

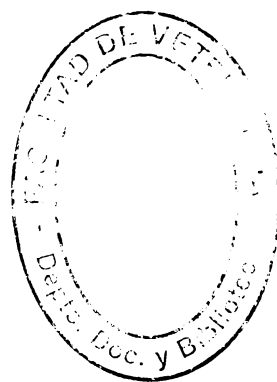
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS EN PERROS:
PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE COMPATIBILIDAD SANGUÍNEA Y TIPIFICACIÓN DE
GRUPOS SANGUÍNEOS.**

POR

**Nicolás CAZALES PENINO
Arturo JUAMBELTZ MARTINEZ
Paulina ALGORTA ARTAGAVEYTIA**



TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.
(Orientación Medicina Veterinaria).

MODALIDAD: Trabajo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2008**

102 TG
Transfusiones s
Cazales, Nicolás



PAGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Alvaro Hernández

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Martín Breijo Dotta

Tercer miembro:

Dra. Jacqueline Maisonnave

Cuarto miembro (Cotutor)

Dr. Edgar Lima

Fecha:

Autores:

Cazales Penino, Nicolás

Juambeltz Martinez, Arturo Martín

Algorta Artagaveytia, Paulina

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo del Departamento de Ciencias Microbiológicas, Área Inmunológica, Facultad de Veterinaria; Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Queremos agradecer especialmente al Dr. Edgar Lima por su iniciativa e invaluable aporte, al Dr. Rodolfo Ungerfeld por su disposición a colaborar brindándonos sus animales para la extracción de muestras y a las clínicas veterinarias, propietarios y mascotas que permitieron llevar a cabo este trabajo.

No queremos dejar de agradecer a nuestro tutor, el Dr. Martín Breijo, por la ayuda que nos brindó y por siempre llevarnos a la excelencia.

A nuestras familias y amigos por su paciencia y apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	1
3. INTRODUCCIÓN.....	2
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1 GRUPOS SANGUÍNEOS EN PERROS.....	5
4.1.1. Sistema DEA 1.....	6
4.1.2. Sistema DEA 7.....	7
4.1.3. Sistema DEA 3.....	7
4.1.4. Sistema DEA 4.....	7
4.1.5. Sistema DEA 5.....	8
4.1.6. Otros sistemas de antígenos eritrocitarios.....	8
4.2 PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD SANGUÍNEA.....	8
4.3 TRANSFUSIONES COMO HERRAMIENTA EN LA CLÍNICA VETERINARIA.....	10
4.3.1. Donantes de sangre.....	10
4.3.2. Hemocomponentes.....	11
4.3.2.1. Sangre entera.....	11
4.3.2.2. Concentrado de eritrocitos.....	11
4.3.2.3. Plasma rico en plaquetas.....	12
4.3.2.4. Plasma fresco congelado.....	12
4.3.2.5. Plasma Congelado.....	12
4.3.2.6. Crioprecipitado.....	12
4.3.3. Uso terapéutico de los hemoderivados.....	12
4.3.4. Indicaciones para realizar transfusiones.....	13
4.3.5. Realización de la transfusión.....	14
4.3.6. Autotransfusión.....	14
4.4. PATOLOGÍAS TRANSFUSIONALES.....	14
4.4.1. Reacciones Inmunomediadas.....	15
4.4.2. Reacciones no inmunomediadas.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1. GENERALES.....	17
5.2. PARTICULARES.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1. PRUEBAS DE TIPIFICACIÓN Y COMPATIBILIDAD CON REACTIVOS DE USO HUMANO.....	18
6.1.1 Tipificación de grupos sanguíneos de los integrantes del grupo de tesis.....	18
6.1.2. Prueba de compatibilidad y Test de Coombs entre los integrantes del grupo de tesis.....	18
6.2 DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA ANALIZAR COMPATIBILIDAD EN PERROS.....	19
6.2.1. Desarrollo y estandarización del suero anti-glóbulos rojos de oveja.....	19
6.2.2. Estandarización de la anti IgG canina producida en conejo para el Test de Coombs.....	19
6.3 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD.....	19
6.3.1. Perros donantes y receptores.....	19

6.3.2. Preparación de GR de donantes.....	20
6.3.3. Crossmatching y Test de Coombs.....	20
6.4. PRUEBAS DE TIPIFICACIÓN.....	20
6.4.1. Tipificación del sistema DEA 1.....	20
7. RESULTADOS.....	21
7.1 PRUEBAS DE TIPIFICACIÓN Y COMPATIBILIDAD CON REACTIVOS DE USO HUMANO.....	21
7.2 DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE COMPATIBILIDAD PARA SU USO EN PERROS	22
7.2.1. Estandarización de suero anti GR de oveja obtenido en perro.....	22
7.2.2. Estandarización de la anti IgG canina obtenida de conejo.	22
7.3 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD	22
7.4 PRUEBAS DE TIPIFICACION.....	22
8. DISCUSIÓN	23
9. CONCLUSIÓN	25
10. BIBLIOGRAFÍA	26
11. ANEXOS.....	29

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

30

Cuadro N° 1 - Prueba de Compatibilidad y Test de Coombs para determinación de compatibilidad entre donante y receptor.....	29
Cuadro N°2 - Tipificación de grupo DEA 1.1 con Rapid Vet- H Kit	30
Figura N°1 - Tipificación de grupos sanguíneos con el Kit Span Diagnostics Ltd. del sistema ABO y Rh en humanos.....	31
Figura N° 2- Producción de suero antiglobulinos rojos ovinos en perros	32
Figura N° 3 - Posibles lecturas en pruebas de compatibilidad sanguínea en perros	33
Figura N° 4 - Tipificación del grupo sanguíneo DEA 1.1 con el kit Rapid Vet-H ® en perros.	34

1. RESUMEN

La transfusión de glóbulos rojos y/o hemocomponentes es una herramienta válida para el tratamiento de diversas patologías asociadas con hemorragias (agudas o crónicas), destrucción de glóbulos rojos, falta en la producción y/o desórdenes en la coagulación. Dentro de este grupo de patologías, en la clínica veterinaria, la pérdida de sangre es el problema más frecuente, seguido por los desórdenes hemostáticos como la coagulación intravascular diseminada, y las trombocitopenia inmunomediadas (29).

Las transfusiones sanguíneas son una práctica de rutina en humanos y se está extendiendo cada vez más en la medicina veterinaria, en especial para su aplicación en la clínica de pequeños animales. En Estados Unidos y algunos países de América Latina existen bancos de sangre para pequeños animales, funcionando exitosamente.

Para un uso seguro de la sangre y sus hemocomponentes en la terapia transfusional se requiere estudiar la compatibilidad sanguínea entre donante y receptor, para minimizar la ocurrencia de reacciones adversas basadas principalmente en reacciones antígeno anticuerpo.

En caninos, los anticuerpos naturales contra antígenos eritrocitarios no producen reacciones hemolíticas graves como lo hace en el humano, por lo tanto, la probabilidad de reacciones adversas frente a una primera transfusión incompatible es baja. Sin embargo, frente a una segunda transfusión no compatible o en el caso de pacientes con patologías inmuno mediadas va a producirse una reacción inmune que puede agravar su cuadro clínico.

Por ello el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un protocolo de transfusión para caninos a través del diseño de un kit de compatibilidad. Este protocolo junto con la tipificación de grupo sanguíneos permite instrumentar de manera segura una transfusión.

2. SUMMARY

Red blood cells (RBC) and blood component are valid tools in order to treat different pathologies associated to acute or chronic bleeding, RBC destruction, insufficient RBC production and coagulopathy disorders. Within these pathologies, the loss of whole blood is the most frequent problem in veterinary clinics, followed by haemostatic disorders such as the disseminated intravascular coagulation (DIC) and the immunomediated thrombocytopenia.

Blood transfusion is a routine practice in humans and it is becoming popular in veterinary medicine, specially in small animal clinics.

In the United States and some countries of Latin-America, blood banks for small animals already exist and they are functioning well.

For a safe use of whole blood and blood components in transfusion medicine, it is very important to evaluate blood compatibility between the donor and the recipient, in order to minimize the occurrence of adverse transfusion reactions, mainly based on the formation of antigen-antibody complex.

In canines naturally occurring antibodies against erythrocytes antigen do not produce severe hemolytic reactions as it does in humans. Therefore, the probability of adverse reactions in a first transfusion is low. However, in a second incompatible transfusion or in case of a patient with immunemediate pathology, there would probably occur very important immune-reactions.

For this reason the objective of the present work was to develop a canine transfusion protocol through the design of a blood compatibility kit that, together with the blood group typing, allows to achieve a safe transfusion.

3. INTRODUCCIÓN

La transfusión de sangre es el procedimiento médico de incorporar sangre o sus componentes procedentes de un individuo en el sistema circulatorio de otro, utilizado para mantener con vida a los pacientes que han sufrido pérdidas excesivas de sangre por traumas o cirugía, o para proporcionar algún elemento necesario en caso de enfermedades que afectan la producción de glóbulos rojos, blancos o algún otro componente sanguíneo.

Desde el punto de vista clínico, las principales razones para el uso de estos componentes sanguíneos son la de aumentar la capacidad de transporte de oxígeno; mejorar la hemostasia; aumentar la concentración de proteínas plasmáticas en animales hipoproteinémicos o hipovolémicos y suministrar inmunoglobulinas en animales inmunodeprimidos.

Hoy en día es una práctica de rutina en medicina humana y muy extendida en la medicina veterinaria, en especial para su aplicación en la clínica de pequeños animales. Existen en Estados Unidos y en algunos países de América Latina bancos de sangre privados para pequeños animales, funcionando exitosamente. Son ejemplo de ello el Eastern Veterinary Blood Bank y el Midwest Bank que brindan asesoramiento a clínicas y veterinarios.

El estudio de los grupos sanguíneos y su importancia en la medicina transfusional tuvo sus comienzos por el año 1600 a través de un médico llamado Richard Lower. A él se le atribuyeron las primeras transfusiones de canino a canino y de ovejas a hombres registrados en la historia, introduciendo las premisas transfusionales básicas.

En la clínica veterinaria, Von Dunger y Hirszfeld en 1910 documentaron la presencia de cuatro antígenos llamados hemolisinas y aglutininas caninas basándose en alloinmunizaciones (14). En la revisión histórica realizada por Hale, A. (1995)

menciona que de 1937 a 1949, Wright *et al.* (1949) definieron la presencia de seis grupos sanguíneos en perros (14, 36).

En la actualidad, es internacionalmente aceptado en perros, el sistema de denominación DEA (Dog Erythrocyte Antigen), que se basa en 7 sistemas de antígenos denominados DEA 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8

Pero, ¿cual es la relevancia de los grupos sanguíneos en la terapia transfusional? Como es sabido al transplantar un tejido de un individuo a otro, el sistema inmune del organismo receptor reconoce componentes que no son propios, y se activan mecanismos que llevan a la lisis celular y la posterior muerte del tejido transplantado. Básicamente, la respuesta inmune se dirige contra antígenos expresados en la superficie de las células, siendo los más inmunogénicos los llamados antígenos de histocompatibilidad (MHC). Estos últimos son expresados por todas las células nucleadas de los organismos superiores y juegan un rol importante en la presentación de alteraciones de un tejido al sistema inmune del hospedador debidas a presencia de patógenos, cambios neoplásicos, mutaciones etc. A pesar que el sistema MHC es el más antigénico, existen otros antígenos capaces de desencadenar una respuesta inmune y provocar la muerte del tejido. Por otro lado, es importante considerar que cuanto más diferencias existan entre los antígenos, mayor será la respuesta desarrollada.

