



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

TESINA DE GRADO

**PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE LICENCIADO
EN LABORATORIO CLINICO E HISTOPATOLOGICO**

TEMA

**“PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CONTROL
COOMBS CASERAS PARA VALIDAR LAS PRUEBAS
ANTIGLOBULÍNICAS, EMPLEANDO MUESTRAS DE SANGRE DE
USUARIOS QUE ACUDEN AL SERVICIO DEL LABORATORIO
CLINICO DEL SUBCENTRO DE SALUD DE CHAMBO AREA N°1
DURANTE EL PERIODO FEBRERO A MAYO DEL 2012”**

AUTOR.

José Barreto García.

TUTOR

Lic. FERNANDO JARAMILLO

RIOBAMBA – ECUADOR

Riobamba 28 de Enero de 2015

FIRMAS DEL COMITÉ

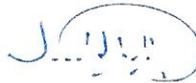
Los miembros del tribunal designados para la evaluación del tema de tesis "PREPARACION Y UTILIZACION DE LAS CELULAS CONTROL COOMBS CASERAS PARA VALIDAR LAS PRUEBAS ANTIGLOBULINICAS, EMPLEANDO MUESTRAS DE SANGRE DE USUARIOS QUE ACUDEN AL SERVICIO DE LABORATORIO CLINICO DEL SUBCENTRO DE SALUD DE CHAMBO AREA N: 1 DURANTE EL PERIODO FEBRERO A MAYO DEL 2012, presentado por el Sr. JOSE ALFREDO BARRETO GARCIA, previo a la obtención del título LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO E HISTOPATOLOGICO, autorizamos los ejemplares para la evaluación y defensa correspondiente.



Lcda. Eliana Martínez
PRESIDENTA DEL TRIBUNAL



Msc. Mary Alvear
PRIMER MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lcdo. Fernando Jaramillo
SEGUNDO MIEMBRO DEL TRIBUNAL

APEPTACION DEL TUTOR

Por la presente hago constar que eh leído el protocolo del proyecto de grado presentado por José Alfredo Barreto García, para optar por el título de Licenciado en Laboratorio Clínico e Histopatológico y que acepto asesorar en calidad de tutor al ejecutar el proyecto de tesina, durante la etapa de desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación.



Lcdo. Fernando Jaramillo
TUTOR

DERECHOS DE AUTORIA

Yo José Alfredo Barreto García soy responsable de las ideas, criterios, pensamientos y resultados expuestos en el presente trabajo investigativo y los derechos de autoría pertenecen a la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**



José Alfredo Barreto García
CI: 092117983
AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres que me hay apoyado durante el transcurso de la vida estudiantil y profesional.

AGRADECIMIENTO.

A la Universidad Nacional de Chimborazo a la Carrera de Laboratorio Clínico y al Lic. Fernando Jaramillo tutor de tesina.

ÍNDICE GENERAL

Paginas Preliminares.

Introducción Pág. 1

Capítulo I

1.1 Planteamiento del Problema..... Pág. 3

1.2 Formulación del problema..... Pág. 4

1.3 Objetivos..... Pág. 4

1.4 Justificación e Importancia..... Pág. 5

Capítulo II

2.2.1 Antígenos..... Pág. 7

2.2.1.2 Epítopes y determinantes antigénicos..... Pág. 9

2.2.1.3 Epítopes de Linfocitos B Pág. 10

2.2.1.4 Epítopes de Linfocitos T Pág. 11

2.2.1.5 Inmunogenicidad y Antigenicidad..... Pág. 12

2.2.1.4 Interacción antígeno anticuerpo Pág. 14

2.2.1.7 Tipos de Antígenos..... Pág. 15

2.2.1 8 Clases de Antígenos.....Pág. 16

2.2.2 Anticuerpos Pág. 16

2.2.2.1 Estructura Pág. 17

2.2.2.2 Clases de Inmunoglobulinas.....Pág. 19

2.2.2.3 Anticuerpos NaturalesPág. 23

2.2.2.3 Anticuerpos InmunesPág. 27

2.2.2.4 Técnica para la identificación de anticuerpos.....Pág. 32

2.2.3 Pruebas de coombsPág. 35

2.2.3.1 Significado de la prueba antiglobulinica DirectaPág. 36

2.2.3.2	Clasificación de las pruebas antiglobulinicas.....	Pag. 39
2.2.3.3	Significado de la prueba antiglobulinicas positiva.....	Pag. 39
2.2.3.4	Anticuerpos múltiples	Pág. 41
2.2.3.7	Células de control de coombs	Pág. 42
2.2.4	Anemias hemolíticas inmunes.	Pág. 43
2.2.4.1	Anemia hemolítica inmune	Pág. 43
2.2.4.2	Anemia hemolítica autoinmune	Pág. 44
2.2.4.3	Anemia hemolítica adquirida por drogas	Pág. 45
2.2.4.4	Preparación de células control coombs	Pág 48
2.2.4.5	Procedimientos específicos frente a una reacción transfusional.	Pág. 57
2.3	Definición de términos básicos	Pág. 57
2.4	Hipótesis y variables	Pág. 60
2.5	Operacionalización de variables	Pág. 61

Capítulo III

3.	Marco metodológico	Pág. 62
3.1	Método científico	Pág. 62
3.2	Población y muestra	Pág. 65
3.3	Técnicas e instrumento para la recolección de datos	Pág. 65
3.4	Técnica para el análisis de la recolección de datos.....	Pág. 66
	Estadísticas	Pág. 67

Capítulo IV

Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones	Pág. 75
4.2 Recomendaciones	Pág. 76
Bibliografía	Pág. 77
Anexos	Pág. 80

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N°1	Antígenos	Pág. 07
Gráfica N°2	Súper antígenos y Linfocitos T	Pág. 08
Gráfica N°3	Antígenos lineales y conformacionales	Pág. 10
Gráfica N°4	Epitopes de linfocitos B	Pág. 11
Gráfica N°5	Epitopes de linfocitos T	Pág. 12
Gráfica N°6	Epitopes y paratopes	Pág. 14
Gráfica N° 7	Anticuerpos estructura básica	Pág. 18
Gráfica N° 8	Regiones del anticuerpo	Pág. 19
Gráfica N° 9	Inmunoglobulina M	Pág. 21
Gráfica N° 10	Inmunoglobulina G	Pág. 22
Gráfica N° 11	Inmunoglobulina A	Pág. 23
Gráfica N° 12	Inmunoglobulina E	Pág. 24
Gráfica N° 13	Inmunoglobulina D	Pág. 24
Gráfica N° 14	Tipos de anticuerpos	Pág. 25
Gráfica N° 15	Esquema de tipificación ABO	Pág. 26.
Gráfica N° 16	Clasificación de pruebas antiglobulínicas	Pág. 41
Gráfica N° 17	Esquema pruebas de coombs directo	Pág. 45
Gráfica N° 18	Esquema de coombs indirecto	Pág. 46
Gráfica N° 19	Reactivos de coombs	Pág. 46

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1 Representación de la prueba inversa.....	Pág. 28
Tabla N°2 Esquema técnico para anticuerpos naturales.....	Pág. 29
Tabla N°3 Pantallas para anticuerpos irregulares	Pág. 38

RESUMEN

El presente trabajo de tesina preparación y utilización de las células control Coombs caseras para validar las pruebas antiglobulinicas, se lo realizó con el objetivo de Identificar la importancia e interés clínico de las pruebas de Coombs y su utilidad en los diagnósticos de trastornos hemolíticos, validando los resultados negativos de estas pruebas, su significado e interés clínico es determinar anticuerpos presentes en reacciones transfusionales como en incompatibilidades feto maternas. Estas células de control son proporcionados por muchos laboratorios o casas comerciales, la base de ser justificadas como células de control es porque tiene como componentes a células (hematíes) en cuya membrana se alojarán anticuerpos y anti IgG para reaccionar con los posibles anticuerpos presentes en el suero o plasma y con los reactivos utilizados en la prueba de Coombs. Se utilizó en el presente trabajo investigativo el método científico porque contiene un conjunto de pensamientos universales, leyes y principios comprobables importantes en el aporte de la validación de las pruebas antiglobulinicas cuyo trabajo está relacionado al apoyo de diagnóstico por laboratorio de trastornos hematológicos ocasionados por la presencia de anticuerpos irregulares que se destinan a la destrucción de los hematíes ocasionando como respuesta la destrucción de los glóbulos rojos y su descenso en el contaje total de los mismos ocasionando como efecto cuadros de anemia que en algunos casos pueden ser tolerables por el organismo y en otros no. Como conclusión Se puede preparar células de control Coombs en el laboratorio tomando en cuenta que su conservación es limitante en tiempo y esta característica lo limita o lo prolonga según el tipo y dosis de persevante empleado como también del control de la cadena de frio que se le aplique.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CENTRO DE IDIOMAS

ABSTRACT

The present research is about how to prepare and use of Coombs control home cells to validate antiglobulins tests; it is performed in order to identify the importance and clinical interest. Also Coombs test and its helpfulness in the diagnosis of hemolytic disorders, validating negative results of these tests, its meaning and clinical interest is to determine antibodies in transfusion reactions and fetal maternal incompatibility. These control cells are provided by many laboratories and commercial firms, the base being justified as control cells because its components is a cell (RBC) membrane in which IgG antibodies and ant staying potential to react with antibodies present in the serum or plasma and reagents used in the Coombs test. The scientific method is used in this investigation work because it contains a set of important contribution to the validation of antiglobulins universal thoughts tests, testable laws and principles whose work is related to support laboratory diagnosis of hematological disorders caused by the presence irregular antibodies these are intended for causing red cell destruction in response destruction of red blood cells and decrease in the total count there of boxes effect causing anemia in some cases may be tolerable by the body and other are not. As a conclusion we can say that the Coombs Control cells can be prepared in the laboratory taking into account that their conservation is limited in time and this feature limits or extends also by type and dose of pursuivant used as control a cold chain to be applied and a recommendation should be carefully dose the pursuivant to develop Coombs control cells as regulator the storage temperature being monitored daily this control, as well recording the date, time and technical responsible for the preparation.

Reviewed by:


MSc. Ligia López H.



