compatibilidad o incompatibilidad en el sistema ABO, del producto con la madre. El mecanismo protector en la incompatibilidad ABO, no está bien dilucidado, pero una posibilidad es que un secuestro rápido de las células fetales por el hígado materno, que no es normalmente un sitio productor de anticuerpos, puede eliminar los antígenos antes de que éstos alcancen el sistema inmunocompetente.

Se han mencionado además otros mecanismos protectores como son la heterocigocidad al factor Rho: Todos los hijos de un padre -- Rho (D) positivo homocigote (D/D) serán Rho (D) positivos. Los del padre heterocigote (d/d) tienen un 50% de probabilidades en cada embarazo de ser Rho (D) negativos.

La ausencia de hemorragia transplacentaria feto-materna, - (el paso de sangre del feto a la madre constituye la condición "sine qua non" para que el fenómeno de estimulación antigénica tenga lugar). En condiciones fisiológicas la placenta previene el paso de - sangre del feto hacia la madre.

El factor Rho (D) es un sistema complejo en el que diferentes combinaciones de los factores del mismo tienen mayor potencia -- antigénica que otros, así cualquier combinación en que se asocien D y E es más potente que aquella en que intervengan D y C ó C y E. -- Por otra parte, un feto Rho (D) positivo difícilmente producirá en - la madre la formación de anticuerpos, si ésta ha sido hija de padre Rho (D) negativo y madre Rho (D) positiva heterocigote, puesto que - se "acostumbró" durante la vida embrionaria al estímulo antigénico - del factor Rho (D) (12). El punto contrario a esta última aseveración ha sido mencionado recientemente, arguyendo que esta situación representa el primer contacto con el antígeno Rho (D) y por ende una primera sub-sensibilización que hará más grave a la subsecuente (13).

Sin embargo, a pesar de los mecanismos protectores naturales, múltiples investigaciones han sido llevadas a cabo, con el objeto de prevenir en un 100% la isoimmunización al factor Rho (D).

#### PREVENCION

En 1960, Freda, Gorman y Pollack (14) en Estados Unidos y Finn (15) y Clark (16) en Inglaterra, en forma independiente, iniciaron investigaciones para la prevención de la isoimmunización al factor Rho (D).

El grupo americano basó sus investigaciones en el principio inmunológico de que: la inmunización pasiva impide la inmunización activa, observación hecha inicialmente por Theobald Smith en el año de 1909. (citado por 17).

Estos investigadores iniciaron un programa de estudios - para determinar si la inmunización de madres Rho (D) negativas, podría prevenirse por la administración pasiva de un anticuerpo inmediatamente después del parto (15). El primer paso de este programa fue preparar un lote de gamma globulina que tuviera una alta -- concentración de anticuerpos IgG anti Rho, a partir de plasma obtenido de personas altamente sensibilizadas (17).

Tomaron dos grupos de voluntarios del sexo masculino Rho (D) negativo: uno de los grupos fue tomado como testigo y el otro fue tratado administrándole por vía intramuscular 5 ml. de gamma globulina Rho (D) inmune humana conteniendo 20,000-40,000 unidades hemoaglutinantes de anti-Rho (RhoGAM), 24 horas más tarde ambos -- grupos fueron inyectados por vía intravenosa con 2 ml. de sangre total grupo "O" Rho (D) positiva (18) (14). Este esquema de inyección fue repetido con intervalos mensuales durante cinco meses y -- los voluntarios fueron examinados periódicamente para determinar -- la desaparición de anticuerpos pasivos y/o la aparición de anti--- cuerpos anti Rho (D). Posteriormente se demostró que ninguno de -- los individuos del grupo tratado fue inmunizado.

Con la seguridad en la eficacia del material se inició - un segundo estudio de voluntarios varones Rho (D) negativos para - determinar si el preparado de gamma globulina podía o no prevenir la inmunización cuando se administrara después de 72 horas de la - inyección con sangre Rho (D) positiva.