El trasplante de glóbulos rojos (GR), en principio es uno de los trasplantes que menos rechazo genera, debido a que en la mayoría de las especies, los GR no son nucleados y no presentan sistema de MHC (37). Sin embargo otros antígenos de superficie (antígenos que definen grupos sanguíneos) pueden desencadenar una respuesta inmune capaz de matar las células transfundidas (37). La muerte celular en este caso, es debida a la señalización de los GR extraños por parte de los anticuerpos generados como respuesta. Estos GR son eliminados por la activación del complemento en un proceso conocido como lisis osmótica (hemólisis intravascular) o por el sistema retículo endotelial (hemólisis extravascular) que fagocita los GR señalizados (proceso conocido como opsonización). Por tal razón, el éxito de un trasplante depende del grado de respuesta inmune que sea capaz de inducir. Esta última será dependiente del grado de homología que exista entre el donante y el receptor (37). Entonces el análisis de compatibilidad es crítico para lograr un eficaz tratamiento y evitar complicaciones clínicas en el procedimiento. Estas complicaciones en el caso de una transfusión incompatible, pueden ir desde una menor vida media de los GR transfundidos por el secuestro de GR extraños opsonizados, hasta la hemólisis general aguda por lisis de las células por parte del sistema complemento.

La mayor parte de los antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos son proteínas o carbohidratos que forman parte de la membrana celular (37). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los eritrocitos son capaces de adsorber otros antígenos solubles presentes en suero, saliva y otros líquidos corporales, y expresarlos en su superficie (37).

Los antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos, se denominan antígenos de grupos sanguíneos y son los que definen el grupo sanguíneo de un animal.

La expresión de la mayoría de los Antígenos Eritrocitarios Caninos (DEAs) se encuentra regulada por genes que se heredan de forma independiente y regida bajo las leyes Mendelianas de dominancia simple (37). Siendo las excepciones aquellos antígenos que son adsorbidos del medio, como por ejemplo el DEA 7 (14). Es importante mencionar, que en los animales y el hombre pueden encontrarse anticuerpos que reconozcan antígenos de grupo sanguíneo, aún cuando no fueran directamente expuestos a los mismos (anticuerpos naturales). Se piensa que surgen en respuesta a la exposición a antígenos que se encuentran comúnmente en el ambiente, compartidos por ácaros, polvo, flores, alimentos, etc. (37).

La incidencia de los anticuerpos naturales (generalmente de isotipo IgM) no es tan importante en el perro como en el hombre. Es por lo dicho anteriormente, que en una primera transfusión no se producirán consecuencias graves desde el punto de vista clínico, mas allá de una reducción de la vida media eritrocitaria producida por la eventual incompatibilidad de la sangre transfundida (37).

Hasta el momento se han encontrado únicamente anticuerpos naturales contra los DEA 3, 5 y 7, siendo solamente las interacciones DEA 1.1 y 1.2 con sus respectivos anticuerpos generados por una transfusión incompatible capaces de provocar una reacción transfusional hemolítica aguda que comprometan seriamente la vida del paciente (14).

Varios estudios han analizado la distribución de estos grupos sanguíneos en diferentes poblaciones caninas. Ejima et al. (1982), describieron la frecuencia del sistema DEA 1 en perros criados en Japón. Encontraron una mayor incidencia de perros DEA 1 positivos en perros cruce (82%), cuando lo compararon con la incidencia en perros Beagles (55%) (10, 27).

Hale 1995, describió una prevalencia en Estados Unidos del 63,5% de perros cruce DEA 1.1 positivos, mientras que solamente un 1,2% eran DEA 1.2 positivos. También encontró que un 43,5% de los ovejeros alemanes eran DEA 1.1 positivos y solamente el 4% eran DEA 1.2 positivos. (12,14). Novais A.A. et al 1999, estudiaron la frecuencia del sistema DEA 1 (1.1 y 1.2) en perros de raza y cruces realizado en el Hospital Veterinario de la Universidad Estatal de San Pablo, Brasil (27). Los resultados obtenidos mostraron una prevalencia general del 91,3% del sistema DEA 1, comprendiendo un 51,3% de los perros DEA 1.1 positivos, y un 40% DEA 1.2 positivos. Solamente un 8,7% de los perros testeados fueron negativos para el sistema DEA 1 (27). La prevalencia encontrada en este estudio fue significativamente mayor que en los estudios realizados por otros autores de otras partes del mundo para perros criados en otros países.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 GRUPOS SANGUÍNEOS EN PERROS

Los eritrocitos poseen antígenos particulares (glicoproteínas y glicolípidos) sobre la superficie de su membrana celular y son estos los que nos permiten clasificar los grupos sanguíneos dentro de cada sistema. Como hemos mencionado anteriormente, más de una docena de sistemas sanguíneos han sido descritos en el perro. Los mismos fueron denominados Dog Erythrocyte Antigens (DEA) siendo los más importantes en la medicina transfusional los DEA 1.1, 1.2 y 7 (5, 14). (Cuadro Nº 1). La recepción por parte de un paciente DEA 1.1 negativo de sangre DEA 1.1 positivo provocará la formación de anticuerpos (Ac) anti-DEA 1.1 (alloanticuerpos). En caso de una nueva transfusión en iguales condiciones, los anticuerpos previamente generados provocarán una pérdida prematura de los eritrocitos transfundidos, disminuyendo la eficacia terapéutica de la transfusión (9,14). Similar a lo que sucede con el grupo DEA 1.1, acontece con transfusiones incompatibles para el grupo DEA 1.2 (36).

En contraste con lo que ocurre con el sistema DEA 1, el sistema DEA 7 esta basado en la presencia de un antígeno (Ag) soluble (no es un Ag eritrocitario en si mismo) que es adsorbido por la superficie de membrana de los eritrocitos. Dado que este Ag es muy común en el ambiente existe alta incidencia de Ac naturales en los perros DEA 7 negativos. (9, 31,40). Por lo expuesto anteriormente se considerará a un perro como donante universal aquel perro que sea negativo para los DEA 1.1, 1.2 y 7 (14). Los demás sistemas sanguíneos poseen poca importancia clínica en transfusiones incompatibles, aunque siempre se verá afectada la vida media de los eritrocitos transfundidos ante cualquier clase de incompatibilidad (22, 24,).

DEA	Incidencia Poblacional (USA) %	Anticuerpos naturales	Importancia transfusional
1.1	42	no	reacción hemolítica aguda
1.2	20	no	reacción hemolítica aguda
3	6	si	reacción demorada corta vida ½ eritrocitaria no hay hemólisis
4	98	no	ninguna
5	23	si	reacción demorada corta vida ½ eritrocitaria no hay hemólisis
7	45	si	reacción demorada corta vida ½ eritrocitaria no hay hemólisis

Cuadro Nº 1- Clasificación, ocurrencia e importancia clínica de los antígenos eritrocitarios caninos más importantes en USA. (Hale, AS. 1995. The Veterinary clinics of North America).

4.1.1. Sistema DEA 1

Este sistema vendría a ser el homólogo del sistema ABO del ser humano y está definido por múltiples alelos, que producen fenotípicamente los siguientes antígenos 1.1, 1.2, 1.3 y un tipo nulo. Un perro, sólo puede presentar uno de estos cuatro fenotipos. Entonces existen 3 alelos para un solo locus para cuatro fenotipos posibles. Estudios de descendencia sugieren la existencia de un tipo de dominancia simple autosómica del tipo Mendeliano. O sea que un perro de fenotipo 1.1 puede tener los siguientes genotipos, 1.1/1.1, 1.1/1.2, 1.1/1.3 y 1.1/- , pudiendo concluir que el DEA 1.1 es dominante frente a cualquiera de los otros alelos (14, 16, 40). (Cuadro N° 2).

Los DEA 1.1 y 1.2 han sido estudiados por su significado en las transfusiones (5, 14). La presencia de anticuerpos naturales contra estos antígenos todavía no ha sido encontrada. Ello explica que en una primera transfusión no ocurriera ninguna reacción clínicamente significativa. Sin embargo, si un perro negativo es expuesto a eritrocitos 1.1 o 1.2 positivos y a consecuencia resulta sensibilizado; en una segunda exposición puede desencadenarse una fuerte hemólisis.

Además la realización de transfusiones a ciegas en perras DEA 1 negativas preñadas puede causar la producción de Ac contra DEA 1.1 y DEA 1.2. En este caso, los cachorros DEA 1.1 o 1.2 positivos padecerán una reacción hemolítica inmunomediada debido a los anticuerpos maternos presentes en el calostro (isoeritrolisis neonatal). Los cachorros DEA 1.1 positivos son normales al nacimiento, manifestando una anemia hemolítica a los tres a cinco días de nacidos. Esta puede ser la causa por la cual hay perras que tienen una alta mortalidad peri natal de sus crías (14, 37).

Los perros DEA 1.3 no han sido todavía evaluados en lo que tiene que ver a su importancia clínica en las transfusiones por dos motivos principales, primero porque su incidencia poblacional es menor y segundo porque no hay suero anti-DEA 1.3 disponible para su estudio.

Fenotipo	Posibles Genotipos
1.1	1.1/1.1, 1.1/1.2, 1.1/1.3, 1.1/--
1.2	1.2/1.2, 1.2/1.3, 1.2/--
1.3	1.3/1.3, 1.3/--
Negativo	--/--

Cuadro N° 2. Correlación entre el genotipo y los posibles fenotipos del sistema DEA 1. (Hale, AS. 1995. The Veterinary clinics of North America.)

4.1.2. Sistema DEA 7

A diferencia de lo que ocurre con el sistema DEA 1, el sistema DEA 7 solo tendrá dos variables fenotípicas (positivos o negativos). Este antígeno eritrocitario es el más controversial de los antígenos en discusión debido a que no es un antígeno como el resto, sino que ciertos perros tienen la capacidad de incorporarlo a sus membranas y expresarlo como grupo. Reportes publicados mencionaron la presencia de anticuerpos naturales en aproximadamente un 50% de los perros DEA 7 negativos. (8, 14). Aunque reportes más recientes realizados por Giger et al. 1995 sugieren una ocurrencia de anti-DEA 7 naturales más baja de entre un 20%-50% (7, 12, 14). Sin embargo, estos Ac naturales son bastante débiles y raramente producen títulos mayores a 1:8. A diferencia de lo que ocurre en el perro, en el gato y en el hombre la presencia de estos anticuerpos naturales sí puede producir reacciones transfusionales inmunomediadas durante la primera transfusión. Estos Ac naturales son básicamente inmunoglobulinas M (IgM) y son capaces de producir títulos mayores de 1:8 en estas especies. Perros DEA 7 negativos sensibilizados, cuando son transfundidos con eritrocitos DEA 7 positivos, mostrarán una reacción transfusional demorada. Por lo general la hemólisis intravascular brusca no se presenta, sin embargo, ocurre un secuestro y pérdida irreversible de los glóbulos rojos en 72 horas (14).