ENGLISH TEACHER LANGUAGES CENTER
HEALTH AND SCIENCES SCHOOL - UNACH

INTRODUCCIÓN

La determinación e identificación de anticuerpos anti-eritrocitarios constituye una de las prácticas más interesantes en el campo de la Inmunohematología, la mayoría de las personas no tiene los anticuerpos irregulares en el suero y su incidencia se ha calculado dentro de un bajo porcentaje dependiendo del grupo sanguíneo del individuo examinado y de las técnicas empleadas para su investigación con muchos de estos anticuerpos, presentan problemas complejos en el momento de una transfusión sanguínea, o como resultado de la causa de una anemia hemolítica. Para poder determinar estos anticuerpos se requiere de la implementación de tecnología y de la calidad de los reactivos como también de las gestiones administrativas de los directivos específicos en el laboratorio. Las normas que emplea los bancos de sangre, es determinar la presencia o ausencia de los anticuerpos en los donantes de sangre y en los candidatos a recibir la transfusión, en los donantes, la investigación tiene por finalidad detectar anticuerpos irregulares para prevenir su transferencia al receptor, las normas de la asociación americana de los bancos de sangre recomiendan especialmente que esta prueba realizarse en aquellos donantes con historia de transfusiones anteriores o embarazos.

Todos los individuos expresamos concentraciones de anticuerpos, como resultado de una transferencia pasiva feto materna o por una transferencia de anticuerpos mediante las vacunas o su vez como resultado de la memoria inmunológica ante un estímulo antigénico.

En el área de la Inmunohematología se menciona a dos tipos de anticuerpos, los llamados naturales y los llamados irregulares, los anticuerpos naturales se les define aquellos que surgen en ausencia de un estímulo antihigiénico conocido que indujo al organismo a activar a las células y mecanismos de la inmunidad celular por antígenos dirigidos a los glóbulos rojos.

Los anticuerpos llamados irregulares o también conocidos como inespecíficos son aquellos que estimularon el organismo al desarrollo de la titulación y concentración de inmunoglobulinas sean por transfusiones o embarazos incompatibles, para que surjan este tipo de anticuerpos por los estímulos ya mencionados necesariamente en el organismo se manifiesta la sensibilización, transferencia de anticuerpos y la dirección específica antígeno anticuerpo.

La llamada prueba de coombs o también conocida como antiglobulinica, es la empleada en los bancos de sangre para la determinación de los anticuerpos irregulares, conforme ha evolucionado la ciencia, la medicina también han evolucionado las técnicas y procedimientos.

Para la garantía de los resultados se emplean controles y se asegura la calidad de los ensayos y sus reportes, en este tema de investigación se pretende validar a los ensayos de pruebas antiglobulínicas mediante el empleo de células control coombs preparadas en el laboratorio, las mismas que tendrán un cuidado en sus preparación e impacto en la reducción de costos al invertir en el laboratorio un medio celular de control, que permita garantizar resultados de pruebas relacionados al diagnóstico de procesos hemolíticos como la compatibilidad exitosas previo a la transfusión de sangre y sus derivados.

CAPITULO 1

1.- PROBLEMATIZACION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación de anticuerpos es de gran valor, pero tiene limitaciones como ejemplo citamos al resultado de una prueba negativa, esta no necesariamente significa que el suero estudiado esté libre de anticuerpos irregulares, sino, que no se pudieron demostrar anticuerpos por defectos en las técnicas empleadas.

Si las circunstancias clínicas con el laboratorio lo amerita, el procedimiento puede expandirse empleando otras técnicas o a su vez empleando medios de control no solamente a la fase pre - analítica, analítica y post analítica, sino relacionado al control a la validación del resultado, comprobando que el suero no aporta con anticuerpos y que durante el proceso de la realización de los exámenes si fueron empleados los medios de reacción específicos.

El test o prueba antiglobulínica tiene una relevancia de interés cuando se sospecha una reacción hemolítica, enfermedad hemolítica del recién nacido o anemia hemolítica autoinmune, para estos casos puede ser necesario incluir técnicas con enzimas, procedimientos de mayor sensibilidad, pero que al final requieren de la evaluación de la calidad de todo el proceso, reactivos y pasos empleados para obtener los resultados.

Las casas comerciales ofertan variedad de reactivos para las pruebas inmunohematológicas como son el caso del reactivo de coombs y medios de control como son las llamadas células control Coombs, estas tienen un alto costo y su adquisición debe ser previamente programado, debido a que son células humanas, la contratación para tener estos reactivos, se los hace generalmente con meses de anticipación.

Si llegase a pasar algún incidente administrativo para su adquisición o como puede suceder en laboratorio con la pérdida del reactivo por accidente laboral es decir derrame por una mala manipulación, es entonces la propuesta de trabajar preparando las células control Coombs caseras para validar la efectividad del resultado emitido por los servicios de los laboratorios.

1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Pueden ser validadas las pruebas antiglobulinicas, mediante la utilización de las células control Coombs caseras, preparadas en el laboratorio mediante la utilización de muestras de sangre de usuarios que acuden al servicio de laboratorio clínico del subcentro de salud de Chambo?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Preparar y utilizar de las células control coombs caseras para validar las pruebas antiglobulinicas, empleando muestras de sangre de usuarios que acuden al servicio del laboratorio clínico del subcentro de salud de chambo área N°1 durante el periodo Febrero a Mayo del 2012

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Identificar la importancia e interés clínico de las pruebas de Coombs y su utilidad en los diagnósticos de trastornos hemolíticos.
- Analizar las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas empleadas por las pruebas de Coombs para identificar anticuerpos irregulares.

- Preparar células control Coombs caseras para validar a las pruebas antiglobulínicas directas e indirectas mediante la utilización de preservantes.

1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Este trabajo investigativo tiene como finalidad, proponer a que las pruebas de Coombs serán evaluadas por la utilización de las llamadas células control Coombs caseras.

Éstas células de control son proporcionados por muchos laboratorios o casas comerciales, la base de ser justificadas como células de control es porque tiene como componentes a células (hematíes) en cuya membrana se alojarán anticuerpos y anti IgG para reaccionar con los posibles anticuerpos presentes en el suero o plasma y con los reactivos utilizados en la prueba de coombs. Adquirir estos medios de control es de alto costo y de una programación estricta administrativamente para poder disponer, de manera continua y a tiempo. Si no se llegara a validar estas pruebas se pondrían en alto riesgo, los tratamientos y mejoras de los pacientes que tengan trastornos hematológicos causados por las reacciones de anticuerpos inesperados o por defecto de la utilización de fármacos o procesos clínicos como es el cáncer. Muchas técnicas empleadas para detectar estos anticuerpos, llegan a ser obsoletas, debido a que no sólo existe un sistema de grupos sanguíneo que estimula a la producción de inmunoglobulinas de tipo IgG.

Una gran variedad de sistemas de grupos sanguíneos existen, y que pueden ocasionar con sus anticuerpos específicos las llamadas reacciones hemolíticas. La actualización de técnica está dirigido a los laboratorios destinados a los servicios transfusionales como son en los bancos de sangre y centros de transfusión, sin embargo los laboratorios clínicos también pueden ofertar este tipo de pruebas y disponer de un mecanismo de calidad que conllevan a que los resultados, sean sometidos a un control de la calidad, esto evidentemente asegura la

mejora del diagnóstico por laboratorio, diagnóstico diferencial y tratamiento clínico.

Preparar las células control coombs requiere de seguir parámetros exactamente como lo describe la técnica, este proceso de preparación se destina a reducir costo en la inversión debido a que se trabaja con empresas que exigen contrataciones de servicios por mínimo un año y su entrega a una programación de acuerdo a la oferta y demanda en la ejecución de la prueba de coombs., en algunos laboratorios la demanda es mínima y contratar estos servicios resultan inversiones a pérdidas, elaborando estas células de control se podría contribuir a la reducción de la inversión y a disponer de un garantía en los resultados emitidos.

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO

2.1 POSICIONAMIENTO PERSONAL

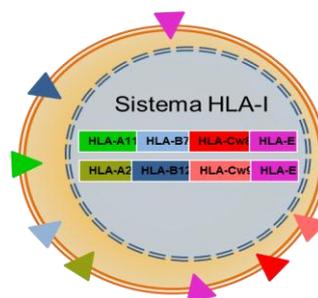
La teoría del conocimiento o creencia con la que vamos a trabajar la presente investigación que se elabora es, partiendo del conocimiento del pragmatismo, doctrina filosófica que considera que el único medio de juzgar la verdad de una doctrina moral, social, religiosa o científica consiste en considerar sus efectos prácticos

El pragmatismo cree que el hombre es incapaz de captar la esencia íntima de las cosas, que la razón humana es incapaz de resolver los enigmas metafísicos y desvía entonces su atención a los resultados prácticos, vitales de las ideas y creencias. La actitud del pragmatismo es de desprenderse de las primeras cosas, causas, categorías, principios, sustancias, y fijarse en los frutos, efectos, resultados prácticos de las ideas.

2.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.2.1 ANTÍGENOS

Ilustración 1 Antígeno



Fuente: <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/quiminorgen/peces.html>

Son moléculas o sustancias de origen endógeno o exógeno con características de resultar extraños para el organismo, Puede ser

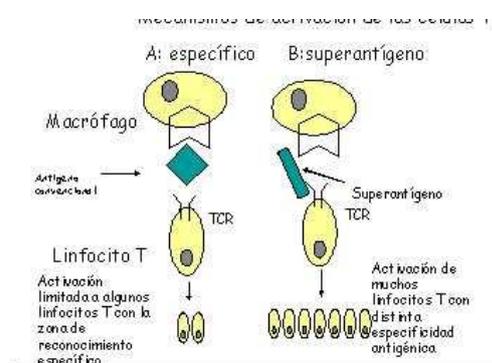
específicamente unida por un anticuerpo (Ac) o por un receptor de célula T (TCR), pero no necesariamente genera una respuesta inmune.

Para aquellas moléculas que inducen una respuesta inmune, se le designa con el término de inmunógeno, algunas moléculas pequeñas, pueden unirse específicamente a los anticuerpos pero no activan a las células B o T (son antígenos, pero no inmunógenos). Sin embargo, moléculas con bajo peso molecular, por lo general inferior a 4,000 Da, llamadas haptenos, pueden unirse covalentemente con una proteína propia de mayor peso (acarreadora o transportadora) y formar un inmunógeno.

2.2.1.1 SUPERANTIGENO.

Es una sustancia de origen viral o bacteriano, que tiene la propiedad de unir por fuera tanto moléculas de MHC II (moléculas de histocompatibilidad), como de TCR (receptores de células T).. Actúan como una unión entre las dos y activan alrededor de 30% de los linfocitos, en tanto un antígeno convencional procesado únicamente activa 0.001% de estas células. De lo anterior se deriva, que la exposición a un superantígeno puede conducir a la liberación masiva de citocinas, lo que puede causar un síndrome clínico similar al shock séptico.

