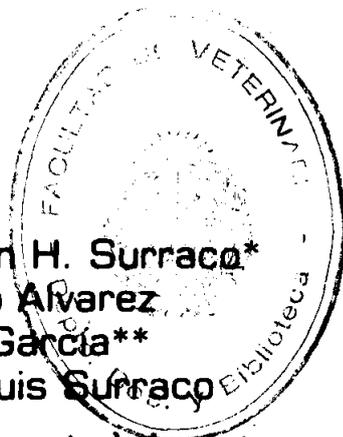


# Informe preliminar sobre la inmunización de un chivo adulto.



Dr. German H. Surraco\*  
Dr. Balbino Alvarez  
Q.F. Pilar García\*\*  
Br. José Luis Surraco

Desde principios de siglo, los médicos han trabajado con animales ya sea para obtener sueros terapéuticos como el anti-diftérico, antitetánico, antiofidico, etc., ya sea para obtener reactivos para el diagnóstico como el suero de cobayo como fuente de complemento, los glóbulos de camero en las reacciones de Paul y Brunnel y Wassermann, inmunización de conejos para la obtención de sueros anti M, anti N, anti P, etc.

Con la utilización de los sueros antiglobulina humana descriptos primeramente por Moreschi en 1908 y luego aplicados por Coombs en 1943 para el diagnóstico de la enfermedad hemolítica fetal, comenzó una era fructífera de la aplicación de los conocimientos de la inmunología, para la creación de reactivos que sirvieran en el laboratorio clínico para la identificación rápida y segura de diferentes compuestos proteicos del suero humano.

Es hoy día corriente la utilización de la inmuno-electroforesis, para la caracterización de los distintos componentes proteicos del plasma, basada en la realización del proteinograma electroforético para la separación de las proteínas y su precipitación, formando bandas características, con un suero animal antihumano.

En el momento actual la lista de sueros anti-producidos en animales para detectar proteínas, hormonas, antígenos tisulares, etc., del hombre es prácticamente inagotable.

Hasta ahora, la fabricación de algunos de estos sueros se realizaba en institutos oficiales o privados en los cuales se requería o no la colaboración de veterinarios.

Entendiendo que el manejo de los animales corresponde a los veterinarios que están en mejores condiciones para observar a los animales, cuantificar las reacciones que pueden aparecer etc., y considerando que ello puede ser de interés para el conocimiento de los estudiantes que se preparan para ejercer la profesión, se nos ha ocurrido realizar un ensayo de colaboración entre las Facultades de Medicina y Veterinaria para la obtención de uno de los reactivos de mayor utilización en el campo de la Hemoterapia es decir el suero antiglobulina humana.

Hemos elegido para esta experiencia el chivo de acuerdo a las técnicas descriptas por Dunsfor y Bowley (Technique in Blood Grouping, Oliver y Boyd ed segunda edición 1967).

La inmunización se realizó mediante 10 inyecciones intramusculares de 5 ml. de sueros frescos de sangre grupo O practicadas a intervalos de 4 días.

Transcurridos 10 días de la última inyección se extrajeron 200 ml. de sangre por la vena yugular externa.

La primera titulación del suero demostró la existencia de dos anticuerpos, un anticuerpo anti-especie con un título de 1/8 y otro anti-globulina humana con un título de 1/256 por lo que de acuerdo a los autores de la técnica corresponde procesar el suero, lo que consiste en la inactivación del complemento a 56°C para evitar las hemolisinas, la adsorción de los anticuerpos a distintas concentraciones para conocer a que dilución puede ser utilizado en la práctica.

Prof. Balbino Alvarez  
Dr. German Surraco

\* Director del Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas  
"Dr. Manuel Quintela"

\*\* Asistente

# PREPARACION DE UN SUERO ANTI-GLOBULINA HUMANA POR INMUNIZACION DE UN CHIVO

En el momento actual, un reactivo fundamental en la práctica médica diaria, que debería usarse en forma prácticamente ilimitada, es el suero anti-globulina humana. Sin embargo, su utilización se ve limitada a estrechos márgenes por el alto costo, debido a que es un producto de importación. Su producción si bien laboriosa, es técnicamente fácil de realizar.

En esta comunicación relatamos, como hemos procedido, para la elaboración de este reactivo por inmunización de un chivo, y los resultados obtenidos.

Este reactivo es en esencia, un anticuerpo específico contra las proteínas humanas (en particular contra las globulinas), y se prepara inyectando un animal con suero humano total, o con alguno de sus componentes, con el fin de inmunizarlo para que forme los anticuerpos que se desean.