4.1.3. Sistema DEA 3

Este antígeno no ha sido considerado estadísticamente significativo, debido a su baja incidencia en la población canina (14). Sin embargo, recientes investigaciones de tipificación sanguínea han establecido una mayor importancia. Solamente el 6% de la población canina general de USA tienen eritrocitos DEA 3 positivos (4). Un 23% de los Greyhounds (galgos) tipificados en un laboratorio de USA tenían células DEA 3 positivas. Se encontraron un 20% de anticuerpos naturales en los DEA 3 negativos de Estados Unidos (14). Swisher et al. 1962 reportaron el secuestro y la destrucción de los eritrocitos DEA 3 positivos en perros sensibilizados dentro de los primeros 5 días post transfusión (35). Este tipo de reacción demorada solamente es de significación clínica si el paciente tiene comprometida su capacidad regenerativa. Esta información sugiere entonces que los perros DEA 3 positivos deben ser evitados como posibles donantes por la misma razón que los perros DEA 7 positivos (14).

4.1.4. Sistema DEA 4

El antígeno DEA 4 es el de mayor incidencia en la población canina (7, 14, 34,). Más del 98% de los perros tienen este antígeno. Por esta razón los perros que son DEA 4 positivos y que son negativos para el resto de los grupos pueden ser considerados como donantes universales.

No se producen Ac naturales contra el DEA 4. Los perros sensibilizados no muestran pérdidas ni hemólisis cuando son transfundidos nuevamente con sangre DEA 4 positiva. Los anticuerpos producidos a través de las exposiciones son considerados benignos (14, 34). Pocos casos fueron utilizados para generar esta

información, estudios adicionales serán necesarios para acercarnos más a la realidad. La incidencia de DEA 4 negativos es más alta en ciertas poblaciones controladas, cerradas o con cierto grado de consanguinidad. Estudios realizados a un grupo de Doberman de la costa este de Estados Unidos demostraron una incidencia de un 25% de perros DEA 4 negativos (14,40).

4.1.5. Sistema DEA 5

Como con los perros DEA 3, el significado de la reacción Ag-Ac producida por este grupo no ha sido tomada en consideración por la baja incidencia de este Ag en la población canina (14). Recientes evaluaciones de los grupos sanguíneos realizadas por criadores en el laboratorio de Anne Hale, sugieren que la incidencia del grupo DEA 5 en la población de galgos (greyhounds) americanos es de un 30%, 7% más que la encontrada en la población canina en general (14). Anticuerpos naturales han sido encontrados en un 10% de los perros DEA 5 negativos en los Estados Unidos (34). Swisher et al. 1962 reportó un secuestro y pérdida permanente de glóbulos rojos DEA 5 positivos dentro de los 3 primeros días post transfusión, en perros DEA 5 negativos previamente sensibilizados (29, 35). Esto demuestra que se produce una reacción demorada transfusional similar a la que ocurre en los perros DEA 7 y DEA 3 previamente sensibilizados. Por lo tanto perros DEA 5 positivos no se recomiendan como donantes por las mismas razones que los DEA 3 y DEA 7 (14).

4.1.6. Otros sistemas de antígenos eritrocitarios

La estandarización internacional incluye dos sistemas antigénicos adicionales, el DEA 6 y el DEA 8. La información recabada sugiere una incidencia alta del Ag DEA 6 en la población canina mundial (14). En lo que se refiere al DEA 8 este fue encontrado en el 40% de los perros evaluados en 1962 (35). Estos dos sistemas no parecen tener una importancia clínica significativa en lo que a transfusiones respecta. Otros once sistemas antigénicos diferentes han sido descritos en el perro (12, 33, 36). Desafortunadamente todavía no ha sido evaluada la importancia clínica de estos antígenos en las transfusiones de sangre, aunque parecieran tener poca importancia. Además no existen antisueros para estos antígenos por lo que no se pueden realizar estudios comparativos por el momento.

4.2 PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD SANGUINEA

La mayoría de las técnicas empleadas para detectar las reacciones entre eritrocitos-anticuerpos, se basan en la aglutinación y en ocasiones, la lisis de los glóbulos rojos (hemólisis).

La aglutinación resulta de la unión de los Acs al Ag de superficie de los eritrocitos, formando una red o trama que mantiene unidas a las células. Este proceso se

produce debido a que los anticuerpos establecen uniones cruzadas con los antígenos eritrocitarios y ello hace que se agrupen los eritrocitos o que se aglutinen. Normalmente, las suspensiones de células son estables, y los eritrocitos no tienden a aglutinarse debido a que poseen cargas negativas en su superficie y por lo tanto tienden a repelerse (potencial Z). Las inmunoglobulinas cuando cubren a los eritrocitos neutralizan este potencial zeta y, en consecuencia, los eritrocitos se aproximan unos a otros y favorecen la aglutinación. (28)

Existen diferencias entre los anticuerpos en lo que hace a la capacidad de promover aglutinación. Los anticuerpos IgM son aglutinadores considerablemente más eficientes que los IgG,. Esto se debe al mayor número de sitios de unión al antígeno de las IgM, que le permiten aglutinar glóbulos rojos de manera directa. Las IgG son más pequeñas y tienden a no aglutinar los glóbulos rojos en forma directa; solo los recubren y sensibilizan. Con el agregado de antiinmunoglobulina canina podemos evidenciar si los eritrocitos están recubiertos por anticuerpos visualizando una aglutinación este procedimiento se denomina Test de Coombs el cual desarrollaremos mas adelante.

Las pruebas de hemólisis se basan en revelar la reacción antígeno- eritrocitario-anticuerpo mediante el agregado de proteínas del sistema complemento. Este último frente a la presencia de una IgM o dos IgG unidas a un antígeno activará una cascada de proteínas que culminará con la formación de poros en la membrana celular y la consiguiente entrada de agua y solutos al interior de la célula, lo que provocará la lisis de esta última (lisis osmótica). La salida del contenido eritrocitario, provocará la liberación de hemoglobina coloreando al medio de un tinte rosa y poniendo en evidencia la reacción Ag-Ac. (2)

Para ajustar los protocolos de las técnicas debemos considerar que existen determinados factores que afectan las reacciones antígeno-anticuerpo tanto *in vivo* como *in vitro*. Dentro de estos factores se encuentran la carga iónica eritrocitaria, la temperatura, el pH, la antigüedad del suero y de los eritrocitos y la proporción entre los anticuerpos y los antígenos. Estos factores deben de ser considerados a la hora de realizar pruebas de tipificación para evitar errores de interpretación. La proporción Ag y Ac es muy importante ya que una muestra con una concentración elevada de eritrocitos podría enmascarar la presencia de anticuerpos débiles debido al factor dilución (efecto prozona), y, es por esto, que utilizamos siempre suspensiones eritrocitarias del 2 a 4 % para detectar la presencia de anticuerpos. En lo que refiere a la potencia iónica, la podemos reducir con el agregado de una solución salina con baja fuerza iónica como la solución de LISS, y así poder acelerar la reacción de antiglobulina o test de Coombs acortando el periodo de incubación a tan solo 15 minutos (2, 28).

El pH óptimo para la reacción Ag-Ac está entre 6,5 y 7,5 y la temperatura ideal va a depender del tipo de inmunoglobulina que esté actuando. Nosotros utilizaremos una temperatura de 37° C que es la temperatura corporal (28).

En la práctica médica se utilizan tres procedimientos para determinar compatibilidad sanguínea entre un donante y un receptor. En primer lugar se debe tipificar la sangre del donante y del paciente. Para ello se utilizan pruebas de aglutinación con antisueros comerciales. Segundo debemos realizar las pruebas de compatibilidad

mayor y menor (crossmatching). El crossmatching es una prueba de hemoaglutinación que testea el efecto que provocan los anticuerpos del suero del paciente a los glóbulos rojos del donante (prueba mayor) y el efecto que el suero del donante provoca sobre los eritrocitos del paciente (prueba menor). Como el objetivo principal de la transfusión es proveerle al paciente la cantidad justa de eritrocitos que necesita, es importante que el suero del paciente no destruya los eritrocitos suministrados por el donante (prueba mayor). La prueba menor tiene menos trascendencia dado que el suero proveniente del donante y sus posibles Ac se diluirán en la volemia del paciente y los posibles mecanismos hemolíticos no serán significativos (28).

Por último y como complemento a las pruebas de tipificación y de compatibilidad mayor y menor, se realizará el Test de Coombs. Es una prueba de aglutinación que permite revelar la presencia de Ac no aglutinantes en la superficie de los eritrocitos del donante y receptor. Para ello, se incuban los eritrocitos de los pacientes con una antiglobulina canina. La presencia de Ac en la superficie de los eritrocitos llevará a la unión Ig- anti Ig y la consiguiente aglutinación (2, 28).

4.3 TRANSFUSIONES COMO HERRAMIENTA EN LA CLINICA VETERINARIA

4.3.1. Donantes de sangre

La sangre puede ser recolectada de la vena yugular o de la arteria femoral, siendo la vena yugular la recomendada debido a su fácil acceso y a una menor incidencia de formación de hematomas. La sangre debe ser obtenida de forma aséptica y debe ser conservada correctamente de manera de evitar la proliferación bacteriana.

La colección de grandes volúmenes de sangre de un animal donante puede resultar en una hipovolemia inmediata o en una anemia en pocas horas posteriores a la recolección. Estos efectos adversos pueden ser fácilmente evitados teniendo en cuenta el volumen y el hematocrito del donante. Los perros pueden llegar a donar hasta el 10% total de su volumen sanguíneo sin efectos adversos (30). Cuando se necesitan realizar extracciones mayores al 10% del volumen sanguíneo está recomendado suministrar fluido terapia intravenosa al donante para evitar la hipovolemia. Extracciones del 20% del volumen sanguíneo no debería resultar en una anemia clínicamente significativa pero puede causar una hipovolemia en un corto período de tiempo. Extracciones mayores del 20% pueden producir una hipovolemia lo suficientemente significativa como para comprometer la salud del donante por lo tanto estaría contraindicado (30).

Para ser un buen donante habitual, un perro debe ser grande, mayor de 27 Kg. Peso Vivo (PV), estar sano, vacunado, desparasitado y poseer un hematocrito superior al 40% (30). En general un donante canino puede donar 450 ml o 16 ml/kg PV de sangre cada 3 semanas sin efectos adversos y sin la necesidad de suplementación nutricional (30). Por ejemplo, el volumen sanguíneo total de los perros es aproximadamente de 90 ml por kg de peso vivo, por lo tanto un perro de 30 kg de peso vivo podría donar hasta 500 ml de sangre (30). Se recomienda suplementar a

los donantes con hierro vía oral, 0,5 mg/ml de sangre donada, si la frecuencia y el volumen de extracción aumentara (30).

La sangre entera y/o plasma de animales que hayan recibido sangre en alguna transfusión previa o que hayan gestado alguna vez, no deberían ser tenidos en cuenta como donantes, debido a la posible exposición a antígenos eritrocitarios extraños y a la subsecuente formación de anticuerpos. Cualquier buen donante debe estar libre de infecciones y parasitismos transmitidos por vía hemática. La sangre se debe obtener sobre combinaciones de anticoagulantes y conservantes. El uso de bolsas con citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA) permite la conservación de la sangre alrededor de 35 días a 4°C, con el agregado de Manitol al CPDA se puede conservar hasta 42 días a 4°C. El citrato actúa de anticoagulante, siendo usado porque se metaboliza en el hígado del receptor, mientras que si se usan otros anticoagulantes que no son metabolizados, como la heparina, se puede crear un estado de hipocoagulabilidad con la aparición de hemorragias.