Ilustración 2 Superantígeno y Linfocito T



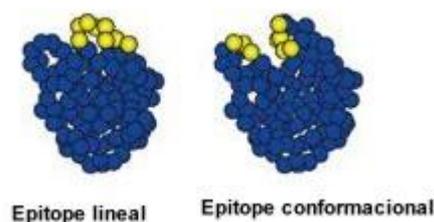
Fuente: <http://www.uv.es/derma/CLindex/CLpiodermatitis/CLPiodermatitis.html>

2.2.1.2 EPÍTOPES Y DETERMINANTES ANTIGÉNICOS

Es el sitio o porción inmunodominante de un antígeno, a través del cual se une con un anticuerpo o con un receptor del linfocito T. La valencia de un antígeno, corresponde al número de epítomos que contiene. Así, un mismo antígeno puede tener epítomos para unirse con anticuerpos o con el receptor de la célula T. Los anticuerpos reconocen a la estructura expuesta, primaria o terciaria, del antígeno nativo y los receptores de T principalmente a la primaria (proveniente de antígenos, principalmente proteínicos, procesados), lo que implica la existencia de dos tipos de epítomos:

- **Lineal.** Formado por secuencias de aminoácidos continuos y contiguos.
- **Conformacional.** Constituido por secuencias de aminoácidos continuos o discontinuos y distantes, que se aproximan entre sí debido al plegamiento o conformación tridimensional del antígeno.

Ilustración 3 Ag. Lineales y Conformacionales



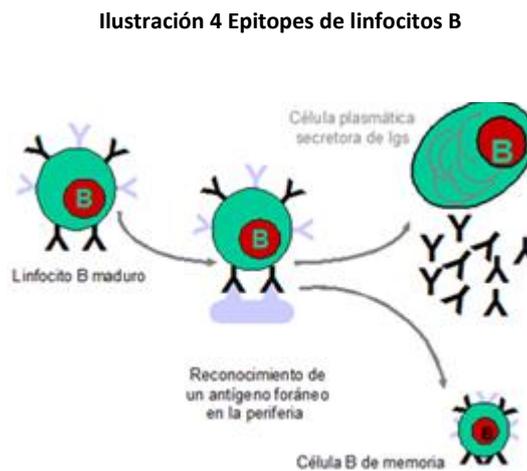
Fuente: <http://dieumsnh.qfb.umich.mx/bioquimica/glosario.htm>

En estos casos descritos se puede considerar la Inmunogenicidad, a la cual se la describe como potencia o capacidad que tiene una molécula para generar una respuesta inmune y depende tanto de su naturaleza,

como de la inherente al individuo en el que actúa (receptor). *Vega Gloria, Antígenos e Inmunógenos, año 2009, pág. 41-44*

2.2.1.3 EPÍTOPES DE LINFOCITOS B.

Los linfocitos B. reconocen epítopes sobre el antígeno nativo y esto es importante ya que los anticuerpos se encuentran en el líquido extracelular para reaccionar con los antígenos, en general es mejor antígeno una molécula grande que una pequeña, cuya estructura no se asemeja al de otras moléculas propias del organismo, que inducen tolerancia, también se ha visto que las proteínas son mejores antígenos que los polisacáridos y los publicolipidos.



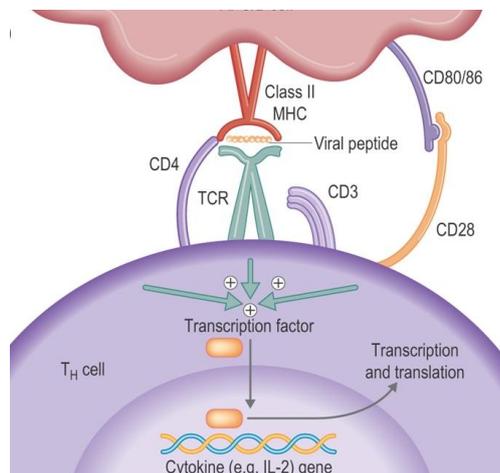
Fuente: <http://epidemiologiamolecular.com/respuesta-inmune-frente-virus-gripe/>

Las partes de la estructura peptídica, que sobresale de la superficie globular tienden a poseer alta densidad de epítopes, ya que facilitan el acceso y la unión del anticuerpo, del mismo modo, una cierta flexibilidad en la estructura de estas cadenas etílicas para facilitar la asociación con el anticuerpo.

2.2.1.4 EPITOPE DE LINFOCITOS T.

Los linfocitos T CD4 necesitan que el antígeno vaya asociado a una molécula de clase dos HLA, mientras que los linfocitos T CD8 necesita una molécula de clase uno en la superficie celular para la presentación del antígeno, a diferencia de los linfocitos B el receptor de los linfocitos T. no reconocen al antígeno nativo, sino que necesitan un procesamiento previo en la célula presentadora del antígeno para transformarlo en un péptido lineal.

Ilustración 5 Epitope de los LsT



Fuente:

http://www.ffis.es/volviendoalobasico/13respuesta_inmunitaria_a_los_microorganismos.html

Virtualmente toda molécula ajena a un determinado organismo se comporta frente a éste como un antígeno, Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno. Por una parte la inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y la antigenicidad o particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo. Ambas propiedades pueden o no estar presentes

en un determinado antígeno. Moléculas de pequeño tamaño (haptenos o péptidos) son poco inmunogénicas y por ello se asocian a proteínas transportadoras de alto peso molecular o 'carriers' para inducir una respuesta inmune adecuada. Macromoléculas ubícuas (albúminas, citocromos, etc...) o de especies filogenéticamente relacionadas, son poco inmunogénicas. En estos casos, para obtener una respuesta adecuada es aconsejable utilizar como animal huésped una especie filogenéticamente alejada a la del antígeno a inocular.

Habitualmente se emplean como antígenos puros o previamente enriquecidos mediante técnicas de concentración o de separación electroforética. Uno de los criterios de mayor importancia en la obtención de un suero monoespecífico es la inmunización con antígenos puros.

A la región del antígeno reconocida por un anticuerpo se le denomina epítopo o determinante antigénico. Un antígeno puede presentar un número variable de epítopes de estructura única o repetitiva. La complejidad estructural de las proteínas favorece que éstas presenten por lo general un número elevado de epítopes distintos, mientras que los ácidos nucleicos y los polisacáridos, dada su repetitividad estructural, poseen un número escaso de epítopes diferentes.

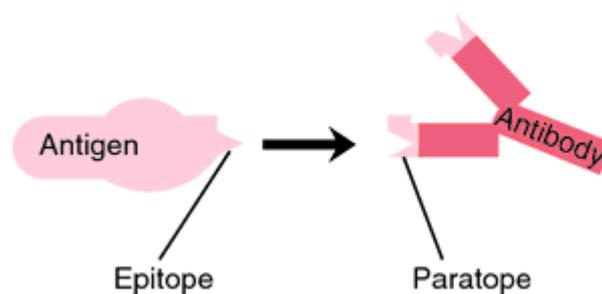
2.2.1.5 INMUNOGENICIDAD Y ANTIGENICIDAD.

Toda molécula ajena a un determinado organismo se comporta frente a éste como un antígeno, Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno. Por una parte la inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y la antigenicidad o particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo. Ambas propiedades pueden o no estar presentes en un determinado antígeno. Moléculas de pequeño tamaño (haptenos o péptidos) son poco inmunogénicas y por ello se asocian a proteínas transportadoras de alto peso molecular o 'carriers' para inducir una

respuesta inmune adecuada. Macromoléculas ubíquas (albúminas, citocromos, etc...) o de especies filogenéticamente relacionadas, son poco inmunogénicas. En estos casos, para obtener una respuesta adecuada es aconsejable utilizar como animal huésped una especie filogenéticamente alejada a la del antígeno a inocular.

Habitualmente se emplean como antígenos puros o previamente enriquecidos mediante técnicas de concentración o de separación electroforética. Uno de los criterios de mayor importancia en la obtención de un suero mono específico es la inmunización con antígenos puros.

Ilustración 6 Epitope y Paratope



Fuente: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/epitope>

A la región del antígeno reconocida por un anticuerpo se le denomina epítotope o determinante antigénico. Un antígeno puede presentar un número variable de epítotope de estructura única o repetitiva. La complejidad estructural de las proteínas favorece que éstas presenten por lo general un número elevado de epítotope distintos, mientras que los ácidos nucleicos y los polisacáridos, dada su repetitividad estructural, poseen un número escaso de epítotope diferentes.

2.2.1.6 INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO.

La interacción entre antígeno y anticuerpo se estabiliza mediante enlaces débiles, como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. La suma de todos estos enlaces genera una interacción estable entre el lugar de unión del anticuerpo (paratope) y el lugar de unión del antígeno (epítope). Estas fuerzas son inversamente proporcionales a una potencia de la distancia entre los grupos interactuantes, lo que implica que epítope y paratope deben presentar estructuras complementarias para obtener una energía de unión suficiente como para resistir la disrupción termodinámica. La suma de estas fuerzas de atracción y de repulsión se conoce como afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos son moléculas multivalentes en su interacción con el antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina presentan un máximo de 10 (IgM) y un mínimo de 2 brazos de unión con el antígeno. En el caso de que este último también sea multivalente, presentará un mínimo de dos puntos de anclaje para el anticuerpo correspondiente. Esta interacción multivalente entre antígeno y anticuerpo permite introducir el concepto de avidéz o afinidad funcional. En la interacción in vitro de un antígeno con su correspondiente anticuerpo se distinguen dos etapas, la reacción primaria no visualizable y la reacción secundaria, que sigue a la anterior y se caracteriza por la aparición de un fenómeno visible como la aglutinación, la precipitación, etc.

Los complejos iniciales que se forman rápidamente, sobre los que dentro de ciertos límites las variaciones de temperatura y concentración salina tienen poca influencia, se agregan luego para dar diferentes fenómenos visibles cuyas características dependen en gran parte del estado físico del antígeno. Esta etapa se acelera con la temperatura, la agitación y es electrolito dependiente.