En 1964 fueron iniciados este mismo tipo de estudios en mujeres que cumplieran los siguientes requisitos: 1.- Ser Rho (D) negativa, 2.- No estar sensibilizada al factor Rho (D), 3.- Dar a luz un hijo Rho (D) positivo, con prueba directa de Coombs negativa, y compatible con la madre en el sistema ABO.

En 1968 se preparó el primer lote de gamma globulina, - (RhoGAM) para el tratamiento profiláctico de la isoimmunización - al factor Rho (D), en gran escala. (21) (19).

La historia de la investigación del grupo de Liverpool se basa en el estudio de Stern (20) quien inyectó voluntarios masculinos Rho (D) negativos, con sangre Rho (D) positiva cubierta - con anticuerpos incompletos anti D, observando posteriormente la ausencia de inmunización.

Finn y col. iniciaron su investigación de profilaxis -- de la isoimmunización al factor Rho (D) inyectando voluntarios -- Rho (D) negativos, con células Rho (D) positivas marcadas con cromio radioactivo, administrando posteriormente una infusión de --- plasma con título alto de anti D. A pesar del éxito observado y puesto que no se presentó inmunización en ninguno de los sujetos estudiados, persistía la duda si igual efecto se obtendría en mu- jeres Rho (D) negativas.

Este problema fue solucionado en buena parte con las investigaciones de detección y conteo de células fetales en la circulación materna, demostrando que aunque ocasionalmente pueden demostrarse células fetales durante el embarazo, éstas ocurren en mucho mayor número durante o inmediatamente después del parto, siendo muy importante, desde el punto de vista de protección, el número de células fetales presente.

Fueron estos hallazgos, junto con los resultados obtenidos en los voluntarios, lo que decidió la posibilidad de administración de la gamma globulina en una infusión de plasma inmediatamente después del parto y fueron los trabajos del grupo americano en relación al empleo de la gamma globulina Rho D inmune humana - en administración intramuscular y sin riesgo de provocar hepatitis, lo que hizo al grupo de Liverpool cambiar a esta misma forma de administración.

Iniciando sus estudios en madres Rho (D) negativas y con los mismos requisitos que en el grupo americano, en la Tabla No. 2 se mencionan los resultados obtenidos por ambos grupos.

Actualmente se previene la isoinmunización al factor -- Rho (D) y por tanto la eritroblastosis fetal, aplicando a la madre Rho (D) negativa, por vía intramuscular una dosis de RhoGAM - dentro de las primeras 72 horas, después del parto o aborto. La razón para su administración después de un aborto aún sin conocer el tipo sanguíneo y Rho del producto es que el antígeno Rho (D) - se desarrolla muy temprano en la vida fetal, habiéndose demostrado a los 38 días de la concepción (21) y en fetos de 8 gramos de peso (citado por 22). Por lo tanto, cuando un embarazo de una mujer Rho (D) negativa finaliza en aborto, los eritrocitos fetales Rho (D) positivos pueden entrar en su circulación y provocar inmunización, maxime cuando el embarazo se interrumpe artificialmente, ya que esto produce un marcado aumento de los eritrocitos fetales en la circulación materna y si a esto añadimos el efecto de un legrado uterino, el riesgo de inmunización para la madre Rho - (D) negativo, es mayor.

El empleo profiláctico de anticuerpos anti Rho en forma de gamma globulina, ha brindado resultados extremadamente "prometedores"; (Tabla No. 2) cientos de madres han sido protegidas y solamente han sido reportadas una que otra falla (23) (24). Es posible, por lo tanto, esperar una efectividad del 100% en la protección de madres con riesgo de desarrollar isoinmunización al -- factor Rho (D).

El objeto del presente trabajo es corroborar la efectividad de RhoGAM en pacientes Rho (D) negativas administrado dentro de las primeras 72 horas post-parto.