4.3.2. Hemocomponentes

De forma ideal siempre se debería realizar una terapia específica con aquellos componentes sanguíneos, celulares y plasmáticos que requiere el paciente, evitando la administración de fracciones proteicas y celulares innecesarias. Esto es verdad en perros, ya que en gatos los bajos volúmenes transfusionales utilizados limitan el uso de componentes sanguíneos. Luego de que la sangre ha sido colectada y combinada con la solución anticoagulante y preservante, es separada mediante centrifugación en los distintos hemocomponentes. Aparte de la sangre completa, los principales componentes sanguíneos son el concentrado de eritrocitos, plasma fresco congelado, plasma congelado, plasma rico en plaquetas y el crioprecipitado (1, 30).

4.3.2.1. Sangre entera

La sangre entera almacenada proporciona eritrocitos para el incremento del transporte de oxígeno a los tejidos, proteínas plasmáticas para la expansión del volumen oncótico, y los factores estables de la coagulación incluyendo fibrinógeno, pero no proporciona plaquetas o factores lábiles de la coagulación (V y VIII) (1, 30).

Si la sangre entera es fresca y es colectada inmediatamente antes de realizar la transfusión, suministra plaquetas viables y todos los factores de la coagulación, incluyendo eritrocitos y proteínas plasmáticas (1,30).

4.3.2.2. Concentrado de eritrocitos

Es obtenido por centrifugación o sedimentación por gravedad de la sangre entera y posterior desplasmalización. Tiene menos electrolitos, menos anticoagulante y menos volumen que una cantidad equivalente de sangre entera. El hematocrito de los concentrados eritrocitarios varía de 50 % a 80 % dependiendo del grado de la desplasmalización (1, 30).

4.3.2.3. Plasma rico en plaquetas

Proporciona plaquetas viables por 5 a 7 días a temperatura ambiente y agitación constante, que se obtienen a partir de la centrifugación diferencial de la sangre entera fresca (1, 30).

4.3.2.4. Plasma fresco congelado

Es el plasma obtenido por centrifugación de sangre entera que se congela en un período de tiempo que no supere las 6 horas pos extracción. Este posee una viabilidad de hasta un año a -30°C . El congelado protege los factores V y VIII y es una fuente de todos los componentes de la coagulación, factores del complemento y del sistema fibrinolítico así como también de proteínas que mantienen la presión oncótica y modulan la inmunidad. Las grasas, carbohidratos y minerales se encuentran presente en concentraciones similares al plasma en la circulación (1, 30).

4.3.2.5. Plasma Congelado

Es el plasma congelado después de las 6 horas de extraída la sangre. Contiene una mínima cantidad de los factores lábiles de la coagulación V y VIII, pero contiene adecuadas concentraciones de los factores dependientes de la vitamina K (II, VII, IX y X). Este, al igual que el plasma fresco congelado, posee una viabilidad de hasta un año a -30°C (1, 30).

4.3.2.6. Crioprecipitado

Es el precipitado obtenido de la descongelación parcial del plasma fresco congelado. Contiene una concentración mucho más alta del factor VIII, Von Willebrand y fibrinógeno por mililitro de plasma comparado con el plasma fresco congelado. También contiene los factores IX, XI y XIII (1, 30).

4.3.3. Uso terapéutico de los hemoderivados.

El *concentrado de eritrocitos* se usa en procesos anémicos normovolémicos, como son el sangrado agudo, la anemia hemolítica y la hipoplásica, evitando reacciones transfusionales, como la sobrecarga de fluidos y las reacciones febriles no hemolíticas frente a otros componentes celulares. (1,21, 23)

El *plasma fresco congelado* mantiene factores lábiles y estables de la coagulación, utilizándose en deficiencias de estos factores e hipoproteinemias agudas reversibles. Más detalladamente se usa en intoxicación por antagonistas de la vitamina K, hasta que la administración de esta última haga efecto, 8-12 horas, si la situación clínica lo requiere. Igualmente, se usa en coagulación intravascular diseminada, en la hemofilia B y, alternativamente al crioprecipitado, en la enfermedad de Von Willebrand. Usualmente se administra a razón de 10 ml/kg PV inicialmente, pudiendo repetir la dosis varias veces según se requiera en cada caso. La transfusión de plasma en hipoproteinemias ofrece un beneficio limitado debido a que un 60% de la

albúmina está presente en el espacio extravascular y sólo un 40% en el intravascular. Además en estos procesos con pérdida proteica, generalmente la albúmina infundida también se pierde muy rápidamente (1, 21, 23).

El *plasma rico en plaquetas* se usa en trombocitopatías y trombocitopenias, en este último caso cuando los valores bajan de 20.000/ μ l, principalmente las debidas a quimioterapia o las de naturaleza inmunes de tipo agudo. Se debe tener presente que el número de plaquetas por unidad de transfusión es muy bajo y que su vida media es muy corta, por lo que sólo se transfunde cuando los valores plaquetarios del paciente están provocando hemorragias (1, 21, 23).

El crioprecipitado se usa en casos de coagulopatias asociadas con pérdidas agudas por enfermedad congénita (Von Willebrand, hemofilia A), adquiridas (CID, o en casos de cirugías con pacientes con coagulopatias) (1, 21, 23).

4.3.4. Indicaciones para realizar transfusiones.

En el caso de transfusiones con concentrado eritrocitario, no existe una guía estricta de recomendación en dependencia del hematocrito. Usualmente se realiza en anemias con hematocrito menores del 20% en el perro. En procesos hemorrágicos agudos se realiza con hematocrito mayores ya que éste parámetro tarda en reflejar adecuadamente la severidad de la anemia. En el caso de anemias hemolíticas auto inmunes, sólo se debe hacer una transfusión cuando clínicamente es imprescindible, ya que si la transfusión es incompatible son mayores los inconvenientes por el aumento de los productos de degradación globular (1, 21).

En general se indica en anemias agudas y crónicas, trombocitopenias, problemas de coagulación, reanimación de choque hipovolémico hemorrágico, nefropatías (por ej. anemia por fallo renal crónico, síndrome nefrótico con hipoproteinemia), hepatopatías, y déficit inmune (por ej. en parvo virosis, que cursa con deshidratación y anemia, aportando además inmunidad pasiva) (1, 21).

La cantidad de sangre a transfundir, de modo general, son 500 ml a perros medianos. Se considera que 10-20 ml/Kg peso vivo (PV) son necesarios para mejorar el transporte del oxígeno, por lo que estos volúmenes son los que se usan como norma en la mayor parte de los casos y especies animales. En su defecto, para calcular el volumen a transfundir (ml) se puede utilizar la siguiente fórmula:

$$PV (kg) \times VS \times (\text{incremento del Hto deseado} \div \text{Hto donante})$$

o, alternativamente,

$$PV (kg) \times VS \times (\text{incremento de la [Hb] deseada} + [\text{Hb}] \text{ donante})$$

Donde VS es el volumen sanguíneo (ml/kg PV), 70 en gato y 90 en perro; Hto, el valor hematocrito; y [Hb] la concentración de hemoglobina (21).

4.3.5. Realización de la transfusión

Habitualmente la sangre se transfunde vía endovenosa o intraósea, siendo posible ocasionalmente usar la vía intraperitoneal, pasando en este caso a la circulación sistémica el 50% de los eritrocitos en 24 horas y alrededor del 70% a las 72 horas.

La transfusión, aunque sea entre grupos sanguíneos compatibles, se realiza lentamente al inicio, 10-25 ml en 15 minutos para un perro, observando la aparición de posibles reacciones como ser urticaria, fiebre, vómitos o anafilaxia. La utilización de esta técnica no vale para comprobar la compatibilidad de la transfusión, sino sólo es una medida más de precaución para evitar la aparición de reacciones más intensas. Posteriormente si no se producen reacciones, la velocidad adecuada es de 10-20 ml/kg PV a la hora en individuos normovolémicos, incrementando a 20-60 ml/kg PV a la hora en pacientes hipovolémicos, no debiendo superar la transfusión las 4 horas de duración. Si existe alteración cardiaca es prudente disminuir a 5 ml/kg PV a la hora (21).

La sangre se debe administrar a través de un filtro de 170 μm a fin de evitar el paso de microcoágulos. Utilizando un sistema de doble vía en forma de Y, se introduce por una vía la sangre y por la otra una solución isotónica salina para disminuir la viscosidad de la sangre, no debiendo usar Ringer lactato ya que el calcio que contiene favorece la activación de la coagulación, ni soluciones hipotónicas ya que provocan hemólisis. La sangre se debe infundir calentada al baño maría a 37°C, no superando los 40°C, ya que se pueden inactivar factores, además de provocar hemólisis y aglutinación (21).

4.3.6. Autotransfusión

La realización de una transfusión de sangre autóloga evita los riesgos inmunológicos e infecciosos de las transfusiones. La autotransfusión se puede realizar en circunstancia preoperatoria o recogiendo la sangre presente en las grandes cavidades, pleural y peritoneal, y reinfundiéndola, obviamente a través de un filtro. Esta técnica sólo se debe realizar cuando el estado clínico del paciente sugiera que la transfusión es imprescindible. Esta está contraindicada en aquellos pacientes que posean septicemia o neoplasia (21).

Más práctica es la autotransfusión preoperatoria, pudiendo recoger del paciente hasta 20 ml/kg PV semanalmente, durante 2-3 semanas, refrigerándola a 4°C hasta el momento de la operación quirúrgica. A estos individuos es recomendable suplementarles con hierro vía oral, durante este tiempo.

4.4. PATOLOGÍAS TRANSFUSIONALES.

Se denomina accidentes transfusionales a cualquier efecto indeseable que afecta al receptor durante o tras la transfusión de sangre entera o de sus componentes. Estas reacciones transfusionales son categorizadas típicamente como inmunomediadas y

no inmunomediadas y subdivididas a su vez en agudas o demoradas según su naturaleza (6, 15, 17, 19, 10, 34, 35).

Una reacción transfusional aguda puede ser notada en minutos u horas de haber comenzado con la transfusión (13, 14, 35), mientras que, una reacción demorada puede ocurrir en días, semanas, meses o años después de realizada la transfusión. (14, 18, 35). La gravedad de las reacciones varían desde leves (fiebre) a severas (muerte).

4.4.1. Reacciones Inmunomediadas

Las reacciones hemolíticas mediadas por anticuerpos son clasificadas como reacciones de hipersensibilidad tipo II y de acuerdo a su naturaleza en demoradas o agudas.

La hemólisis inmunológica extravascular es la más frecuente, siendo de aparición demorada, disminuyendo el número de eritrocitos viables y el beneficio de la transfusión, cursando a veces con fiebre, anorexia e ictericia (16,34). La hemólisis inmunológica intravascular es inmediata provocando hemoglobinemia, hemoglobinuria y liberación de sustancias tromboplásticas que pueden inducir la aparición de coagulación intravascular diseminada, debiéndose detener inmediatamente la transfusión y tratar el choque. Este choque anafiláctico cursa con fiebre, vómitos, convulsiones, taquicardia o bradicardia, hipotensión, cianosis, disnea, salivación excesiva, lagrimeo, incontinencia urinaria y fecal, vasoconstricción, isquemia renal, opistotonos, postración, colapso y, a veces la muerte. La severidad de los signos va a depender de los volúmenes a administrar de esa sangre incompatible. Generalmente en el perro este tipo de reacciones no tienen un desenlace fatal desapareciendo los signos en 12-24 horas. Habitualmente aparece en perros DEA 1 negativos que reciben sangre DEA 1 positiva, aunque nunca en la primera transfusión (14, 17).