Es importante separar las etapas de la reacción antígeno-anticuerpo. Puede ocurrir que se demuestre la presencia de anticuerpo por interacción primaria, pero que este no sea detectable por interacción secundaria o terciaria. Esto puede ser consecuencia de variaciones cuantitativas, ya que para conseguir fenómenos visibles son indispensables determinadas concentraciones de anticuerpo, y cualitativas inherentes a las propiedades de la clase de inmunoglobulina comprometida en la respuesta inmune, así como de las características del ligando. Si bien es posible detectar un anticuerpo mediante estudios de interacción primaria, ello no significa que siempre deban ocurrir reacciones secundarias o terciarias (*Margni R. A. Inmunología e Inmunoquímica, Antígenos y Anticuerpos, Pág. 40*)

2.2.1.7 TIPOS DE ANTIGENOS.

La respuesta a la mayor parte de los antígenos depende de que tanto las células B como las T reconozcan aquellos. Este tipo de antígenos se denominan T-dependientes. Existe, en cambio, un pequeño número de antígenos capaces de activar las células B sin el auxilio de las células T, designados como T-independientes. Los antígenos T-independientes comparten diversas propiedades (son homopolímeros: moléculas grandes con determinantes antigénicos repetidos). Muchos poseen la capacidad (a concentraciones elevadas) de activar clones de células B específicas de otros antígenos (activación policlonal), sin embargo, a bajas concentraciones solamente activan sus clones B específicos. Las respuestas primarias de anticuerpos in vitro frente a los antígenos T-independientes son generalmente más bajas que las que ocurren frente a los antígenos T-dependientes y alcanzan su pico más tarde. La respuesta secundaria a los antígenos T-independientes se asemeja a la primaria; es más débil y se halla casi enteramente limitada a la producción de IgM. En cambio la respuesta secundaria de IgG a los antígenos T-dependientes es mucho más potente y aparece antes. La inducción de memoria es así

mismo escasa. (López Rogeiro, *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune*, pág. 82)

2.2.1.8 CLASES DE ANTIGENOS

Polisacáridos. Son inmunógenos cuando se asocian a portadores proteicos, como ocurre con los que forman parte de moléculas más complejas (glicoproteínas), que inducen una respuesta inmune parte de la cual es específica para la parte hidrocarbonada de la molécula. Pero también se puede inducir una respuesta inmune de anticuerpos frente a muchos tipos de polisacáridos, como los que forman parte de microorganismos y células eucariotas. El ejemplo clásico de antigenicidad de los polisacáridos es la respuesta a los antígenos sanguíneos del sistema ABO, que son polisacáridos de la superficie de los glóbulos rojos.

Lípidos. Son normalmente poco inmunogénicas, pero pueden inducir respuesta si se unen a proteínas portadoras. Los lípidos de las mycobacterias se reconocen por un subtipo especial de células T; los Tgd, que forman parte de la respuesta ancestral.

Ácidos nucleicos. No son muy inmunogénicas, salvo que se asocien con proteínas portadoras. Los anticuerpos anti-DNA son característicos de **varios procesos autoinmunes.**

Proteínas. Virtualmente, todas las proteínas son inmunogénicas y la gran mayoría de los inmunógenos son proteínas. Cuanto mayor es la complejidad de la proteína más fuerte es la respuesta. Normalmente contienen muchos epitopos. (<http://farmapuntes.wikispaces.com/file/view/tema8.0-t.pdf>)

2.2.2 ANTICUERPOS.

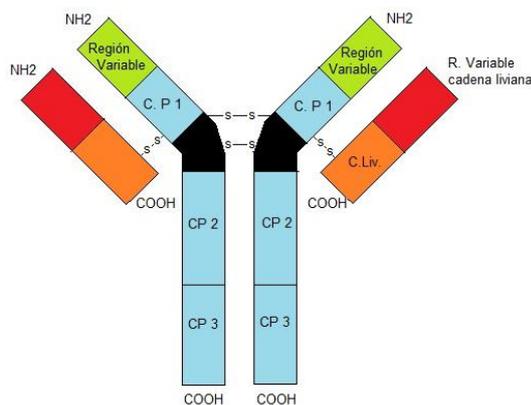
El sistema inmunológico tiene como función principal proteger al organismo de agentes extraños, está integrado por diferentes órganos, tejidos, células y moléculas que funcionan coordinadamente.

Sus componentes más importantes son: la piel y las mucosas, los órganos linfoides como las amígdalas, las adenoides, el bazo, el timo, los ganglios linfáticos; numerosas células leucocitarias (linfocitos) y sus productos de secreción como citocinas, quimiocinas e inmunoglobulinas entre otros.

Este sistema tiene tres propiedades esenciales: primera, tiene la habilidad de reconocer sustancias extrañas denominadas antígenos principalmente provenientes de patógenos, tales como bacterias, virus, hongos

2.2.2.1 ESTRUCTURA.

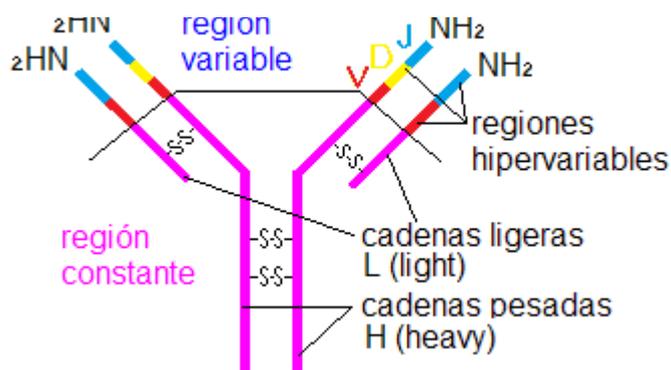
Ilustración 7 Anticuerpo Estructura Básica



Fuente: <http://resumendeinmunologia.blogspot.com/2011/08/estructura-basica-de-los-anticuerpos.html>

Los anticuerpos independiente de su especificidad tienen una estructura común, consistente de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas de 55-70 kDa denominadas con la letra H (del inglés heavy), unidas covalentemente a un oligosacárido, y un par idéntico de cadenas livianas no glicosilada de 24 kDa denominadas con la letra L (del inglés light).

Ilustración 8 Regiones del Anticuerpo



Fuente: http://kuriosidadescientifiks.blogspot.com/2013/10/antigenos-y-anticuerpos_2.html

Un puente disulfuro y otras uniones no covalentes unen las cadenas pesadas con las livianas. Las cadenas pesadas también están unidas entre sí por al menos un puente disulfuro, tal unión está localizada en una región conocida como “bisagra”, región formada por aproximadamente 12 residuos de aminoácidos que proporciona una gran flexibilidad a la molécula, éstos residuos están expuestos a la ruptura química y enzimática. La papaína es una enzima que divide a las inmunoglobulinas en dos fragmentos idénticos conocidos como Fab (del inglés antigen binding fragment) que en la actualidad se sabe que son los que se unen al antígeno, y en un fragmento que posee la propiedad de ser fácilmente cristizable denominado Fc (del inglés crystalline fragment)

La formación de puentes disulfuro internos en las cadenas H o L da como resultado la formación de dominios proteicos globulares (característico de todos los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas). Las cadenas livianas se componen de un dominio variable (V) y uno constante (C), denotados como VL y CL, respectivamente; mientras que las cadenas pesadas presentan un dominio variable y tres constantes, VH, CH1, CH2 y CH3, respectivamente. Las regiones variables y el primer dominio constante de las cadenas pesadas (VH y CH1) se asocian con las cadenas livianas para formar dos sitios idénticos de unión al antígeno, los

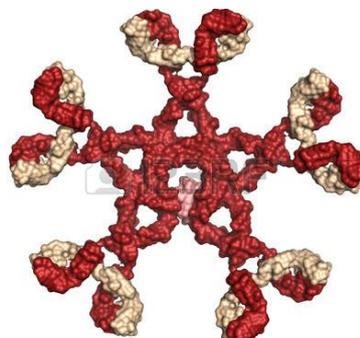
fragmentos Fab4-6, cada uno de los cuales contiene las Regiones de Determinación de Complementariedad o simplemente CDR (del inglés complementarity determining region), tres aportados por la cadena ligera y otro tanto por la cadena pesada, las cuales interaccionan directamente con un antígeno específico, siendo los CDR3 los que interaccionan más estrechamente con éste (Figura 1). Por otro lado, las regiones CH2 y CH3 de las cadenas pesadas forman la fracción cristalizante o fragmento Fc, región que cumple con funciones efectoras, tales como transporte placentario, potenciación de la fagocitosis (opsonización) o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. (Sanabria Ayala Víctor, *Revista Médica; anticuerpos, propiedades y perspectivas*)

2.2.2.2 CLASES DE INMUNOGLOBULINAS

Existen cinco clases de inmunoglobulinas, su producción esta determinado algunas veces por el tipo de antígeno, en otras por el efecto de citoquinas, los lipopolisacáridos generan IgM, en tanto que los alérgenos inducen a la producción de IgE.

La IgM: está formada por cinco unidades básicas de inmunoglobulina unidas entre si por una pieza J y se encuentra presente en el plasma. Tiene diez sitios de unión con antígeno y es secretada principalmente en respuestas humorales primarias timo dependientes y en respuestas timo independiente.

Ilustración 9 Inmunoglobulina IgM

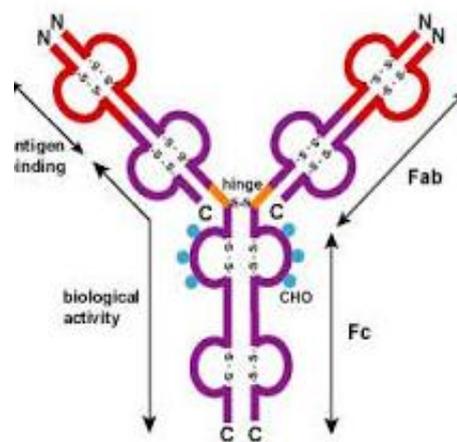


Fuente: http://es.123rf.com/imagenes-de-archivo/immunoglobulin_a.html

Es de baja afinidad pero presenta gran avidéz por antígenos multivalentes especialmente bacterianos. Es una potente fijadora del complemento, al presentar cinco fragmentos Fc que unen al factor del complemento C1q. La IgM se encuentra también en la membrana de linfocitos B en forma de monómero, constituyendo los receptores idiotípicos de estas células.

La IgG: Es la inmunoglobulina más abundante en el plasma, es monomérica y es producida en grandes cantidades durante respuestas secundarias a antígenos timo dependientes. Sus principales funciones biológicas incluyen fijación del complemento, unión a receptores para Fc en células fagocíticas al opsonizar partículas durante la fagocitosis y unión a receptores en células NK durante la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC). Esta inmunoglobulina atraviesa la placenta confiriendo protección al feto durante el embarazo.