T A B L A No. 2

	C O N T R O L				T R A T A D A S			Total del Estudio
	Total	Inm.	No Inm.	% Inm.	Total	Inm.	No. Inm.	
Grupo de Liverpool (la, prueba)	136	29	107	21	131	1*	130	267
Columbia, New York	113	14	99	12	163	0	163	276
Long Beach, Calif.	176	21	155	12	176	0	176	352
Cornell, New York	58	5	53	9	41	0	41	81
T O T A L	483	69	414	14	511	1	510	976

\* Esta paciente desarrolló una reacción local a la globulina anti D, tempranamente en el embarazo había recibido una dosis profiláctica de gamma globulina anti rubeola. Si existe alguna relación, ésta debe ser investigada.

## MATERIAL Y METODO

Los anticuerpos anti Rho han sido tradicionalmente evaluados en terminos semicuantitativos a través de diluciones seriadas y las técnicas para demostrarlos han dependido de la visualización de la hemoaglutinación específica; estos métodos manuales producen considerable variabilidad y ninguno ha podido correlacionarse estrechamente con la realidad clínica, es decir, con el estado fetal. Aún en la actualidad es frecuente observar eritroblastosis severa en presencia de títulos relativamente bajos; todo esto ha llevado a la búsqueda de una evaluación cuantitativa de los anticuerpos anti Rho, (25) como un mejor método de correlación clínico-patológica. Estos métodos están aún en etapa experimental.

SE ESTUDIARON 56 CASOS CON LAS SIGUIENTES CARACTERISTICAS:

- 1.- Pacientes Rho (D) y Du negativas.
- 2.- Con ausencia de sensibilización al factor Rho (D) y a los otros factores sanguíneos.
- 3.- Con producto Rho (D) positivo.

Para la caracterización mencionada se practicaron los siguientes estudios:

- 1.- Tipificación del grupo sanguíneo (madre y recién nacido)
- 2.- Tipificación del factor Rho (D) (madre y recién nacido)
- 3.- Variante Du
- 4.- Coombs directo (en el recién nacido).
- 5.- Coombs indirecto (en la madre antes de la administración del RhoGAM y 3 meses post-parto, aproximadamente).
- 6.- Detección y recuento de eritrocitos fetales en la circulación materna (Kleihauer) (26).
- 7.- Prueba cruzada de compatibilidad con el RhoGAM y administración de éste.

### 1.- Tipificación del grupo sanguíneo.

El grupo sanguíneo se determinó colocando en cada uno de los extremos de un portaobjetos una gota de sangre; sobre una de ellas se agregó una gota de suero anti "A", y sobre la otra una gota de suero anti "B", mezclando con un palillo de madera con movimiento rotatorio; la lectura se hizo macroscópicamente, buscando la presencia o ausencia de aglutinación, cuya aparición es inmediata. En el sistema ABO, la reacción entre los antígenos eritrocíticos de grupo "A" y "B" y los anticuerpos correspondientes es específica, es decir, la aglutinación de los eritrocitos indica la presencia del antígeno respectivo. En caso contrario, la ausencia de aglutinación señala la ausencia del antígeno. Para ratificar las lecturas hechas con los sueros anti "A" y anti "B" se usa el suero tipificador anti "AB".

### 2.- Tipificación del factor Rho (D), en tubo y en placa.

#### a) En tubo.

Se puso en un tubo de (13 x 100), con pipeta pasteur --- una gota de sangre completa de la muestra por tipificar, se añadieron dos gotas de suero anti Rho (anti D), se centrifugó un minuto a 1000 r.p.m.; agitando suavemente el tubo se desprendió el botón celular y se observó macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación de los eritrocitos, lo que indica la presencia o ausencia del antígeno. Este método se empleó para continuar en el mismo tubo la investigación de la variante Du.

#### b) En placa.

Sobre una placa a 37°C para tipificación de Rho, se colocaron dos laminillas: en una (problema) se puso una gota de suero anti Rho (anti D) y se le añadió con pipeta pasteur dos gotas de sangre completa problema, se mezcló con un palillo de madera; a la vez en la otra laminilla se corrió un testigo negativo, poniendo una gota de albúmina bovina al 22% se le agregaron dos gotas de sangre por tipificar y con un palillo de madera se mezclaron. La búsqueda de aglutinación se hizo a los 30 segundos. La observación nunca debe prolongarse más de dos minutos, so pena de obtener resultados dudosos. El objeto de colocarlos sobre la placa a 37°C, es porque el antígeno Rho (D), reacciona mejor a esta temperatura. El testigo negativo nunca debe mostrar aglutinación; si ésta existe indica la presencia de auto-anticuerpos.