El exantema cutáneo o urticaria es una reacción aguda frecuente, pero rara vez con peligro de vida del paciente, causado por sangre mal conservada o elevado volumen transfundido; puede deberse a la presencia de factores plasmáticos que activan el sistema de quininas con liberación de aminas vasoactivas, que suele tratarse satisfactoriamente con corticoides o regresando espontáneamente (17).

La fiebre inmunológica no hemolítica (5%) se debe a la presencia de anticuerpos anti-leucocitos o anti-plaquetas del paciente. En su presencia se debe disminuir la velocidad de transfusión y administrar antipiréticos y/o antihistamínicos (17).

El púrpura postransfusional ha sido reportado en perros y se caracteriza por la aparición de una severa trombocitopenia en la semana siguiente a una segunda transfusión (17, 26). El púrpura postransfusional es causado por la producción de Ac por parte del paciente contra las plaquetas del donante que generalmente se resuelve espontáneamente dentro de unas 6 semanas posterior al episodio trombocitopenico (17, 38).

Otra reacción inmunomediada demorada es la que se produce en las hembras sensibilizadas a eritrocitos ajenos no sólo por transfusiones de sangre incompatible administradas con fines clínicos, si no también por fuga de eritrocitos fetales hacia la corriente sanguínea materna a través de la placenta durante la preñez. En hembras sensibilizadas, estos anticuerpos antieritocitarios se concentran en el calostro. Cuando el recién nacido mama, absorbe estos anticuerpos del calostro a través de la pared intestinal, los cuales llegan así a la circulación general. Estos anticuerpos, dirigidos contra los antígenos de grupo sanguíneo del neonato, producen una rápida destrucción de sus eritrocitos. La enfermedad que resulta ocurre en muchas especies domesticas; se denomina enfermedad hemolítica del recién nacido (hemolytic disease of the new born, HDN) o isoeritrolisis neonatal (37).

Deben cumplirse cuatro condiciones para que ocurra HDN. La cría debe heredar de su padre un antígeno eritrocitario que no exista en la madre. Es preciso que la madre sea sensibilizada contra este antígeno eritrocitario. La respuesta materna a este antígeno puede reforzarse por hemorragia transplacentaria al final del la preñez. Por último, es necesario que el neonato ingiera calostro que contenga títulos altos de anticuerpos contra sus eritrocitos (37).

4.4.2. Reacciones no inmunomediadas

La hemólisis no inmunológica se debe a la transfusión de eritrocitos alterados por mal manejo, eritrocitos viejos, contaminación de los productos sanguíneos o administración inapropiada ya sea por una presión excesiva o por perfusión excesiva de solutos, provocando hemólisis de baja intensidad o asintomática (17).

El choque hipervolémico se produce cuando grandes volúmenes de sangre son administrados de forma rápida a un paciente normovolémico siendo aquellos pacientes que sufren de insuficiencia cardíaca más propensos a desarrollar una hipervolemia, apareciendo vómitos, taquicardia, disnea, turgencia venosa, cianosis, tos, etc., debiendo disminuir la velocidad de la transfusión y suministrar diuréticos. Esta reacción es una de las más comunes dentro de las patologías transfusionales en pequeños animales (17).

Las reacciones tóxicas debidas al citrato son causadas por transfusiones muy rápidas, masivas o por insuficiencia hepática, siendo una sobrecarga de citrato la que provoca una disminución del calcio iónico plasmático, cursando con tetania, temblores o convulsiones. Una vez que se presentan estos signos, se debe interrumpir la transfusión y volver a empezar más lentamente y, si recurre, se puede inyectar gluconato cálcico (17).

La embolia pulmonar, que es otra de las reacciones no inmunomediadas, puede aparecer por agregados de leucocitos, plaquetas y fibrina que empiezan a ser importantes a las 8-10 horas de su obtención, evitándose con la utilización de filtros (17).

Finalmente dentro de las reacciones no inmunomediadas agudas podemos encontrar el choque endotóxico que es producido por la transfusión de sangre

contaminada por gérmenes. Otras reacciones pueden ser hipotermia, embolismo aéreo, hiperamonemia y acidosis (17).

Dentro de las reacciones tardías o demoradas no inmunomediadas encontramos la transmisión de enfermedades infecto contagiosas y hemosisderosis (16, 17, 26).

El uso de la medicina transfusional se ha convertido en algo de lo más común en la medicina veterinaria de la última década, pero poca información esta disponible sobre los efectos clínicos adversos de las transfusiones. La incidencia y el significado clínico de las reacciones transfusionales en perros son poco conocidas, existiendo pocas publicaciones sobre este tema.

Un estudio sobre 131 transfusiones realizadas en Estados Unidos reveló que solo en 10 perros (13%) se produjo algún tipo de reacción. Los 10 perros sobrevivieron (17, 34). Un segundo estudio sobre transfusiones caninas realizado en el Hospital de la Universidad de Veterinaria de Minnessota mostró una prevalencia de las reacciones transfusionales del orden del 2,9% (20 reacciones de 680 transfusiones realizadas) (17, 34). De estas reacciones, 85% (17 de las 20) fueron reacciones agudas de hipersensibilidad, el 10% (2 de las 20) fueron reacciones hemolíticas demoradas, y solo el 5% (1 de las 20) fue una reacción hemolítica aguda (17, 34). Ninguna reacción de origen no inmunológico fue descrita en este trabajo.

La mayoría de estas reacciones fueron consideradas como leves que cursaron con vómitos (ocho), pirexia (seis), hinchazón facial (cinco), siendo estos los signos clínicos más comunes (17, 34). Dos de las reacciones fueron consideradas severas y consistieron en una reacción hemolítica aguda, edema pulmonar, y pirexia (17, 34). Estas reacciones severas respondieron bien a la terapia de soporte, la cual consistió en la interrupción inmediata de la transfusión, diphenhydramine, furosemide, dexametasona, aminophyline y oxigenoterapia. En este estudio no ocurrieron muertes directas como resultado de una reacción transfusional adversa.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Incorporar en la clínica de pequeños animales las herramientas que permitan realizar transfusiones sanguíneas en forma segura, evitando la aparición de patologías transfusionales. Para ello se buscará poner a punto pruebas de compatibilidad y de tipificación de grupos sanguíneos en perros.

5.2. PARTICULARES

- a. Entrenamiento de técnicas de compatibilidad y tipificación sanguínea en humanos. Dado que esta tecnología es ampliamente utilizada en medicina humana se buscará entrenar a los investigadores en las técnicas mas

comúnmente utilizadas, con el fin de extrapolar los conocimientos a la medicina veterinaria.

- b. Diseño e implementación de técnicas de compatibilidad y tipificación de grupos sanguíneos en pequeños animales. Dada la ausencia de reactivos en nuestro país que permitan cumplir con este objetivo, se buscara diseñar reactivos útiles para la compatibilidad y tipificación en perros y se evaluará su uso en la clínica veterinaria.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. PRUEBAS DE TIPIFICACIÓN Y COMPATIBILIDAD CON REACTIVOS DE USO HUMANO.

6.1.1 Tipificación de grupos sanguíneos de los integrantes del grupo de tesis.

Para la tipificación de grupos sanguíneos del sistema ABO y Rh, usamos el kit Span Diagnostics Ltd. (Distribuido por Laboratorio Celcius). Este contiene sueros hiperinmunes obtenidos en conejo anti- grupo A, anti- grupo B, anti- grupos AB y anti- grupo D (RH). (Figura N° 1, A)

Brevemente, mediante la punción del dedo índice del paciente, se obtienen 4 gotas de sangre que se colocan sobre un portaobjetos. A cada una de las alícuotas se le agregan una gota de los antisueros específicos, se mezcla por rotación y al cabo de un minuto se lee la prueba (28). (Figura N° 1, B)

6.1.2. Prueba de compatibilidad y Test de Coombs entre los integrantes del grupo de tesis.

Para llevar a cabo la prueba de compatibilidad sanguínea entre los integrantes del grupo de tesis, se enfrentaron los eritrocitos del grupo A con suero del grupo B (contiene Ac anti A) y eritrocitos del grupo A con suero del grupo A (contiene Ac anti B). Para ello mezclamos en tubos 50 µl de sangre tipo A, 150 µl de suero de tipo B (anti-A), 100 µl de una solución de glicina 0,24 M y cloruro de sodio 0,03 M en un buffer de fosfatos a pH 6,7 (reactivo de Liss) e incubamos 15 minutos a 37°C. Luego centrifugamos a 1000 g por 1 minuto y observamos si hubo hemólisis o aglutinación. Si la reacción es negativa volcamos el sobrenadante y resuspendemos en solución fisiológica. Este procedimiento lo repetimos 3 veces. Al botón de GR final le agregamos 50 µl de antinmuglobulina humana mezclamos y centrifugamos por 25 segundos y leímos (28).

6.2 DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA ANALIZAR COMPATIBILIDAD EN PERROS

6.2.1. Desarrollo y estandarización del suero anti-glóbulos rojos de oveja.

A los efectos de poder controlar el funcionamiento de los reactivos fue necesario desarrollar y estandarizar un suero anti GR de oveja producido en perro.

A partir de ovinos del Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UdelaR) se preparó un concentrado de eritrocitos, basado en la extracción de sangre con citrato de Na y posterior lavado de los mismos. El lavado de los glóbulos se realizó centrifugando la sangre por 15 min. a 1000 g, descartando el sobrenadante. Luego se agregó una solución de suero fisiológico y se centrifugó nuevamente, este procedimiento se repitió por tres veces consecutivas (11, 28). (Figura N° 2, a y b)

Un canino cruce hembra de 7 años de edad perteneciente al Campo Experimental del Instituto de Higiene, fue inoculado con 2 cm del concentrado eritrocitario los días 0, 15, 30 y 45 (Figura N° 2, c). Se le extrajo sangre los días 0, 30 y 45 y se evaluó el título por hemoaglutinación. Utilizando como control negativo la extracción del día 0. Parte del suero obtenido fue descomplementado incubando el suero a 56°C por una hora. (28)

Para titular los anticuerpos, colocamos 0,25 ml de una suspensión al 3% de glóbulos rojos de oveja con 0,75 ml del suero de la perra puro y diluidos 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 (relación 3:1). Mezclamos e incubamos a 37°C durante 60 minutos. Centrifugamos a 1350 rpm por 1 min. y observamos en busca de hemólisis y/o aglutinación (11, 28).

6.2.2. Estandarización de la anti IgG canina producida en conejo para el test de Coombs.

Se utilizó una anti IgG canina producida en conejo (Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química, UdeLaR). Para la producción de eritrocitos sensibilizados, se incubó una relación 1:3 de GR de oveja al 3% con suero descomplementado anti GR ovino diluido 1/16 por 1 hora a 37°C. Los glóbulos rojos sensibilizados fueron centrifugados y lavados con una solución de suero fisiológico (28).

Para estandarizar la concentración de anti IgG canina le agregamos a los eritrocitos sensibilizados 0.5 ml de esta, en tres presentaciones (pura, 1/5 y 1/10). Leemos en busca de signos de aglutinación.

6.3 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD

6.3.1. Perros donantes y receptores

Se seleccionaron un total de 17 animales elegidos al azar, provenientes de distintas clínicas veterinarias de Montevideo, para realizar pruebas de compatibilidad. De estos se extrajeron 15 ml de sangre de la vena cefálica con aguja 21G, 5 ml se colocaron en un tubo con anticoagulante (EDTA) y los 10 ml restantes se colocaron en un tubo seco para la obtención de suero. Cada tubo rotulado con nombre del paciente, fecha y acompañado de su correspondiente historia clínica.