En nuestro país, se ha utilizado el conejo, que tiene el gran inconveniente de dar muy poco suero, por su reducido tamaño, por lo que es útil solamente para obtener suero para un laboratorio hospitalario. Por esta razón y porque nuestro objetivo es proporcionar suero anti-globulina que pueda llegar a ser utilizado por todos los Servicios de Hemoterapia del país, hemos elegido el chivo, que reúne además la condición de ser un animal mucho más rudo y por lo tanto más fácil de criar.

Debemos recordar, que el primero en preparar este reactivo en el chivo, en nuestro país, fue el malogrado Br. Sarandí Zolessi hace ya más de quince años, con muy buenos resultados.

Como establecíamos en nuestro informe preliminar, buscamos además hacer un trabajo conjunto de colaboración, con

la Facultad de Veterinaria, ya que los médicos veterinarios están en mejores condiciones para manejar los animales, observar y cuantificar las reacciones que pudieran aparecer, y considerando además, que ello puede ser de interés para la formación de los estudiantes que se preparen en la misma.

En nuestra exposición adoptaremos el siguiente orden:

- 1º— Procedimiento empleado para la inmunización del animal
- 2º— Investigación preliminar del suero obtenido
- 3º— Adsorción de los anticuerpos anti-especie
- 4º— Titulación del suero, después de adsorbido
- 5º— Resultados obtenidos en las pruebas realizadas
- 6º— Estudio inmunoeléctroforético

## 1º - PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA INMUNIZACION DEL ANIMAL

Eligimos un chivo de un año de edad, y de aproximadamente 20 Kgrs. de peso. Adoptamos como técnica de inmunización, la inyección de una mezcla de suero humano total fresco (se extraía la sangre por la mañana, y se inyectaba el suero en la tarde del mismo día) de por lo menos cinco dadores pertenecientes al grupo O.

Se inyectaron 5 mls. de suero por vez, cada cuarto día, por vía intramuscular, rotando el lugar de inyección, en las nalgas y en la región subescapular, hasta totalizar diez dosis.

La inmunización fue perfectamente tolerada por el animal, no habiéndose observado ningún tipo de reacción.

Pasados diez días de la última inyección se practicó una extracción de 200 mls. de sangre, por punción de la vena yugular externa, en frasco evacuado estéril, sin anti-coagulante.

Se colocó luego el frasco en bañomaría a 37°C., durante 24 hrs. para lograr la retracción del coágulo. Como detalle práctico debemos señalar, que el coágulo es sumamente irretráctil, y que el suero que obtuvimos tenía una intensa coloración rojiza debido a la hemólisis que se produjo con las maniobras efectuadas para desprenderlo de las paredes del frasco.

Para todas estas maniobras se guardaron las máximas precauciones de esterilidad.

### 2º— INVESTIGACION PRELIMINAR DEL SUERO OBTENIDO

Previa inactivación del suero obtenido en bañomaría a 56°C, durante 30 minutos,

para destruir el complemento, se realizó una titulación del mismo, en lámina, empleando como diluyente solución salina (ClNa al 90%), y glóbulos rojos O Rh positivos sensibilizados con un suero anti-Rh, incompleto, con un título en medio albuminoso de 1/8, y con los mismos glóbulos sin sensibilizar.

La sensibilización de los glóbulos O Rh positivos, se realizó incubando los glóbulos suspendidos en solución salina, con el suero anti-Rh, volumen a volumen, durante 60 minutos, en bañomaría a 37°C, luego de lo cual se lavaron tres veces con solución salina.

Los resultados obtenidos pueden verse en el cuadro I.

Suero	DILUCIONES									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Antiglobulina	+++	+++	++	++	++	+	+	+-	-	-
Glóbulos Sensibilizados	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Glóbulos sin Sensibilizar	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

CUADRO I

La interpretación de estos resultados es la siguiente, en primer lugar al no haber hemólisis, en ninguna de las diluciones, se puede concluir que el suero está bien inactivado, en segundo lugar que el suero contiene dos anticuerpos, uno que reacciona con los glóbulos Rh positivos sensibilizados con un anticuerpo anti-Rh incompleto, que es por lo mismo una globulina gama, a una dilución de 1/256, este anticuerpo es una anti-globulina, y otro que aglutina a los glóbulos rojos O Rh positivos sin sensibilizar a una dilución de 1/8, que es un anticuerpo anti-especie.

De acuerdo con lo que establecen los autores consultados, al ser el anticuerpo antiglobulina 20 veces mayor que el anticuerpo anti-especie, vale la pena procesar el suero.

### 3º— ADSORCION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-ESPECIE

Se emplearon glóbulos concentrados O y A<sub>1</sub>B, frescos, extraídos en el día, de sangre recogida en ACD.