### 3.- Todas las sangres "D" negativas fueron analizadas para la variante "Du", para lo cual se hizo la siguiente prueba:



Una gota de glóbulos rojos problema.  
Dos gotas de suero anti Rho (anti D)  
Centrifugar un minuto a 1000 r.p.m.  
Observar macroscópicamente si aparece aglutinación.  
Si no hay aglutinación se trata de Rho (D) negativo.  
El mismo tubo problema, ponerlo en baño de agua a 37°C durante 10 minutos.

Pasado este tiempo lavarlo tres veces con solución salina fisiológica, agregarle una gota de suero antihumano de Coombs.

Centrifugar un minuto a 1000 r.p.m.

Observar macroscópicamente si aparece aglutinación.

Si hay aglutinación: Variante Du positiva

Si no hay aglutinación: Variante Du negativa

Acompañar siempre de un testigo positivo y uno negativo. Las pacientes Du positivas (dos en nuestro estudio) no son candidatas para el tratamiento profiláctico de RhoGAM y deben ser consideradas como donadoras Rho (D) positivas y receptoras Rho (D) negativas, ya que se han descrito inmunizaciones al factor Rho en raras ocasiones. (Ver inciso 7).

#### 4.- Coombs directo (en el recién nacido).

Se colocó en un tubo de Kahn una gota de sangre problema, se lavó tres veces con solución salina, se le agregó una gota de -- suero antihumano de Coombs, se centrifugó durante un minuto a 1000 r.p.m., se observó macroscópicamente buscando aglutinación; si hay aglutinación es positivo y de acuerdo al tamaño de los grumos se -- reporta de 1 a 4 cruces.

#### 5.- Coombs indirecto (cualitativo y/o cuantitativo, en la madre)

Se colocaron en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm, dos gotas de suero problema, se les agregaron dos gotas de una suspensión al 5% de eritrocitos "O", Rho (D) positivo en solución salina, se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se lavaron los glóbulos rojos tres veces con solución salina, se le agregaron dos gotas de suero antihumano de Coombs, se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante un minuto; agitandc suavemente el tubo se desprende el botón celular y se busca la aglutinación macroscópica. Si es positivo se cuantifica, acompañándose siempre de un testigo positivo.

#### Cuantificación:

A-Colocar una serie de tubos marcados del 1 al 10.

B-Agregar 0.1 ml. de albúmina bovina, al 30% a cada tubo.

C-Colocar 0.1 ml de suero problema en el tubo 1, mezclar y transferir 0.1 ml de la mezcla del tubo 1 al tubo 2, continuar así hasta el tubo 10.

D-Agregar 0.1 ml de una suspensión de eritrocitos "O", Rho (D) - positivos al 5% a cada tubo.

- E-Incubar a 37°C durante 30 minutos.  
 F-Centrifugar todos los tubos a 1500 r.p.m. durante un minuto.  
 G-Lectura: agitando suavemente buscar aglutinación macroscópica. La mayor dilución del suero que presente aglutinación en este momento dará el título de anticuerpos albúmino-activos.  
 H-Lavar los glóbulos rojos de todos los tubos con solución salina. Repetir la operación dos veces más.  
 I-Agregar una gota de suero antihumano de Coombs a cada tubo.  
 J-Centrifugar todos los tubos a 1500 r.p.m. durante un minuto.  
 K-Lectura: agitando suavemente el tubo, buscar aglutinación macroscópica. La mayor dilución del suero que presente aglutinación en este momento dará el título de anticuerpos incompletos.

6.- Detección y recuento de eritrocitos fetales en la circulación materna (Kleihauer) (26).