6.3.2. Preparación de GR de donantes.

Glóbulos rojos de 14 perros potencialmente donantes fueron preparados para el ensayo. La sangre de los donantes fue centrifugada y lavada 3 veces con solución salina isotónica. Luego se preparó una suspensión de glóbulos rojos al 3% (1 volumen de glóbulos rojos sedimentados a 30 volúmenes de solución salina) los cuales van a ser utilizados en los ensayos de compatibilidad (28).

6.3.3. Crossmatching y Test de Coombs.

Se realizaron al azar pruebas de compatibilidad entre 14 perros donantes y 12 perros receptores. Para esto incubamos a 37 °C por 60 minutos, 0,25 ml de una suspensión al 3% de glóbulos rojos del donante con 0,75 ml del suero del receptor (relación 3:1). Como control positivo se incubó 0,75 ml de suero anti GR ovinos estandarizado (producido en perro) y 0,25 ml de suspensión al 3% de glóbulos rojos ovinos. Centrifugamos a 1000 g por 1 min. y observamos en busca de hemólisis y/o aglutinación. En su presencia, la sangre es incompatible (11, 28).

Si no se observa hemólisis ni aglutinación, lavamos los glóbulos rojos 4 veces y en el último lavado descartamos el sobrenadante, dejando solo el botón eritrocitario. A este le agregamos 0,5 ml de anti-inmunoglobulina canina estandarizada (reactivo de Coombs). Mezclamos e incubamos 15 min. a 37° C. Centrifugamos a 1000 g durante 20 segundos y observamos en busca de hemólisis y/o aglutinación. En su presencia, la sangre es incompatible (11, 28).

6.4. PRUEBAS DE TIPIFICACIÓN

6.4.1. Tipificación del sistema DEA 1.

Para ello se utilizará un kit comercial Rapidvet – H (Dmslab-NJ) basado en un test de aglutinación en placa. (Figura N° 4, A) Esta prueba está basada en la reacción de aglutinación que se produce cuando los eritrocitos caninos tienen el antígeno DEA 1.1 en la superficie de la membrana eritrocitaria y estos reaccionan con los anticuerpos monoclonales presentes liofilizados en el kit (pocillo test del paciente). (Figura N° 4, C)

El kit cuenta con dos controles:

- a) Control de auto aglutinación; nos permite detectar aquellos perros que pueden exhibir algún grado de auto aglutinación debido a la presencia de factores en su suero. Si la sangre auto aglutina no será posible tipificarlos sin hacerle un lavado previo.
- b) Control Positivo; el pocillo del control positivo posee inmunoglobulinas liofilizadas anti-eritrocitos caninos

Se tipificó la sangre de 5 perros elegidos al azar extraída con EDTA

Para ello, colocamos una gota (40 µl) de una solución de 0.02 mol/L de fosfato bufferado salino (PBS), ph 7,4 en el posillo de auto aglutinación. Luego depositamos una gota de 50 µl de sangre a analizar. Mezclamos por 10 segundos y al minuto leemos. Si en esta no se produce aglutinación seguimos con el análisis.

En cada uno de los otros dos posillos agregamos una gota (40 µl) de PBS y una gota (50µl) de sangre. Mezclamos por 10 segundos y leemos al minuto. (Figura N° 4, B)

En el posillo DEA 1.1 control positivo siempre tenemos que ver una aglutinación. En el posillo del test del paciente si vemos signos de aglutinación es por que es DEA 1.1 positivo de lo contrario es negativo a dicho grupo sanguíneo.

7. RESULTADOS

7.1 PRUEBAS DE TIPIFICACIÓN Y COMPATIBILIDAD CON REACTIVOS DE USO HUMANO.

Las pruebas de tipificación y compatibilidad realizadas en humanos nos permitieron entrenarnos y mejorar la capacidad de identificar los diferentes grados de reacciones positivas en lo que a compatibilidad sanguínea se refiere. Las reacciones positivas consistieron en la formación de grumos (aglutinación), mientras que en las reacciones negativas no se observaron signos apreciables de reacción (Figura N° 1, C, nótese que la reacción de aglutinación N° 2 no se ve claramente).

Al realizar la prueba de compatibilidad vimos que al enfrentar eritrocitos del grupo A con suero del grupo B y eritrocitos del grupo A con suero del grupo A, no se visualizó hemólisis ni aglutinación directa. Luego los eritrocitos fueron sometidos al reactivo de Coombs (anti-IgG humana) para detectar eritrocitos sensibilizados con anticuerpos. La lectura de esta última reacción implicó visualizar el comportamiento del botón que quedó en el fondo del tubo luego del último centrifugado.

Cuando enfrentamos eritrocitos del grupo A con suero del grupo B observamos que este botón se desprendía en forma de "casquete o grumos" quiere decir que la reacción es positiva o sea que la sangre es incompatible. Cuando enfrentamos eritrocitos del grupo A con suero del grupo A, observamos que el botón se desprendía en forma de "velo de novia", esto nos indica que la transfusión se puede realizar de forma segura.

7.2 DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE COMPATIBILIDAD PARA SU USO EN PERROS

7.2.1. Estandarización de suero anti GR de oveja obtenido en perro.

Cuando realizamos las pruebas de hemoaglutinación para titular los anticuerpos, el suero de perro anti-glóbulos rojos de ovinos del día 45, puro y en las diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, reaccionó hemolizando los glóbulos rojos ovinos. Cuando utilizamos dicho suero descomplementado, observamos que el suero puro y las diluciones hasta 1/8 aglutinaron directamente. Desde la dilución 1/16 en adelante no se observó aglutinación

7.2.2. Estandarización de la anti IgG canina obtenida de conejo.

Una vez que determinamos que el suero anti GR ovinos obtenido en perro en la dilución 1/16 no aglutina directamente, observamos que frente al agregado de antiinmunoglobulina canina pura, 1/5 y 1/10 se observó aglutinación.

7.3 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD

En los 12 perros testeados no se observaron reacciones de incompatibilidad, cuando realizamos el crossmatching y el Test de Coombs (Cuadro N° 3). Solamente en el caso de la perra Ila encontramos dudosa la prueba del crossmatching mayor con todos sus posibles donantes. Esta duda surgió a partir de la demora en resuspender el botón, comparado con los demás receptores, luego de cada centrifugado. De todas formas consideramos compatibles todas las pruebas realizadas con dicha perra debido a que en la reacción de Coombs no se produjo aglutinación. (Figura N° 3, a y b). Nuestro control positivo estandarizado aglutinó indirectamente todas las veces. (Cuadro N° 3) (Figura N° 3, d).

7.4 PRUEBAS DE TIPIFICACION

Utilizando el Kit comercial Rapid Vet-H observamos que de los 5 perros testeados 3 perros fueron negativos y 2 positivos para el grupo DEA 1.1. (Figura N° 4, C). En las pruebas ensayadas no observamos fenómenos de auto aglutinación. El cuadro N° 4 esquematiza los resultados obtenidos.

8. DISCUSIÓN

En la clínica veterinaria de pequeños animales de nuestro país, el profesional a diario se enfrenta a la posibilidad de indicar una transfusión sanguínea como parte del tratamiento del paciente. Sin embargo, este procedimiento se realiza solo en situaciones especiales y casi siempre como último recurso debido a los riesgos que conlleva.

Uno de los puntos críticos, es que no hay disponibles en Uruguay, reactivos comerciales para la realización de test de compatibilidad sanguínea y tipificación de grupos sanguíneos en perros.

En el presente trabajo, nuestro desafío fue desarrollar una técnica, con el propósito de diseñar un kit de compatibilidad sanguínea que permita hacer un uso controlado de un protocolo de transfusión en perros.

Básicamente, un kit de compatibilidad debe tener la capacidad de demostrar la presencia de anticuerpos específicos contra glóbulos rojos, al enfrentar los eritrocitos del donante con el suero del paciente. Esos anticuerpos casi nunca son capaces de aglutinar por si mismos los eritrocitos, por lo tanto el kit debe tener la capacidad por aglutinación indirecta de demostrar la presencia de eritrocitos sensibilizados con anticuerpos (Test de Coombs).

Dentro de los puntos críticos en el desarrollo de nuestra técnica, los más importantes estaban en el diseño de los controles positivos y en la puesta punto del Test de Coombs para perros.

En relación al diseño de controles positivos, debido a la dificultad de obtener eritrocitos caninos sensibilizados con anticuerpos, fue necesario simular esta situación a partir de eritrocitos ovinos sensibilizados con anticuerpos caninos.

Nuestra estrategia fue obtener este producto a partir de la inmunización de un perro con eritrocitos ovinos (Figura N° 2). El antisuero obtenido debió ser estandarizado para que sensibilizara los glóbulos rojos ovinos sin aglutinarlos en forma directa. En primera instancia el suero hiperinmune canino, al enfrentar los GR ovinos los hemolizaba (Figura N° 3, f). Esto se debió a que el sistema complemento presente en el suero se activó frente a la presencia de complejos antígeno anticuerpo destruyendo los eritrocitos. Esta reacción desapareció cuando el suero fue calentado a 56° por 1 hora. En segunda instancia, los altos títulos y la alta afinidad de los anticuerpos obtenidos, fueron capaces de aglutinar en forma directa los GR ovinos (Figura N° 3, e), por lo cual fue necesario diluir hasta 1/16 el suero para que los anticuerpos no aglutinaran los eritrocitos pero si los sensibilizaran.

Este proceso de estandarización nos demostró experimentalmente la importancia que tienen las proteínas del complemento como factor de lisis celular, así como la relevancia del título, el isotipo y la afinidad de los anticuerpos para observar fenómenos de aglutinación de células.

La antiinmunoglobulina canina producida en conejo, fue desarrollada en el polo tecnológico de Facultad de Química y debimos ajustarla a nuestro sistema, para que revelara la presencia de anticuerpos sensibilizando los eritrocitos.

Para ello se ensayaron diferentes diluciones en busca de la menor concentración capaz de aglutinar eritrocitos sensibilizados con anticuerpos (Figura N° 3, c y d). En nuestro caso terminamos utilizando para la técnica la dilución 1/10, sin embargo tenemos la certeza que de seguir ensayando diluciones se puede maximizar aun mas su uso.

Finalmente obtuvimos los reactivos ajustados para la realización de test de compatibilidad (Crossmatch y Test de Coombs) en perros con sus controles respectivos, a esta técnica lejos de pretender ser un kit comercial, la denominamos TS8 kit.

Con el TS8 kit, procedimos a realizar las pruebas de compatibilidad mayor y menor y el Test de Coombs entre 17 perros elegidos al azar. En este procedimiento, los controles positivos y negativos se comportaron de acuerdo a lo esperado y las muestras procesadas señalaron que las sangres fueron compatibles, confirmando la baja incidencia de anticuerpos naturales y de perros sensibilizados descritos en la bibliografía internacional (14). Esta situación sería probablemente diferente si estudiáramos perros que hayan sido transfundidos con una sangre incompatible o con perras sensibilizadas durante la gestación (17).

En humanos, esta ampliamente confirmada la presencia de anticuerpos naturales contra los antígenos de grupos sanguíneos diferentes, debido a que los antígenos de grupo comparten epítopes con antígenos del medioambiente (alimentos, polvo, ácaros, etc.). Por esta razón, una primera transfusión con sangre incompatible lleva al desarrollo inmediato de patologías transfusionales (28). Cuando realizamos nuestro entrenamiento en técnicas de uso humano, pudimos confirmar experimentalmente estos conceptos (Figura N° 1). Nótese que en el momento de leer la reacción se percibía una diferencia clara entre aglutinación y falta de la misma, en la foto de la figura -1 no se aprecia claramente dicha diferencia. Por ejemplo en la reacción 1 AB existe aglutinación pero la misma no se observa claramente en la imagen.