Se filtraron por gasa estéril, y luego se procedió a su lavado con solución salina, en la proporción de 2/3 de solución salina y 1/3 de concentrado globular.

Luego de mezclarlos bien por agitación, se centrifugaron, decantando el sobrenadante, y repitiendo esta operación hasta completar cinco lavados. Al sobrenadante del primero, tercero, cuarto y quinto lavados, se les efectuó una investigación de proteínas, mediante la reacción del ácido sulfosalicílico al 25%, comprobándose

que el sobrenadante del cuarto lavado no daba más enturbiamiento, realizándose igualmente el quinto lavado. El suero del animal inmunizado, diluido con un volumen igual del suero del lavado del coágulo, se incubó durante 1 hora a 4°C, con un volumen igual, primero de glóbulos O Rh positivos lavados, y luego de centrifugado, el sobrenadante se incubó de la misma forma con un volumen igual de glóbulos A<sub>1</sub>B. Luego de centrifugado nuevamente, se decantó en sobrenadante, realizándose con el mismo, una nueva titulación con glóbulos sensibilizado y sin sensibilizar.

#### 4º— TITULACION DEL SUERO DESPUES DE ADSORBIDO

A) Titulación con glóbulos sensibilizados con anticuerpos gama a distintas concentraciones, y con glóbulos sin sensibilizar.

a) Se lavan glóbulos O Rh positivos con solución salina.

b) Se incuban, volumen a volumen, con un suero anti-Rh incompleto, con un título en albúmina de 1/8, en partes iguales, con suero puro, con dilución al 1/2, con una dilución al 1/4, y con una dilución al 1/8. Se debe incubar una cantidad suficiente de cada una de ellas, como para poder

realizar 10 determinaciones. Luego de 1 hora de incubación en bañomaría a 37°C, se lavan 3 veces con solución salina.

c) Se diluye el suero que se está investigando con solución salina desde 1/2 hasta 1/512.

d) En lámina de vidrio, cuadrículada, bien lavada (no debe contener residuos de proteínas, porque inhibiría las reacciones) se colocan en los casilleros verticales, 1 gota del suero a investigar, poniendo en la primera fila suero sin diluir, y terminando en la última con la dilución de 1/512.

e) En la última fila vertical, se coloca en cada uno de los casilleros, una gota de suero anti-globulina conocido.

f) En los casilleros horizontales, se coloca en cada una de las divisiones, 1 gota de la suspensión de glóbulos sensibilizados en la siguiente forma, en la primera fila glóbulos sensibilizados con suero anti-Rh sin diluir, en la segunda con glóbulos sensibilizados con suero diluido al 1/2, en la tercera con glóbulos sensibilizados con suero diluido al 1/4 y en la cuarta con glóbulos sensibilizados con suero diluido al 1/8.

g) En las tres últimas filas horizontales se colocan en cada casillero, glóbulos lavados sin sensibilizar, de sangre grupo O en la primera, grupo A en la segunda y grupo B en la tercera. Ver cuadro II.

Dilución del suero a investigar.	Puro	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	Contr. Antig. Comer.
Glóbulos sensibilizados con												
Suero Anti-Rh Puro	++++	++++	+++	++	++	++	++	+	+-	-	-	++++
Suero Anti-Rh diluido al 1/2	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	+++
Suero Anti-Rh diluido al 1/4	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	++
Suero Anti-Rh diluido al 1/8	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Glóbulos sin sensibilizar												
Grupo O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**CUADRO II**

h) Interpretación. El título del suero anti-globulina con glóbulos sensibilizados completamente, es de 1/256, y con glóbulos parcialmente sensibilizados es de 1/32. Las reacciones son comparables a la de un suero anti-globulina conocido (de origen comercial).

Los anticuerpos anti-especie, han quedado casi completamente adsorbidos, porque el suero solo aglutina los glóbulos lavados no sensibilizados, cuando está sin diluir.

B) Titulación con glóbulos sensibilizados con anticuerpos no-gama.

a) Se incuban glóbulos grupo O, frescos, lavados con solución salina, volumen a volumen, con suero fresco de sangre AB, durante 2 hs. a 4°C.

b) Se lavan tres veces con solución salina y se lee para ver si los glóbulos no están aglutinados.

c) Se coloca en tubos, una gota de estos glóbulos, con el suero a investigar en las siguientes diluciones 1/4, 1/8 y 1/20.

d) Como testigo, incubamos los glóbulos sensibilizados con anticuerpos no-gama con un suero comercial (Suero anti-globulina Dade) puro y diluido al 1/8.

e) Como control negativo, se utilizan los mismos glóbulos sin sensibilizar.

Los resultados pueden verse en el cuadro III.