Este método depende del hecho de que la hemoglobina del adulto (Hb-A) es fácil de eliminar de los glóbulos rojos bajo la acción de un amortiguador de fosfato ácido a pH 3.4 - 3.6 mientras que la hemoglobina fetal (Hb-f) no es afectada y los hematies mantienen intacto su contenido, lo que permite la diferenciación objetiva de los eritrocitos fetales. La sangre se colecta en sequestreno, se diluye 1:1 con solución salina (0.9%), y se hace un frotis, procurando que no quede muy grueso, se seca rápidamente en el aire y se fija con alcohol etílico absoluto durante dos minutos. Las laminillas deben estar libres de grasa, incluso es preferible usar laminillas nuevas previamente desengrasadas con alcohol metílico. El buffer se prepara disolviendo 3.7814 gramos de ácido cítrico y 2.7869 gramos de fosfato de potasio dibásico en 100 ml de agua destilada; el pH se ajusta a 3.5 con ácido clorhídrico 0.1N a temperatura de 37°C. El buffer se conserva cinco días si se mantiene a 4°C. Una vez fijados los frotis se colocan en una jarra de coplin con el buffer que ha sido calentado a 37°C, durante cinco minutos y agitando constantemente. Si la preparación está bien hecha se le forma una película sobre el buffer; la laminilla se lava entonces con agua de la llave durante un minuto y se seca con papel filtro, con aire o en la estufa a 37°C si se desea puede hacerse tinción con cualquier método panóptico (Giemsa, Wright, etc.).

Las células maternas aparecen como retículos vacíos, mientras que las células fetales se ven como estructuras íntegras y refráctiles. Se debe tener un testigo positivo para checar la acción del buffer y para ello se puede usar una muestra de sangre de cordón umbilical.

El recuento de los eritrocitos fetales para la estimación del riesgo de la hemorragia transplacentaria, (H.T.P.) lo hicimos de acuerdo con los trabajos de Clarke (27), promediando las células fetales contadas en 50 campos microscópicos de 400 -

diámetros. Un recuento de 1 a 4 indica una hemorragia transplacentaria de menos de 0.25 ml, 5 a 60 células fetales indican aproximadamente una H.T.P. de 0.25 ml a 3.0 ml y la presencia de más de 60 eritrocitos fetales indica una H.T.P. de más de 3.0 ml.

Una forma más exacta de realizar el conteo es relacionar el número de células maternas con el número de células fetales; sin embargo, el primer método es ampliamente aceptable.

#### 7.- Prueba cruzada de compatibilidad con el RhoGAM.

Se prepara una suspensión al 5% de sangre de la paciente; se marcan tres tubos: testigo negativo, testigo positivo y problema. Al testigo positivo se le pone una gota de una suspensión al 5% de sangre "O" Rho (D) positiva, al tubo problema una gota de glóbulos de la paciente recientemente extraídos y suspendidos al 5% en solución salina fisiológica, se le agregan dos gotas de suero que contiene una dilución al 1:1000 de RhoGAM que va a ser inyectado a la puerpera y que tiene el mismo número de partida de fabricación. El testigo negativo contiene una gota de suspensión al 5% de glóbulos rojos de la paciente y dos gotas de albúmina, se mezclan y se incuban 30 minutos a 37°C, se lavan tres veces con solución salina y se les agrega a cada tubo una gota de suero antihumano de Coombs, se centrifugan un minuto a 1000 r.p.m. y se leen macroscópicamente.

Una reacción débilmente positiva puede deberse a las siguientes causas:

- a- La madre es Du positiva y por consiguiente no es candidato para recibir el tratamiento profiláctico con RhoGAM.
- b- Hay una mezcla de glóbulos maternos Rho (D) negativos y de eritrocitos fetales Rho (D) positivos, debido esto a un paso transplacentario masivo. En este caso, la madre debe ser considerada como candidato para el tratamiento profiláctico con RhoGAM siempre que se establezca que ella es Rho (D) negativa y esté dentro del lapso de las 72 horas post-partum.