En relación a la tipificación de grupo sanguíneo, podemos decir que en perros, el grupo sanguíneo más inmunogénico y clínicamente más importante es el DEA 1.1. Es por esto que los perros DEA 1.1 negativos pueden quedar sensibilizados cuando reciben sangre DEA1.1 positiva y desarrollar reacciones transfusionales hemolíticas agudas cuando son expuestos nuevamente a dicho grupo (14).

En el presente trabajo, utilizando un kit comercial RapidVet- H ®, que determina si el perro es negativo o positivo al grupo DEA 1.1, tipificamos 5 perros dentro de los cuales se encontraban perros de raza y cruza.

Los animales estudiados resultaron ser 2 positivos a DEA1.1 y 3 negativos (Figura N° 4). Si bien este es un bajo número de muestras, marca la alta posibilidad de transfundir sangres de diferentes grupos si no realizamos las pruebas de tipificación previo a la transfusión.

A través de la literatura internacional podemos ver que existen diferencias en la prevalencia del grupo sanguíneo DEA 1.1 en las poblaciones caninas de diferentes regiones del mundo y entre las distintas razas. Ejima et al. (1982) encontraron una mayor incidencia de perros DEA 1 positivos en perros cruce criados en Japón (82%), cuando lo compararon con la incidencia en perros Beagles (55%) (10, 27). Hale 1995, describió una prevalencia en Estados Unidos del 42% de perros cruce DEA

1.1 positivos, mientras que solamente un 20% eran DEA 1.2 positivos (14). Novais A.A. *et al* 1999 encontro una prevalencia general del 91,3% del sistema DEA 1, comprendiendo un 51,3% de los perros DEA 1.1 positivos, y un 40% DEA 1.2 positivos realizado en el Hospital Veterinario de la Universidad Estatal de San Pablo, Brasil (27). Solamente un 8,7% de los perros testeados fueron negativos para el sistema DEA 1 (27). La prevalencia encontrada en este último estudio fue significativamente mayor que en los estudios realizados por otros autores de otras partes del mundo para perros criados en otros países.

En suma el presente trabajo, establece un protocolo que permite realizar transfusiones sanguíneas seguras, y promueve frente a la disponibilidad del reactivo, el uso de las transfusiones en forma más frecuente. En la clínica uno no sabe si debe realizar más de una transfusión a un mismo animal.

En un futuro, nos estamos planteando desarrollar un Kit de tipificación DEA1.1 aquí en Uruguay, para bajar los costos de estas pruebas y poder tipificar un número importante de perros. Esta información puede ser relevante a la hora de conocer incidencias de grupos sanguíneos en las distintas razas de nuestro país. En otro sentido, también sería interesante conocer la frecuencia real de sangres incompatibles frente a una primera transfusión, y establecer la seguridad real de una primera transfusión.

Finalmente el TS8 kit permite diagnosticar enfermedades como la anemia hemolítica autoinmune ya que puede reconocer GR recubiertos por autoanticuerpos.

En definitiva la información generada hasta el momento es el punto de partida de futuros trabajos que permitan brindar servicios de tipificación y compatibilidad sanguínea a las clínicas y veterinarios de todo el país.

9. CONCLUSIÓN

A través de este trabajo, pudimos desarrollar una técnica con el objetivo de obtener un kit (TS8 Kit) para poder realizar las pruebas de compatibilidad mayor y menor y el Test de Coombs, que junto con la tipificación sanguínea nos permitirá poder realizar de forma efectiva y segura una transfusión sanguínea en perros.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. (2001) Aspectos Clínicos en Medicina Transfusional. Manual Técnico. 13ª Edición: 465-570
2. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. (2001) Reacciones antígeno- anticuerpo eritrocitarias y su detección. Manual Técnico. 13ª Edición: 257-275
3. Bithell, TC. (1993) Thrombocytopenia caused by immunologic platelet destruction: idiopathic thrombocytopenia purpura (ITP), drug induced thrombocytopenia and micellaneous forms. En: Lee RG, Bithell TC, Foersten J, Athens JW, Lukens JN, eds. Wintrobe`s Clinical Haematology. 9a. ed. Vol 2 London: Febiger L; p1329-1355.
4. Bull, RW. (1976) Canine Immunohematology. En: Bull, RW. The animal models of thrombosis and hemorrhagic diseases. Washington, Department of Health, Education, and Welfare, P.H.S, NIH; p 76-982.
5. Bull, R.W. (1982) Antigens, graft rejections, and transfusion. Journal of American Veterinary Medicine Association; 181: 1115-1119.
6. Capon, SM; Sacher, RA. (1989) Hemolytic transfusions reactions: A review of mechanism, sequelae, and management. Journal of Intensive Care Medicine; 4: 100.
7. Colling, DT; Saison, R. (1980) Canine blood group: I. Description of new erythrocyte specificities. Animal Genetics; 11:1-12.
8. Colling, DT; Saison, R. (1980) Canine blood group: II. Description of a new allele in the Tr blood group system. Animal Genetics; 11: 13-20.
9. Dudok de wit C; Coenegracht N.A.C.J.; Poll P.H.A.; Linde J.D. (1967). The practical importance of blood group in dogs. Journal of Small Animal. Practice; 8: 285-289.
10. Ejima, H; Kurokawa, K, Ikemoto, S. (1982) DEA 1 blood group system of dogs reared in Japan. Nippon Juigaku Zasshi; 44: 815- 817.
11. Feldman FB; Kristensen, AT. (1995) Modern veterinary blood banking practices and their applications in companion animal practice. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice; 25:1231- 1289.
12. Giger, U; Gelens, C.J.; Callam, M.B.; Oakley, D.A. (1995). An acute haemolytic transfusión reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 Incompatibility in a previously sensitized dog. Journal of American Veterinary Medicine Association; 206: 1358-1362.
13. Greene, RT. (1985) Blood banking and transfusions therapy. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian; 6: 134.
14. Hale, A.S. (1995) Canine blood groups and their importance in veterinary transfusión medicine. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice; 25:1323-1332.
15. Harrell, K; Parrow, J; Kristensen, A. (1997) Reações á Transfusão. Cães & Gatos; 6: 18-28.
16. Harrell, K; Parrow; J; Kristensen, A. (1997) Canine transfusion reactions. Part I. causes and consequence. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian; 19: 181-189.

17. Harrell, CA; Kristensen, AT. (November 1995) Canine transfusions reaction and their management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*; 25: 1333-1361.
18. Hohenhaus, AE. (1994) Transfusions, infusions and other solutions. *Proceedings of the 12th Annual Members Meeting, American College of Veterinary Internal Medicine Forum, San Francisco, USA*; 158 p.
19. Kerl, ME; Hohenhaus, AE, (1993) Packed red cell transfusions in dog: 131 cases (1989). *Journal of American Veterinary Medicine Association*; 202: 1495- 1499 .
20. Killingsworth, CR. 1984. Use of blood and blood components for feline and canine patients. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 185: 1452- 1454.
21. Kirby R. (1995) Transfusion therapy in emergency and critical care medicine. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*; 25:1365-1386.
22. Knottembelt, C. & Mackin, A. (1998) Blood transfusions in the dog and cat Part 1. Blood collection techniques. *In Practice*; 20: 110-115.
23. Kristensen, AT; Feldman FB. (1995) General principles of small animal blood component administration. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*; 25:1277- 1289.
24. Lanevski, A. & Wardrop, K.J. (2001) Principles of transfusion medicine in small animals. Review Article. *The Canadian Veterinary Journal*; 42: 447-454.
25. Lester, SJ; Hume, JB; Phipps, B. (1995) *Haemobartonella canis* infection following Splenectomy and transfusions. *The Canadian Veterinary Journal*; 36: 444-445.
26. Mayre, BA; Wortham, W. (1978). Untoward responses to blood transfusions. *Laboratory Medicine*; 9: 29.
27. Novais, A.A; Santana, A.E; Vicentin, L.A. (1999) Prevalence of DEA 1 canine blood group system in dog reared in Brazil. *Journal of Veterinary Research Animal Science, San Pablo*; 36: 23-27.
28. Organización Mundial de la Salud (2001). *Sangre y componentes sanguíneos. Grupos Sanguíneos. OPS. Modulo 3. Ginebra. 80 p.*
29. Ruiz de Gopegui, R; Feldman F. B. (Nov 1995) Use of blood and blood components in canine and feline patients with hemostatic disorders. *Veterinary Clinic of North America: Small Animal Practice*; 25: 1387- 1399.
30. Schneider, A. (1995) Blood components. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*; 25: 1245-1261.
31. Smith, C.A. Transfusion Medicine: the challenge of practical use. (1991) *Journal of American Veterinary Medicine Association*; 198: 747-752.
32. Stone, MS; Cotter, SM. (1992) Practical guidelines for transfusions therapy. En: Kirk RW, Bonagura JD (eds): *Current Veterinary Therapy*, 11a. ed. Philadelphia, Saunders; 475 p.
33. Suzuki, Y; Stormont, C; Morris, BG et al. (1975) New Antibodies in dog blood group. *Transplant Proceedings*; 7: 365.
34. Swisher, SN; Young, LE. (1961). The Blood group system of dog. *Physiological Reviews*; 41:495-520.
35. Swisher, SN; Young, LE; Trabold, N. (1962) In vitro and in vivo studies of the behaviour of canine erythrocyte-isoantibodies systems. *Annals New York Academy of Science*; 97: 15-25.

36. Symons, M, Bell, K.(1991) Expansion of the canine A blood group system. *Animal Genetics*; 22: 227- 235.
37. Tizard, Ian R. (2000). Antígenos eritocíticos e hipersensibilidad tipo II. En: Tizard, Ian R. *Inmunología Veterinaria*, 6ª. ed. Mexico; pp 351-359.
38. Turnwald, GH; Pichler, ME. (1985) Blood transfusions in dog and cat part II. Administration, adverse effects, and component therapy. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*; 7:115.
39. Wardrop, KJ; Lewis, D; Marks, S; Buss, M. (1997) Post transfusion purpura in a dog with haemophilia A. *Journal of Veterinary International Medicine*; 11: 261-263.
40. Young, L.E.; O'brien, W.A.; Swisher, S.N.; Miller, G.; Yuile, C.L. (1952) Blood groups in dog: their significance to the veterinarian. *American Journal of Veterinary Research*; 13: 207-213.

11. ANEXOS.

CUADROS Y FIGURAS.