Suero Anti-globulina	Glóbulos Sensibilizados	Glóbulos sin Sensibilizar
Diluido al 1/4	+++	-
Diluido al 1/8	+++	-
Diluido al 1/20	+++	-
Suero dade puro	+	-
Suero Dade al 1/8	+	-

**CUADRO III**

f) Interpretación de los resultados. El suero investigado contiene un anticuerpo anti-no-gama globulina a una dilución de 1/20.

**5º— RESULTADOS OBTENIDOS EN DISTINTAS PRUEBAS REALIZADAS**

A) Se realizan pruebas con el suero antiglobulina puro diluido al 1/20, 1/40 y 1/80 y glóbulos rojos grupo O Rh positivo, sensibilizados con diversos sueros anti-Rh incompletos, usando como control negativo los mismos glóbulos sin sensibilizar, como lo indica el cuadro IV.

Suero Antiglobulina	Glóbulos Sensibilizados					Sin sensibilizar Control
	Ortho	X-2	X-3	X-3 SM	X-3(2)	
Puro	+++					
1/20	+++	+	++	++++	+++	-
1/40		(+-)	+	+++	++	-
1/80		-	(+-)	++	+	-

**CUADRO IV**

Interpretación. La dilución óptima para utilizar el suero antiglobulina investigando, es la de 1/20.

B) Se realizan estudios con el suero anti-globulina puro y a las diluciones de 1/20, 1/40 y 1/80 y glóbulos Du sensibilizados con un suero anti-Rh incompleto sin diluir y a la dilución de 1/128, y con glóbulos de una sangre de cordón con prueba de la anti-globulina positiva, como lo indica el cuadro V.

Suero Anti-globulina	Glóbulos Du Sensibilizados con Suero R.T. puro	Glóbulos Du Sensibilizados con suero R.T. 1/128	Glóbulos de cordón
Puro	++++	+++	+++
1/20	++	++	++
1/40	+	+	+
1/80	-	-	-

## CUADRO V

## RESUMEN

**Interpretación.** El suero anti-globulina investigando, actúa bien con glóbulos Du sensibilizados y frente a glóbulos de cordón con prueba de la anti-globulina positiva hasta una dilución de 1/40.

C) Se investigaron 106 muestras de sangre Rh negativo, con prueba indirecta de la anti-globulina, con un suero antiglobulina comercial (Dade) y con el suero en estudio, detectándose una muestra Du positivo, es decir que en las 105 muestras restantes no se observó aglutinación.

**Interpretación.** El suero anti-globulina estudiado se comporta igual que el suero anti-globulina de control, no da reacciones falso positivas y aglutina los glóbulos Du sensibilizados.

### 6º— ESTUDIO INMUNOELECTROFORÉTICO

El estudio inmunolectroforético realizado por el Prof. Dr. Heriberto Delfino, es el siguiente:

“El suero estudiado presenta:

- Anti albúmina discreta
- Anti alfa 1 A
- Anti alfa 1 Lipo
- Anti haptoglobina
- Anti alfa 2 M
- Anti alfa 2 Lipo
- Anti inmunoglobulina G”

1º— Se inmuniza un chivo de 20 Kgrs. de peso, con 10 inyecciones intramusculares de 10 mls. de suero humano total de sangre fresca grupo O.

2º— Se efectúa una primera titulación comprobándose la existencia de dos anticuerpos, anti-especie con un título de 1/8 y anti-globulina con un título de 1/256.

3º— Se inactiva al suero, y luego se adsorben los anticuerpos anti-especie con glóbulos lavados grupo O y A1B.

4º— Se realiza una nueva titulación, comprobándose que el anticuerpo anti-especie ha sido prácticamente adsorbido, y que el anticuerpo anti-globulina conserva un título de 1/32 para glóbulos débilmente sensibilizados con un anticuerpo gama-globulina.

5º— Se investigan anticuerpos anti-nogama-globulina, comprobándose que existen con un título de 1/40.

6º— Se practican diversas investigaciones, concluyéndose que la dilución óptima para utilizar el suero, tanto para anticuerpos gama como para anticuerpos nogama, es la de 1/20. En esta dilución da reacciones claras, tanto glóbulos de la variedad Du, como con diferentes sueros anti-Rh incompletos, en distintas diluciones, y con glóbulos revestidos con anticuerpos no-gama.

7º— La inmunolectroforesis pone en evidencia, que el suero posee anticuerpos contra un amplio espectro de globulinas.

## BIBLIOGRAFIA

1.— Dunsford & Bowley - «Techniques in Blood Grouping» - 2nd Edition Oliver & Boyd. Edinburg y London. 1967.

2.— Mollison P.L. - «Blood transfusion in Clinical Medicine» - 3rd Edition Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1961.