Ilustración 10 Inmunoglobulina IgG.

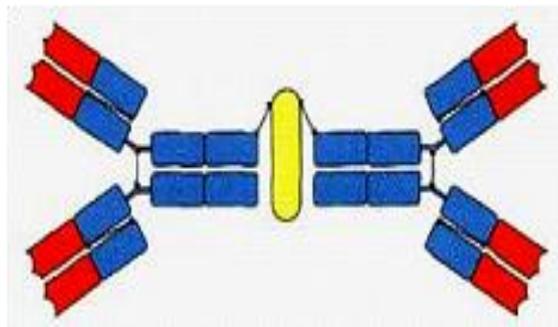


Fuente: <http://www.merriam-webster.com/art/med/antibody.htm>

La IgA: Se encuentra en lágrimas, leche, saliva y mucosa de los tractos intestinal y digestivo. Está formada por dos unidades básicas unidas por una pieza secretora sintetizada por las células epiteliales de las mucosas. Esta pieza secretora es un polipéptido responsable del transporte de la IgA a través del epitelio.

Además la protege de la acción de enzimas proteolíticas presentes en las secreciones. Es sintetizada en grandes cantidades por acúmulos linfoides y placas de Peyer del intestino. No fija complemento ni es opsonina, sin embargo su importancia es enorme al impedir el ingreso de microorganismos y macromoléculas al organismo.

Ilustración 11 Inmunoglobulina IgA.



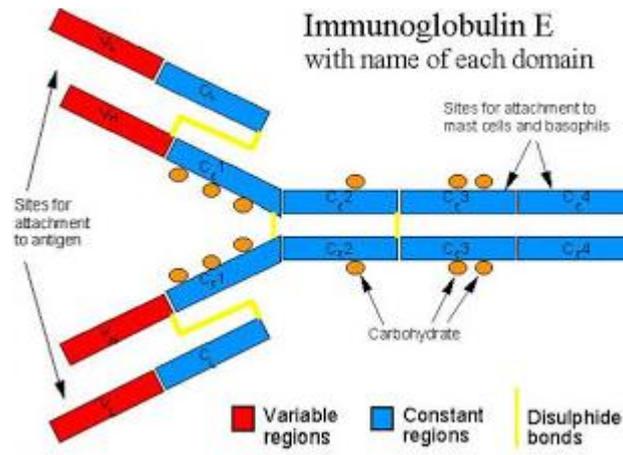
Fuente:

http://organografia.unileon.es/html/Organos%20hematopoyeticos%20y%20linfoides_IV_archivos/frame.htm

La IgE: Se encuentra en muy bajas concentraciones en el suero de personas normales, y en mayores concentraciones en individuos atópicos. En estos últimos es responsable de los cuadros de hipersensibilidad mediada por un mecanismo de daño inmunológico tipo I de la clasificación de Gell y Coombs. El fragmento Fc de estas inmunoglobulinas presenta gran afinidad por receptores para Fc epsilon en células cebadas y basófilos. Al estar ubicada en su superficie y recibir el estímulo antigénico, la IgE induce su degranulación iniciando un proceso inflamatorio y produciendo la contracción del músculo liso. En condiciones normales,

esta inmunoglobulina interviene en la respuesta inmune protectora contra parásitos especialmente helmintos.

Ilustración 12 Inmunoglobulina IgE.

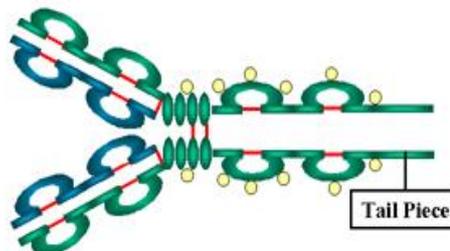


Fuente: <http://chemistryofasthma.blogspot.com/2008/11/inmunoglobulina-e.html>

La IgD es una inmunoglobulina unida a membrana de los linfocitos B. Su presencia en conjunto con IgM confiere inmunocompetencia a estos linfocitos. Está prácticamente ausente en el suero. (Rojas, William, *Inmunidad Humoral Cap. 12, págs. 145 – 169*)

Ilustración 13. Inmunoglobulina D

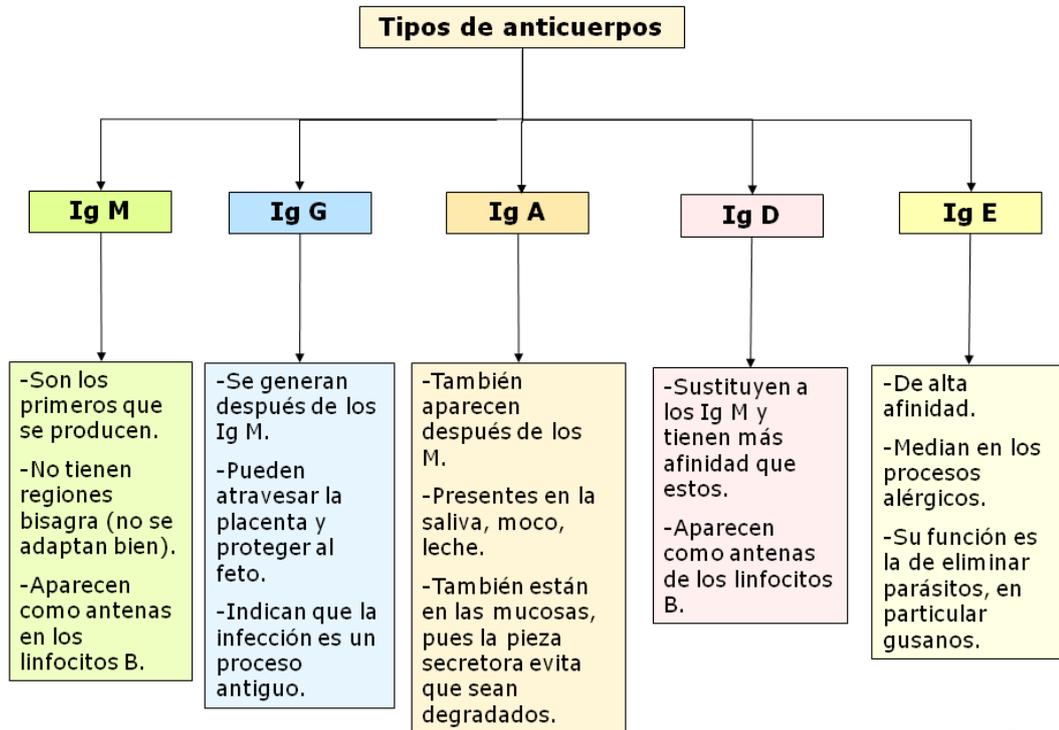
- Structure
 - Monomer
 - Tail piece



Fuente:

http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Inmunoglobulina+D&lang=2

Ilustración 14. Tipos de anticuerpos



Fuente:

<http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/deptos/dbiogen/recursos/Apuntes/ApuntesBioBach2/7-Inmunologia/inmuadap.htm>

2.2.2.3 ANTICUERPOS NATURALES.

Son inmunoglobulinas que aparecen independientemente de cualquier tipo de estímulo y generalmente son IgM. Los anticuerpos IgM constituyen alrededor del 8% de las inmunoglobulinas totales. Son mucho más grandes que los IgG y tienen un peso molecular de 900.000. No pueden atravesar la placenta, de manera que no provocan enfermedad hemolítica del recién nacido. Aglutina con facilidad los glóbulos rojos suspendidos en solución salina y su sobrevivencia es de apenas 10 días. Durante las reacciones antígeno-anticuerpo, a menudo activan el sistema de complemento y en consecuencia, causan lisis de los eritrocitos, más que aglutinación.

Ilustración 15. Esquema de tipificación ABO

		ANTI-A	ANTI-B	ANTI-AB
	A	+	-	+
Grupo	B	-	+	+
	O	-	-	-
	AB	+	+	+

Fuente: Transfusión Sanguínea Bases Teóricas y Aplicación Clínica

Los anticuerpos naturales del sistema de grupo sanguíneo ABO, pueden ser detectados mediante la tipificación sérica de los anticuerpos, basándose en la técnica inversa de identificación.

Aquí se enfrentan el plasma con hematíes que contengan antígenos conocidos previamente del grupo sanguíneo A y B, su identificación se lo hace mediante la valoración de la intensidad de reacción.

Por su característica son anticuerpos que se relacionan con reacciones transfusionales o enfermedades hemolíticas, su determinación es oportuna y de gran utilidad, para prevenir alteraciones inmunológicas en el área transfusional.

Los anticuerpos llamados naturales e inmunes del sistema ABO, no sólo tienen importancia en la compatibilidad mayor en una transfusión, sino también en la compatibilidad menor, ya que no es extraña una reacción postransfusional por un alto título de esas aloaglutininas

Existe toda una problemática para definir cuál es el título, de las aglutininas típicas, que se debe considerar peligroso para un receptor

heterólogo. La transfusión heteróloga sólo se debe hacer cuando se tienen títulos bajos, pero no especifica lo que considera un título bajo. La American Association of Blood Banks , recomienda dar sangre O con la mayor parte de su plasma removido o que esté libre de hemolisinas. (*Transfusión Sanguínea, Kelton J.G, Sistema ABO pág.39 – 50*)

TÉCNICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS NATURALES.

- 1.- Rotular tubos de ensayos con: A – B y O
- 2.- Colocar al fondo del tubo 1 gota de células reactivas A1, B y O a cada tubo de manera específica que coincidan en la rotulación respectiva (no introducir el gotero en el tubo analizarse).
- 3.- Colocar 2 gotas de plasma o suero en estudio al fondo del tubo sin el gotero en el tubo analizarse.
- 4.- Mezclar el contenido suavemente
- 4.- Centrifugar (programa P5) 15 segundos a 3000 rpm.
- 5.- Observar reacciones de hemaglutinación mediante movimientos de agitación los tubos de ensayos.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO.

- No se debe utilizar muestras hemolizadas.
- Trabajar a temperatura ambiente.
- Si los resultados de la prueba directa e inversa no coinciden se trata de una discrepancia, esto puede ser por anticuerpos adicionales o faltantes.

REPORTE DE RESULTADOS.

La aglutinación o hemólisis indica que un anticuerpo específico contra el antígeno A o B está presente en el plasma o suero problema y se considera un resultado positivo (+).