#### 8.- Inyección intramuscular del RhoGAM.

Es importante tener en cuenta las siguientes reglas:

Antes de aplicar la inyección se debe verificar la coincidencia entre el número de partida de fabricación del RhoGAM con que se hizo la prueba de compatibilidad, con el número de partida impreso en el frasco de RhoGAM que habrá de inyectarse; además se debe establecer cuidadosamente la identificación de la paciente.

Empleando una jeringa de 2.5 ml de capacidad y observando técnica estéril se inyecta el contenido total del frasco. (Una dosis de RhoGAM marca Ortho que contiene 300 microgramos de globulina Rho (D) inmune humana).

## RESULTADOS

De 56 casos estudiados, 25 fueron considerados de alto riesgo de inmunizarse (Tabla No. 3) y 31 de riesgo mínimo (tabla No. 4).

Consideramos dentro del grupo de alto riesgo de inmunizarse a aquellas pacientes en las que la hemorragia transplacentaria sufrida durante el parto fué mayor de 0.2 ml. Dentro del grupo con riesgo mínimo incluimos a aquellas pacientes en las -- que la transfusión feto-placentaria sufrida durante el parto fué menor de 0.2 ml.

En la evaluación hemos considerado además de la hemorragia transplacentaria, la compatibilidad e incompatibilidad -- con el sistema ABO, el número de embarazos y la existencia de abortos y/o cesáreas.

En la tabla No. 3 se muestran los resultados de las 25 pacientes con alto riesgo, en ella se puede ver que todas fueron compatibles con el producto en el sistema ABO, y que se les administró una dosis de 300 microgramos de RhoGAM; la hemorragia transplacentaria estuvo comprendida entre los límites de 0.3 ml. y ninguna de ellas presentó inmunización. En la tabla No. 4 se muestran los resultados de las 31 pacientes con riesgo mínimo, - de estas 12 fueron compatibles con el producto en el sistema ABO y las 19 restantes fueron incompatibles, la hemorragia transplacentaria estuvo comprendida entre 0.05 ml. y 0.2 ml. se les administró una dosis de RhoGAM y en ninguna de ellas se demostró - inmunización.

T A B L A No. 3

FRECUENCIA DE INMUNIZACION AL FACTOR Rho (D) EN 25 MADRES Rho (D) NEGATIVAS CON ALTO RIESGO DE INMUNIZARSE, A QUIENES SE LES ADMINISTRO UNA DOSIS DE RhoGAM.

No. de pacientes	Gesta	Sistema ABO	H.T.P. (*)	Cesárea	Aborto	Dosis de RhoGAM	Inmunizada
1	1a.	Compatible	3.0 ml.	1	0	300 $\mu$ g	0
1	1a.	Compatible	1.0 ml.	1	0	300 $\mu$ g	0
15	1a.	Compatible	0.3 ml.	0	0	300 $\mu$ g	0
5	3a.	Compatible	0.3 ml.	0	1	300 $\mu$ g	0
3	2a.	Compatible	0.5 ml.	2	0	300 $\mu$ g	0

(\*) H.T.P. Hemorragia transplacentaria.

T A B L A No. 4

FRECUENCIA DE INMUNIZACION AL FACTOR Rho (D) EN 31 MADRES Rho (D) NEGATIVAS CON RIESGO MINIMO DE INMUNIZARSE, A QUIENES SE LES ADMINISTRO UNA DOSIS DE RhoGAM.

No. de pacientes	Gesta	Sistema ABO	H.T.P. (*)	Cesárea	Aborto	Dosis de RhoGAM	Inmunizadas
9	3a.	Compatible	0.2 ml.	0	2	300 $\mu\text{g}$	0
3	4a.	Compatible	0.2 ml.	0	0	300 $\mu\text{g}$	0
5	1a.	Incompatible	0.1 ml.	0	0	300 $\mu\text{g}$	0
14	2a.	Incompatible	0.05 ml.	0	0	300 $\mu\text{g}$	0

(\*) H.T.P. Hemorragia transplacentaria.