Receptor (suero)	Donante (eritrocitos 3%)	Crossmatch	Coombs (anti Ig G)	Resultado
Conga	Flipper	No A/H	No A	Compatible
	Falucho	No A/H	No A	Compatible
	Mateo	No A/H	No A	Compatible
Flipper	Flor	No A/H	No A	Compatible
	Linda	No A/H	No A	Compatible
	Penny	No A/H	No A	Compatible
Mateo	Sombra	No A/H	No A	Compatible
	Kala	No A/H	No A	Compatible
	Ila	No A/H	No A	Compatible
Ares	Fofy	No A/H	No A	Compatible
Ali	Leyla	No A/H	No A	Compatible
	Conga	No A/H	No A	Compatible
Simón	Pedro	No A/H	No A	Compatible
Penny	Flipper	No A/H	No A	Compatible
	Falucho	No A/H	No A	Compatible
	Mateo	No A/H	No A	Compatible
Flor	Penny	No A/H	No A	Compatible
	Sombra	No A/H	No A	Compatible
	Kala	No A/H	No A	Compatible
Falucho	Flor	No A/H	No A	Compatible
	Linda	No A/H	No A	Compatible
Sombra	Ila	No A/H	No A	Compatible
	Fofy	No A/H	No A	Compatible
	Leyla	No A/H	No A	Compatible
Ila	Conga	Dudoso	No A	Compatible
	Pedro	Dudoso	No A	Compatible
	Flappy	Dudoso	No A	Compatible
Kala	Mateo	No A/H	No A	Compatible
	Linda	No A/H	No A	Compatible
	Penny	No A/H	No A	Compatible
	Conga	No A/H	No A	Compatible
CPA	GR ovinos	H	-----	
CPAD	GR ovinos	No A/H	A	Incompatible

Cuadro N° 1- Prueba de Crossmatching y Test de Coombs para la determinación de compatibilidad entre donante y receptor. Obsérvese que todos los donantes testeados fueron compatibles con su receptor. H.- hemólisis, A- Aglutinación; CPA- control positivo, CPAD- control positivo descomplementado

Eritrocitos caninos	Auto-aglutinación	Control Positivo	Test del paciente	Resultado DEA1.1
Pepito	Negativa	Aglutinación	No aglutino	negativo
Facha	Negativa	Aglutinación	No aglutino	negativo
Sol	Negativa	Aglutinación	Aglutino	positivo
Matute	Negativa	Aglutinación	No aglutino	negativo
Camila	Negativa	Aglutinación	Aglutino	positivo

Cuadro N° 2- Tipificación de grupo DEA 1.1 con Rapid Vet-H Kit. Auto aglutinación determina la presencia de aglutinación no específica. Control Positivo, muestra reacción de aglutinación de eritrocitos caninos. Test del paciente determina la presencia del antígeno DEA 1.1 en la membrana de eritrocitos.

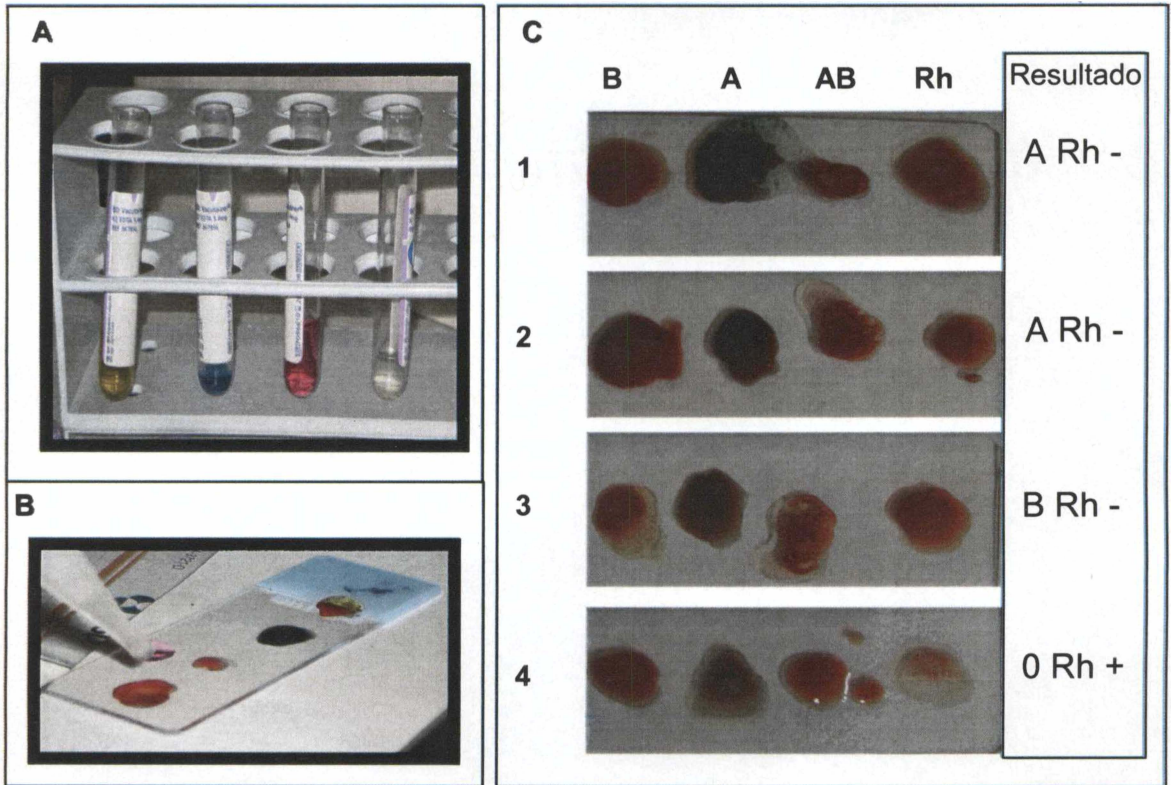


Figura N° 1- Tipificación de grupos sanguíneos con el Kit Span Diagnostics Ltd. del sistema ABO y Rh en humanos. Obsérvese que los eritrocitos reconocidos por los antisueros aglutinaron
 A- reactivos B- técnica de tipificación en placa C- Resultados de la tipificación de los integrantes del grupo de tesis.



Figura N° 2 - Producción de suero antiglobulos rojos ovinos en perros. a- procedimiento de obtención de eritrocitos ovinos. b- preparación de concentrado de glóbulos rojos ovinos. c- inmunización y extracción de sangre para la obtención del suero hiperinmune.

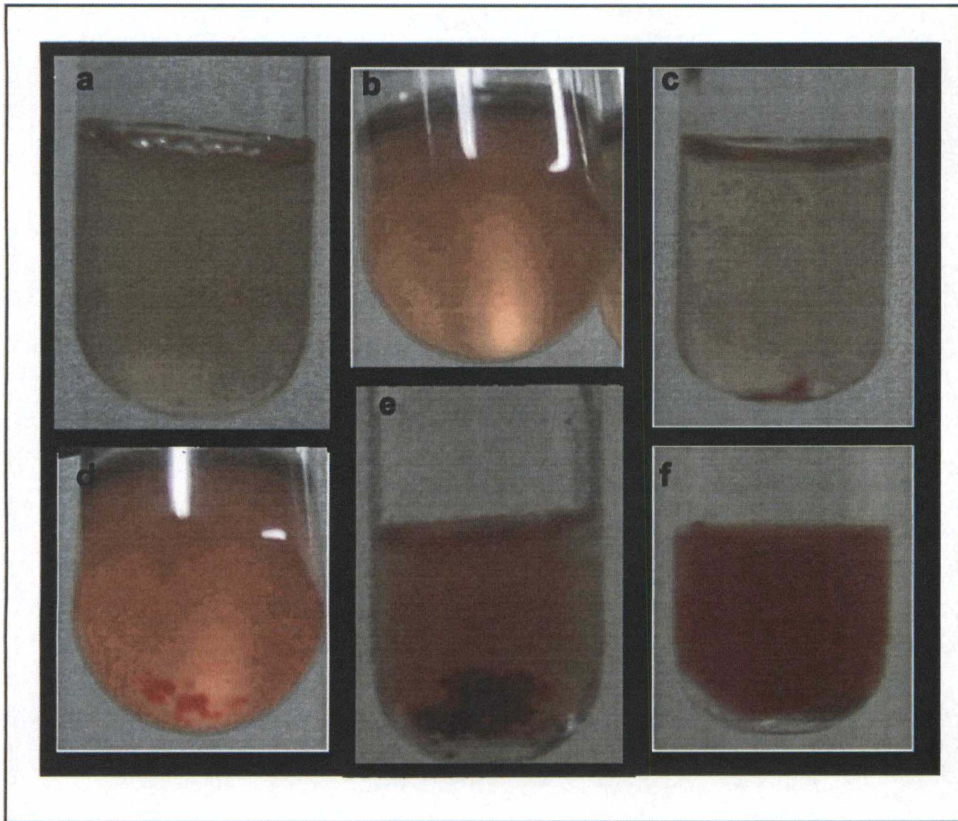


Figura Nº 3 - Posibles lecturas en pruebas de compatibilidad sanguínea en perros. a, b- Reacciones negativas c, d, e- reacciones positivas de aglutinación. f- reacción positiva de hemólisis.

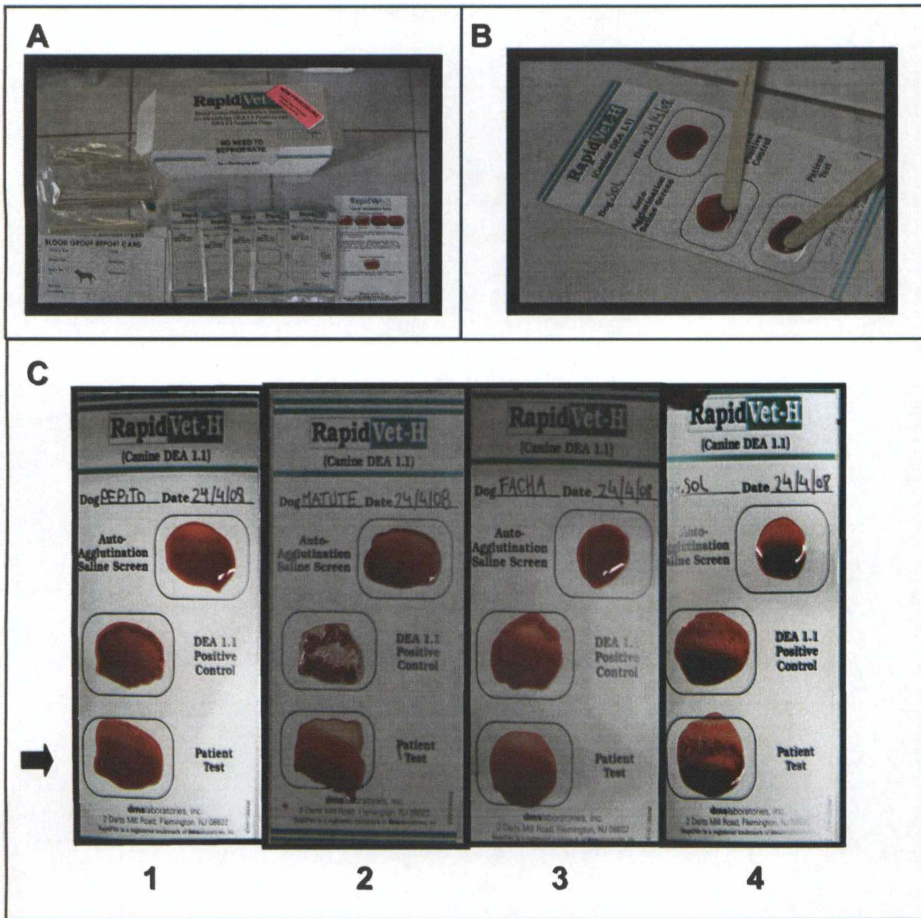


Figura N° 4 - Tipificación del grupo sanguíneo DEA 1.1 con el kit Rapid Vet-H® en perros. Obsérvese que el kit contiene un control de autoaglutinación, control positivo de aglutinación y evaluación del paciente (flecha). Pacientes 1,2 y 3 fueron DEA1.1 negativos y paciente 4 positivo. A- reactivos B - técnica de tipificación. C- resultados de la tipificación.