Una suspensión uniforme de hematíes después de la Resuspensión es un resultado negativo (-).

Tabla 1 Representación de la prueba inversa ABO

GRUPO	CÉLULAS A1	CÉLULAS B	CÉLULAS O	ANTICUERPO
A	-	+	-	Anti-b
B	+	-	-	Anti-a
AB	-	-	-	Ninguno
O	+	+	-	Anti-a y Anti-b

Fuente: Manual Pruebas Inmunoematológicas – Fernando Jaramillo G.

Nota.- La temperatura óptima para las isoaglutininas es de 4°C, si se observa reacciones débiles o dudosas, debe repetirse la prueba incubando de 2 a 8 °C por 15 minutos.

Materiales:

- Tubos de ensayos 12x75.
- Células A1, B y O.
- Plasma en estudio
- Visor calefactado.

Limitaciones.

- La contaminación del material utilizado puede generar resultados falsos positivos o negativos. *(Jaramillo Fernando, Manual pruebas Inmunoematológicas, Tipificación Inversa)*

Tabla 2 Esquema de la técnica para Anticuerpos Naturales

TUBOS	MUESTRA PLASMA	CÉLULAS REACTIVAS	CENTRIFUGACIÓN (P5)
A	2 Gota	A1 - 1 Gota	3000 rpm x 15 segundos
B	2 Gota	B - 1 Gota	3000 rpm x 15 segundos
O	2 Gota	O - 1 Gota	3000 rpm x 15 segundos
TOTAL DE PRUEBAS 3			

Fuente: Manual Pruebas Inmunohematológicas – Fernando Jaramillo G

2.2.2.4 ANTICUERPOS INMUNES:

La medicina transfusional es una herramienta muy importante en todas las áreas de la medicina. Los concentrados eritrocitario funcionan como un mecanismo auxiliar en el proceso respiratorio de pacientes a quienes una condición patológica les impide elaborar eficientemente sus propias células sanguíneas, o bien, en pacientes con pérdida sanguínea grave en quienes el vital líquido es requerido para recuperar o mantener el equilibrio del cuerpo. No obstante su utilidad, se reconocen efectos nocivos ocasionados por reacciones transfusionales, cuya aparición puede ser inmediata o tardía.

Aparecen después de una estimulación antigénica y suelen ser IgG. Los anticuerpos IgG constituyen alrededor del 73% de las inmunoglobulinas totales. Tienen un peso molecular de sólo 150.000. Por su tamaño, atraviesan con facilidad la placenta y en consecuencia, a menudo se asocian a un cuadro denominado hemolisis fetal. La sobrevivencia de la IgG es de 60 - 70 días.

Los anticuerpos irregulares son los que no están de manera espontánea aunque en el caso de los naturales no se conoce a ciencia cierta qué o cómo se induce su producción.

Los adquiridos se conocen también como inmunes y son el resultado de la exposición a antígenos desconocidos por el individuo al momento de la transfusión o en las mujeres por el embarazo; estos anticuerpos son dirigidos contra antígenos de sistemas diferentes al ABO.

Los anticuerpos naturales regulares son preferentemente inmunoglobulinas M, las cuales fijan de manera tan eficiente el complemento que pueden provocar lisis intravascular y ocasionar insuficiencia renal o incluso la muerte del paciente

Los anticuerpos adquiridos o inmunes son generalmente inmunoglobulinas G, las cuales producen hemólisis extravascular en el bazo o en el hígado mediante fagocitosis del complejo eritrocito más anticuerpo.

Los aloanticuerpos irregulares (adquiridos) más comunes en nuestra población son los que involucran a los sistemas MNSs, P1, Kidd (Jka, Jkb), Duffy (Fya, Fyb), Kell, Lewis y Diego.

De acuerdo con la temperatura óptima de reacción, estos anticuerpos se dividen en anticuerpos fríos y anticuerpos calientes. Los anticuerpos fríos van dirigidos contra los sistemas MN, Lewis y P1, con óptima reacción a temperaturas entre 4 y 22 °C; estos anticuerpos son generalmente inmunoglobulinas tipo M y ocasionalmente tipo G, y debido a esa temperatura de reacción carecen de importancia clínica salvo que su reacción ocurra también a 37 °C, es decir, que actúen como anticuerpos calientes.

Entre estos anticuerpos sólo M y N han sido asociados con enfermedad hemolítica del recién nacido, cuya severidad va de leve a moderada. Los

llamados anticuerpos calientes tienen una temperatura óptima de reacción a 37 °C, a veces visible pero en otras ocasiones sólo evidente hasta agregar antiglobulina humana (suero de Coombs). Estos anticuerpos tienen una relevante importancia clínica ya que se les asocia con reacciones transfusionales de intensidad moderada a severa, que pueden ocasionar la muerte; además, son causantes de enfermedad hemolítica en el recién nacido, quien en ocasiones requiere exsanguinotransfusión.

El laboratorio, funciona como un servicio de apoyo muy importante en la medicina transfusional para la terapéutica, por lo que se ha desarrollado el área de Inmunohematología cuyo valor radica en la identificación de los anticuerpos irregulares derivados de los procesos de inmunización, sean transfusionales, por embarazos o de naturaleza autoinmune. Para un óptimo funcionamiento de esta área del laboratorio es importante conocer las características ya descritas del comportamiento de los anticuerpos, así como otras más: Las reacciones antígeno-anticuerpo pueden observarse in vitro por:

Hemólisis: la unión antígeno-anticuerpo se traduce en lisis de los eritrocitos en presencia del complemento (siempre que el anticoagulante empleado no capture los iones Ca y Mg necesarios para la activación del complemento).

Aglutinación: los anticuerpos que reaccionan en medio salino se conocen como anticuerpos completos o aglutinantes (comúnmente tipo IgM).

Existen diferentes elementos que influyen en la reacción antígeno - anticuerpo y que deben conocerse para utilizarlos adecuadamente en la búsqueda de anticuerpos irregulares

**Aglutinación en medio macromolecular:* hay anticuerpos que se aglutinan mejor cuando se suspenden en una solución de macromoléculas (albúmina, dextrán, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP); aquí la albúmina en concentración de 22 a 30 % incrementa la constante dieléctrica del agua,

lo que disminuye el potencial zeta. Hay evidencia de que el dextrán y el PVP potencializan la reacción con puentes de polímeros

**Prueba de Coombs:* este procedimiento es útil para poner de manifiesto anticuerpos incompletos o sensibilizantes.

**Soluciones de baja fuerza iónica:* reducen la barrera electrostática facilitando la reacción antígeno - anticuerpo.

**Enzimas:* potencializan la reacción antígeno - anticuerpo reduciendo la superficie de carga y removiendo estructuras que interfieren en el acceso de las moléculas del anticuerpo.

**Centrifugación:* acelera la reacción antígeno - anticuerpo, por la fuerza que produce la misma.

**Temperatura:* afecta la reacción antígeno-anticuerpo de acuerdo con la temperatura óptima de reacción: 4 a 22 °C para los fríos, o 37 °C para los calientes.

**Proporción de antígeno y anticuerpo:* es importante en la búsqueda de la zona de equivalencia de la reacción antígeno-anticuerpo.

Es fundamental tener un panel de células (eritrocitos) donde estos importantes fenotipos ya hayan sido tipificados para usarlos en la identificación del anticuerpo correspondiente.

En el Servicio de Medicina Transfusional del Hospital Docente de Riobamba se emplea el panel y multipanel de células para la identificación de anticuerpos irregulares.

La técnica de panel involucra etapas de vital importancia para la lectura de resultados como son:

**Técnica salina:* previamente lavados, los eritrocitos del panel de fenotipo conocido o de la sangre de donación se ponen en contacto con el suero

problema a razón de una gota de células resuspendidas de 2 a 3 % por dos del suero problema. Para iniciar el proceso se centrifugan y se leen; posteriormente se incuban a una temperatura de 22 °C por un tiempo mínimo de media hora a una hora cuando se sospecha una enfermedad por anticuerpos fríos de tipo autoinmune; centrifugar y leer para descartar o confirmar este diagnóstico.

El siguiente paso es incubar a 37 °C por 30 a 60 minutos, empleando el mayor tiempo cuando se sospecha sensibilización por transfusión o embarazos previos. Centrifugar, leer y finalmente lavar los eritrocitos tres veces con solución salina para retirar totalmente las proteínas séricas y al final agregar suero de Coombs; centrifugar y leer.

**Técnica en solución salina de baja fuerza iónica o LISS (low ionic strength-saline):* los eritrocitos previamente lavados y suspendidos en una dilución entre 2 y 3 %, se lavan una vez con dos a tres gotas de solución de LISS, se decantan a sequedad y se agregan dos gotas de LISS más dos gotas del suero problema; homogeneizar y agregar dos gotas más de LISS, incubar por 15 minutos a 37° C, lavar nuevamente tres veces con solución salina y agregar suero de Coombs; centrifugar y leer.

**Técnica enzimática con bromelina (bromelasa):* por el fuerte efecto que tiene esta enzima sobre los eritrocitos, los tiempos de incubación se reducen. El procedimiento es de la siguiente forma: a los eritrocitos lavados se les agrega el suero problema en la proporción ya descrita más una gota de la enzima; se incuban, se centrifugan y se leen. Después se incuban a 37 °C por 15 minutos; se centrifugan y se leen. Para finalizar, se lavan en la forma ya mencionada y se les agrega suero de Coombs; se centrifugan y se leen

**Técnica en albúmina:* en esta técnica se procede de forma parecida a la salina, sólo que se omite el paso de la incubación a 22 °C, respetándose también los tiempos de incubación. Como reactivo adicional se agrega en cada tubo dos gotas de solución albuminosa.