### COMENTARIO Y CONCLUSIONES

En los últimos años la gamma globulina anti D ha sido empleado en la prevención de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Los resultados han sido extremadamente uniformes con un índice de falla de 0.5% a los seis meses y un incremento hasta 1% después de un nuevo embarazo Rho (D) positivo. Estos índices comparados con el 15% de inmunización, en ausencia de protección con la gamma globulina nos dan una idea clara de la efectividad del programa de prevención.

La mayoría de los fracasos son probablemente debido a "sensibilización previa" más que a dosis inadecuadas de anti D; sin embargo, debemos mencionar la hemorragia transplacentaria (H.T.P.) como un factor que no debe subestimarse. Se ha sugerido que pacientes con H.T.P. masiva sean examinados nuevamente para búsqueda de células fetales 3 ó 4 días después de haber administrado la gamma globulina anti D y si aún se observaran células fetales debería aplicarse una nueva dosis de gamma globulina; en esta forma el factor H.T.P. desaparecería como riesgo importante (28).

Ocasionalmente la H.T.P. se presenta durante el embarazo, la mayoría de las veces durante el segundo trimestre, con suficiente tiempo para el desarrollo de anticuerpos antes del final de la gestación. Sin embargo es muy raro encontrar anticuerpos anti D en primíparas al momento del parto; para explicar esta falta de inmunización durante el embarazo es posible que exista un estado de anergia materna durante este tiempo; si esto fuera así, se aplicaría solamente a la inmunización primaria porque en mujeres ya inmunizadas por embarazo previo se desarrollan anticuerpos rápida y muy tempranamente.

Basados en lo anterior, nuestras pacientes fueron clasificadas en dos grupos siendo la condición principal el recuento de células fetales o grado de H.T.P. la cual estuvo comprendida entre ---



0.05 ml y 3 ml, concordando con los volúmenes encontrados por Freda y Clarke. (27).

La aplicación de una dosis de 300 microgramos de RhoGAM - brinda protección hasta en volúmen de 15 ml de transfusión feto-materna, de esta manera es posible calcular la dosis requerida para proteger debidamente a una paciente que haya presentado una macrotransfusión.

En nuestro estudio el grado de hemorragia transplacentaria (H.T.P.) nunca requirió la administración de más de una dosis de --- RhoGAM. Es importante mencionar que la razón de la existencia de células fetales en los casos de incompatibilidad ABO (riesgo mínimo) - es debido a que la destrucción no siempre es completa y además porque la gran mayoría de las sargres. fueron estudiadas dentro de las primeras 24 horas post-partum, lo cual puede no ser tiempo suficiente para que las células sean eliminadas.

Eventualmente es posible que nunca vuelva a nacer un niño con enfermedad hemolítica Rho, todo depende de que la mujer Rho (D) negativa, entienda el problema y desee recibir después de cada parto o aborto, una inyección de RhoGAM que prevendría una futura enfermedad hemolítica Rho.

Consideramos que los datos anotados en el presente trabajo pueden ser aceptados como prueba de la eficacia de RhoGAM en la enfermedad hemolítica Rho.

No se consideró necesario llevar un grupo control de pacientes en virtud de que los resultados de este tipo de estudios hace ya inecesaria la comparación con grupos control, además no es permisible que un porcentaje de pacientes resulte irremediabilmente inmunizado.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Freda V.J. Gorman, J.G. and Pollack, W. The use of Rh-immunoglobulin in the prevention of Rho disease. Bulletin of the Sloane Hospital for Women, 13: 93-97 1967.
- 2.- Levine, P. and Stetson, R.E : An unusual case of intragroup --- agglutination. J.A.M.A. 113: 126-127. 1939.
- 3.- Levine, P. Katzin, E.M. and Burnham, L.: "Isoimmunization in pregnancy; its possible bearing on erythroblastosis fetalis" J.A.M.A. 116: 825. 1941.
- 4.- Wiener A.S. and Peters, H.R.: Hemolytic reactions following transfusions of blood of the homologous group, with three cases in which the same agglutininogen was responsible. Ann. Intern.Med 13: 2306 1940.
- 5.- Race R.R.: An "incomplete" antibody in human serum. Nature 153: 771, 1944.
- 6.- Diamond, L.K. and Abelson, N.M.: The importance of Rho inhibitor substance in anti-Rh serums. J. Clin. Invest. 24: 122 1945.
- 7.- Coombs, R.R.A. Mournt, A.E. and Race R.R.: A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Brit. J. Exp. Path. 26: 255-257, 1945
- 8.- Hill, J.M. Haberman, S. and Jones F : Hemolytic Rh immune globulins: evidence for a possible third order of antibodies incapable of agglutination or blocking. Blood, Spec. Issue. 3: 80, 1948.
- 9.- Morton, J.A. and Pickles, M.M.: The proteolytic enzyme test in the detection of incomplete antibodies. J. Clin. Path. 4: 189-190 1951.