Todas las pruebas se fundamentan en las características mencionadas previamente para las reacciones antígeno-anticuerpo. En cualquier técnica los resultados se deben anotar inmediatamente e interpretar en conjunto al final. (González Jacobo Luna, *Anticuerpos Irregulares*, pág. 17 – 30)

2.2.2.5 TECNICA PARA IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES.

- 1.- Rotular tubos en el que se realiza la prueba 1 - 2 – 3 - Control
- 2.- Colocar 2 gotas del plasma problema en cada tubo.
- 3.- Colocar 1 gota de las células pantallas en el tubo respectivo (1 - 2 y3).
En el tubo control, añada 1 gota de las células del paciente
- 4.- Mezclar los tubos e incube 5 minutos a temperatura ambiente (18 – 25)
- 5.- Centrifugar a 15 segundos por 3000 rpm
- 6.- Leer los resultados sobre una fuente de luz indirecta comprobando si existe aglutinación (+) esto por intensidad o hemólisis.
- 7.- Añada a cada tubo 4 gotas de Dia Liss.
- 8.- Agitar suavemente incube 5 a 10 minutos a 37°C.
- 9.- Lave el contenido con solución salina al 0.9% por tres veces.
- 10.- Coloque 2 gotas de Suero de coombs a cada tubo centrifugue 15 segundos a 3000 rpm
- 11.- Leer los resultados sobre una fuente de luz indirecta comprobando si existe aglutinación (+) esto por intensidad o hemólisis.
- 11.- Compruebe resultados con células control coombs añadiendo 1 gota a cada tubo.

**PARA INVESTIGAR AGLUTININAS FRÍAS*

- a) Identificar tubos con 1 – 2 – 3 y control.
- b) Colocar 2 gotas de plasma en estudio a cada tubo.
- c) Colocar 1 gota de células pantallas al tubo correspondiente
- d) Mezclar suavemente e incubar 30 minutos a 4°C.
- e) Centrifugar 15 segundos a 3000 rpm (programa 5)
- f) Resuspenda cuidadosamente y Leer los resultados sobre una fuente de luz indirecta comprobando si existe aglutinación (+) esto por intensidad o hemólisis.

REPORTE DE RESULTADOS.

Utilizar hojas guías de reporte, la aglutinación se lo valora por la intensidad.

Una reacción negativa (-) indica ausencia de anticuerpos irregulares.

Una reacción positiva (+) indica presencia de anticuerpos.

Una reacción positiva (}) con más de una célula reactiva y autocontrol negativo (-) sugiere la presencia de un aloanticuerpos específico.

Una reacción positiva (+) con todos los hematíes reactivos y un autocontrol positivo (+) puede deberse a un auto anticuerpo.

Si existe un resultado positivo (+) con todas las células y auto control con variación de la intensidad de reacción y más intensa que el auto control, se descarta la muestra por posible presencia de aloanticuerpos subyacente.

Materiales:

- Muestra plasma o suero de usuarios.
- Tubos de ensayos 12x75
- Reactivo antiglobulínico.
- Pantallas de células
- Células control de Coombs
- Visor calefactado.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO.

- El consumo de algunos fármacos suelen dar ensayos positivos.
- Contaminación de los materiales empleados suelen dar falsos positivos o falsos negativos.
- Lavados inadecuados suelen o la presencia de globulinas humanas en el material de vidrio suelen neutralizar el suero antiglobulínico dando a lugar una reacción débil o negativa.
- Una agitación inadecuada en la última fase pueden debilitar las reacciones positivas

	PANTALLAS 1	PANTALLAS 2	PANTALLAS 3	CONTROL
Células Reactivas	1 Gota	1 Gota	1 Gota	1 Gota de sus propios hematíes
Plasma	2 Gotas	2 Gotas	2 Gotas	2 Gotas
Incubar T° Ambiente	5 minutos	5 minutos	5 minutos	5 minutos
Centrifugar	15 seg – 3000rpm			
LISS	4 Gotas	4 Gotas	4 Gotas	4 Gotas
Incubar T° 37	5 – 10 minutos			
Lavar 0.9%	Tres veces	Tres veces	Tres veces	Tres veces
AHG	2 Gotas	2 Gotas	2 Gotas	2 Gotas
C.C.C.	1 Gota Centrifugar 15 seg. 3000rpm			
TOTAL DE PRUEBAS 16				

Tabla 3 Esquema de la Prueba de Pantallas para Ac. Irregulares.

Fuente: Manual Pruebas Inmunoematológicas – Fernando Jaramillo G.

2.2.3 LA PRUEBA DE COOMBS

DEFINICIÓN

La prueba de antiglobulina o prueba de Coombs con el empleo del suero antiglobulina humana poliespecífico, es la técnica más utilizada en inmunohematología.

Los componentes principales del reactivo antiglobulina son los anticuerpos anti-IgG y anti-C3 (C3d/C3dg); la actividad anti-IgA y anti-IgM no es imprescindible pero deseable.

La presencia de estos anticuerpos permite la detección de autoanticuerpos IgM (no aglutinantes) e IgA en la prueba de antiglobulina directa (PAD) para el diagnóstico de la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) que, en ocasiones, por las dificultades en su detección, están involucrados en la etiología de la AHAI "Coombs negativa".

La prueba de Coombs detecta, como mínimo, entre 200 y 500 moléculas de IgG por hematíe. El límite de detección para los anticuerpos de los isotipos IgA e IgM no ha sido determinado, probablemente porque no existe consenso para la estandarización de los reactivos antiglobulínicos con estas especificidades, por su baja frecuencia, o porque para revelar la presencia de estas inmunoglobulinas en los hematíes se prefiere el empleo de métodos más sensibles.

La cuantificación de moléculas de inmunoglobulinas por hematíe se realiza mediante un ELISA para, entre otras aplicaciones, apoyar el diagnóstico inmunohematológico de las AHAI. A partir de las investigaciones realizadas en pacientes con AHAI, determinamos el límite de detección de la PAD (prueba antiglobulinica directa) para los anticuerpos IgA e IgM y comparamos los resultados obtenidos en el ELISA con lo comunicado previamente para los anticuerpos de la clase IgG. Las pruebas de Coombs o llamadas también antiglobulinicas tienen como finalidad el rastreo de los anticuerpos llamados irregulares constituyen una de las prácticas mucho interés en el campo de la Inmunohematología. *(Linares, Jesús. Anticuerpos Irregulares, pág, 78)*

2.2.3.1 SIGNIFICADO DE LA PRUEBA ANTIGLOBULINICA DIRECTA.

Un resultado positivo para anticuerpos irregulares indica que se ha localizado un antígeno y un anticuerpo específico provocando la destrucción de los hematíes, activando el organismo para su defensa una serie de mecanismos como es el caso, de la activación, del sistema de complemento estas pruebas se las hace tanto los donantes de sangre, como los candidatos a recibir sangre.

Así por ejemplo en los donantes tienen la finalidad esta prueba, de detectar anticuerpos irregulares, para prevenir su transferencia al receptor, en los receptores de sangre se le considera como una prueba de transfusionales, complementa, acorta y facilita la prueba cruzada, dándole mayor seguridad a la transfusión.

A las mujeres embarazadas la importancia de esta prueba, se dirigiera para detectar anticuerpos, que pueden causar enfermedad hemolítica del recién nacido, discrepancias en la prueba cruzada para el momento del parto, o en casos de que la paciente requiera de transfusiones.

También es importante esta prueba para facilitar el fundamento de las discrepancias séricas en el sistema ABO.

También es importante el estudio de las reacciones hemolítica transfusionales y para el estudio de las anemias en hemolíticas autoinmunes. *(Linares, Jesús, Inmunohematología y Terapia Transfusional, Cap.10, pág. 178-195).*

2.2.3.2 CLASIFICACIÓN DE LAS PRUEBAS ANTIGLOBULINICAS.

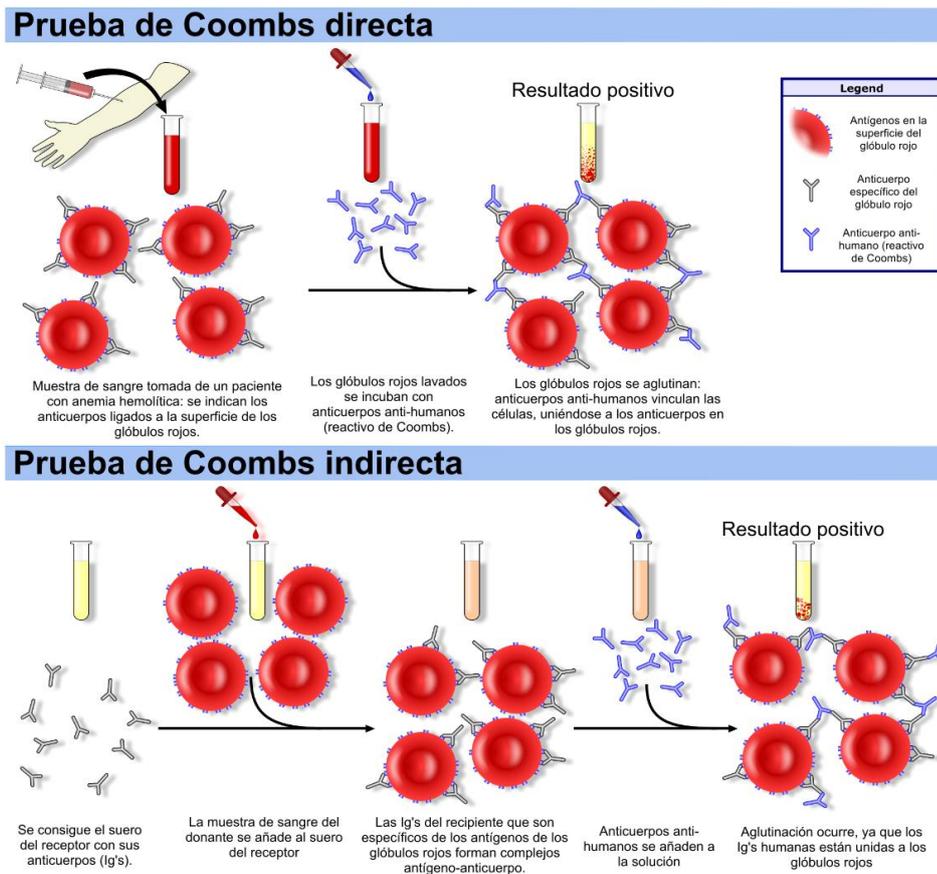
Las pruebas de Coombs se clasifican por la intención del anticuerpo hacia la membrana eritrocitaria o por el paso de anticuerpos por barreras, la clasificación de estas pruebas son: Coombs directo y con indirecto.

La técnica de inmunoglobulina indirecta fue descrita por primera vez en 1945 por Coombs y colaboradores y permite observar aglutinaciones de anticuerpos que normalmente no serían evidenciables en condiciones estándar de laboratorio.