- 10.- Manion M.D.: Erythroblastosis foetalis, random thoughts. Med.J Australia. 48: 406, 1961.
- 11.- Levine, P.: Serological factor as possible cause in spontaneous abortions. J. Hered. 34: 71, 1943.
- 12.- González Ramos, M.: Mecanismos protectivos en la enfermedad hemolítica del recién nacido. Ginec. y Obstet. de Mex. 21: 469-471 1966.
- 13.- Clarke C A.: Practical effects of blood group incompatibility between mother and fetus. Brit. Med J. 4: 90-94, 1972.
- 14.- Freda, V.J Gorman, J.G. and Pollack,W.: Rh factor: prevention of isoimmunization and clinical trial on mothers. Science. 151: 828-830. 1966.
- 15.- Finn R. et al.: Experimental studies on prevention of Rh - haemolytic disease. Brit Med. J. 1: 1486 1961.
- 16.- Clarke, C.A. et al.: Further experimental studies on prevention of Rh - haemolytic disease. Brit. Med. J. 1: 979-984. 1963.
- 17.- Freda, V.J Gorman, J. Pollack, W Robertson, J.G Jennings, E.R. and Sullivan, J.F.: Prevention of Rh isoimmunization. J.A.M.A. 199: 390-394, 1967.
- 18.-Freda V.J. Gorman, J.G. and Pollack, W.: Successful prevention of experimental Rh sensitization in man with anti-Rho Gamma -globulin antibody preparation. Transfusión 4: 26-32 1964. 2
- 19.- Ascari, W.Q. Allen, A.E. Baker W.J. and Pollack W.: Rho (D) immune globulin (human) J.A.M.A. 205: 1-4. 1968
- 20.- Stern, K. Davidson, I. and Masaitis, L.: Experimental studies on Rh immunization, Amer, J. Clin. Path. 26: 833-843 1956.
- 21.- Bergstrom, H., Nilson, L.A. et al.: Demonstration of Rh antigens in a 38 day-old fetus. Amer. J. Obstet. Gynec. 99: 130-133 1967.
- 22.- Litwak, O. Taswell H.F., Banner W. and Keith, L : Fetal erythrocytes in maternal circulation after spontaneous abortion. J.A.M.A. 214: 531-534, 1970.
- 23.- Hughes-Jones. N.C. and Mollison. P.L.: Failure of a relatively small dose of passively administered anti-Rh to suppress primary immunization by a relatively large dose of Rh-positive red cells. Brit. Med. J. 1: 150-151 1968.

- 24.- Clarke C.A. et al : Prevention of Rh-haemolytic disease: Final results of the "High-Risk" Clinical trial. A combined study from Center in England and Baltimore. Brit. Med J. 2 : 607-609 1971.
- 25.- Kochwa S and Rosenfield R.E : Immunochemical studies of the Rh system. Isolation and characterization of antibodies J Immun 92: 682 1964
- 26.- Kleihauer E Braun, H and Betke K : Demonstration von fetalen hamoglobin in den erythrocyten eines blutansstirchs Klin Wschr 35: 637 1957
- 27 - Clarke C A : Prevention of Rh-haemolytic disease Brit Med J 4: 7-12 1967
- 28 - Mollison P.L.: Cuantitation of transplacental haemorrhage Brit Med J 3: 31-33 1972

801030

~~BIBLIOTECA~~

BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