**La técnica de antiglobulina indirecta:* permite detectar los anticuerpos de tipo IgG, que no tienen la capacidad de aglutinar de manera espontánea y

requiere de una fase de revelado para poder evidenciarlos. Se utiliza en el fenotipaje de grupos sanguíneos, en los que los antígenos se encuentran en baja densidad antigénica y donde el anticuerpo utilizado es IgG., Igualmente es aplicable en aquellos casos en los que se buscan anticuerpos de tipo IgG en el suero de una persona.

Ilustración 16. Clasificación de las Pruebas Antiglobulinicas



Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_de_Coombs

En esta prueba se utiliza el suero de Coombs, o reactivo de antiglobulina humana, el cual consiste, en su forma más simple, en una inmunoglobulina dirigida contra la porción Fc de los anticuerpos de tipo IgG. Existen igualmente reactivos que están conformados no solamente

por inmunoglobulinas anti-IgG, sino también por anticuerpos dirigidas contra la molécula C3 del complemento, lo que permite reconocer la presencia de anticuerpos fijadores de complemento. Se han desarrollado asimismo reactivos dirigidos contra fracciones específicas de complemento, como C3b, C3d, C4b y C4d. En este sentido podemos encontrar reactivos de antiglobulina humana policlonales (anti IgG + anti C) o monoespecíficos que contienen solo uno de los anticuerpos en mención. La prueba de Antiglobulina Indirecta cuenta con varias fases, siendo la primera una fase la centrifugación, sin previa incubación en la cual se detectan anticuerpos de tipo IgM como los del sistema ABO, auto-anti-I, anti-M, anti-N, anti-Lewis, etc. Por esta razón cuando se esta utilizando esta técnica, con el objetivo de detectar anticuerpos irregulares en pacientes, las células que se utilizan deberán ser de grupo O para evitar a interferencia del anti A y anti B.

La segunda fase consta en incubar la reacción a una temperatura de 37°C, por un tiempo que estará definido por el tipo de potenciador que utilicemos, como albúmina, LISS, polietilenglicol o enzimas.

En caso de que alguno de estos reactivos sea utilizado, es necesario apegarse a las instrucciones aportadas por el fabricante. Durante la incubación se pretende que ocurra la sensibilización del glóbulo rojo, que permitirá detectar la reacción antígeno-anticuerpo en la fase de revelado.

Una vez terminada esta incubación, se pasa a realizar lavados con el fin de remover inmunoglobulinas u otro tipo de proteínas, que no se unieron al eritrocito y que pueden interferir con la reacción. La fase de los lavados es crítica, ya que la presencia de anticuerpos u otros interferentes en el suero podrían llevar a la neutralización del reactivo. Asimismo, es sumamente importante eliminar el exceso de solución salina al finalizar estos lavados, ya que de lo contrario, el reactivo de antiglobulina es diluido, lo cual puede afectar la sensibilidad de la prueba.

Posterior a los lavados, y de haber eliminado la última gota de solución salina se añade el reactivo de antiglobulina, fase de revelado se centrifuga y se lee la prueba. De haberse dado sensibilización, los

anticuerpos adheridos a la superficie eritrocitaria serán reconocidos por el reactivo de antiglobulina y se podrá observar una reacción de aglutinación.

**La prueba de antiglobulina directa:* se utiliza primordialmente para determinar si los eritrocitos del paciente en análisis están recubiertos por inmunoglobulinas o fracciones de complemento.

Esto puede llegar a presentarse en diferentes condiciones, como por ejemplo, la presencia de aloanticuerpos, producto de una reacción hemolítica tardía o por enfermedad hemolítica del recién nacido o autoanticuerpos en anemias hemolíticas autoinmunes, dirigidos contra antígenos de propios de la superficie eritrocitaria, de anticuerpos dirigidos contra drogas que se adsorben a la membrana del glóbulo rojo o por la activación de complemento en esta superficie.

Por estas razones, la prueba de antiglobulina directa son útiles en el estudio de anemias hemolíticas, y el resultado debe analizarse en el contexto clínico para poder dar un diagnóstico certero.

Normalmente, esta prueba se realiza con el reactivo de Antiglobulina Humana, que tal como se explicó en el procedimiento anterior, usualmente es poliespecífico e incluye anticuerpos dirigidos tanto contra las IgG humanas como contra fracciones del complemento. En caso de obtener una reacción positiva utilizando el reactivo poliespecífico, se procede a repetir la determinación utilizando reactivos monoespecíficos con el fin de identificar la especificidad de las proteínas involucradas en la reacción.

Dado que es posible que exista fijación de complemento in vitro en muestras no anticoaguladas, se prefiere realizar esta prueba en muestras con EDTA. De lo contrario, se puede obtener un resultado positivo debido a la activación del complemento, durante la coagulación. (*Linares, Jesús, Inmunohematología y Terapia transfusional, Cap. 13, pág. 270-282*)

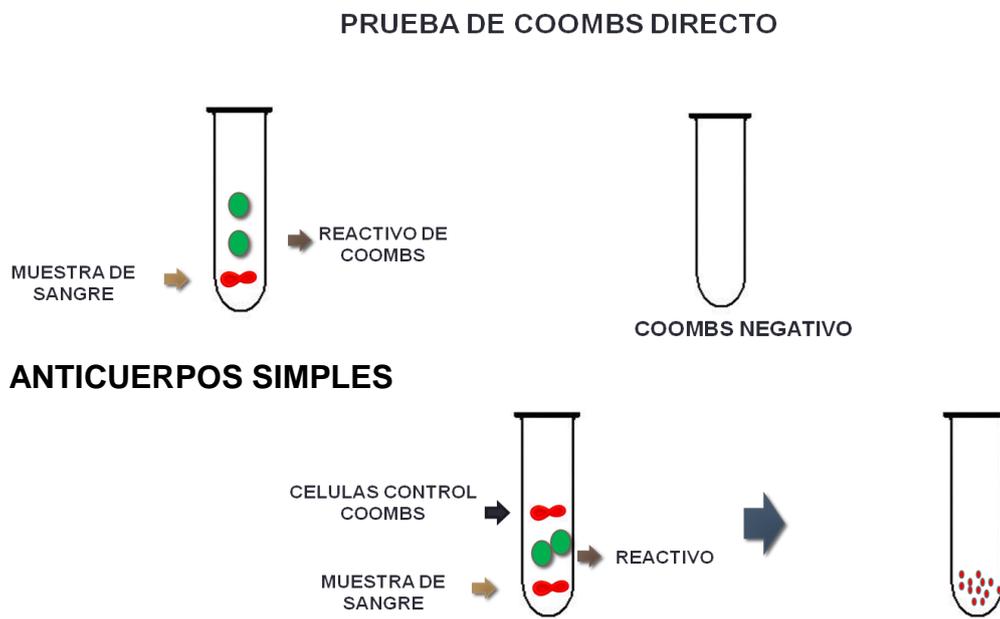
2.2.3.3 SIGNIFICADO DE LA PRUEBA ANTIGLOBULINICA DIRECTA POSITIVA.

- Mujeres embarazadas: EHRN

- Mujeres embarazadas: Transfusiones.
- Discrepancias séricas de grupos ABO.
- Estudio de reacciones transfusionales.
- Estudio de anemias hemolíticas autoinmunes.

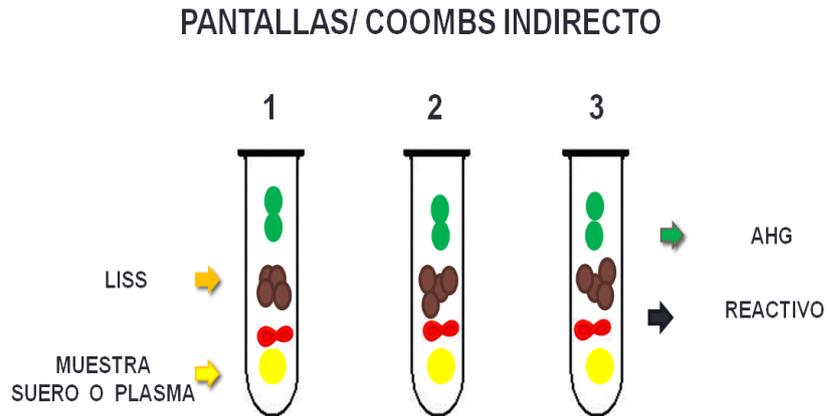
2.2.3.4 PRINCIPIO DE LA TECNICA

Ilustración 17 Esquema de la pruebas de Coombs Directo



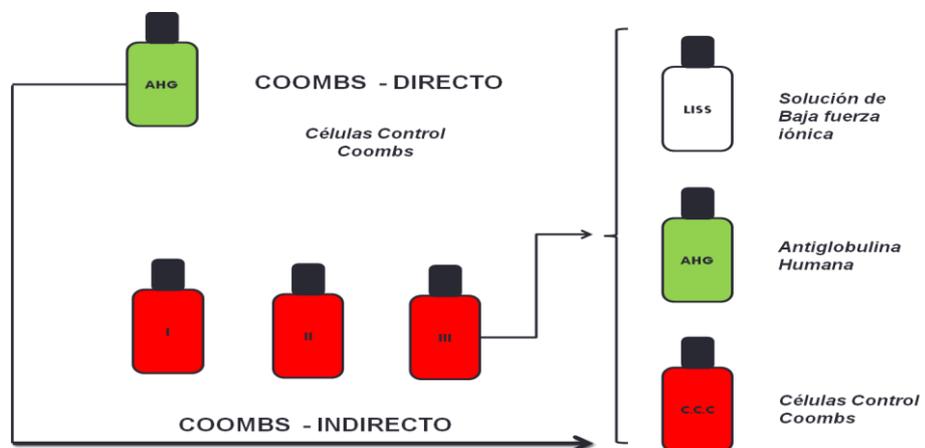
Fuente: Manual Pruebas Inmunohematológicas – Fernando Jaramillo G.

Ilustración 18. Esquema coombs indirecto



Fuente: Manual Pruebas Inmunohematológicas – Fernando Jaramillo G.

Ilustración 19. Reactivos para pruebas de coombs



Fuente: Manual Pruebas Inmunohematológicas – Fernando Jaramillo G.

2.2.3.5 ANTICUERPOS MÚLTIPLES

Cuando un suero contiene dos o más anticuerpos su identificación puede complicarse y esto se caracteriza por:

- No definir la presencia de un determinado anticuerpo
- Todas las células del panel o la mayoría son amotinadas.
- La intensidad de las reacciones con las diferentes células son variables y esta variación no es aplicable al efecto de dosis.

Puede haber variaciones en el grado de motivación por anticuerpos múltiples o por anticuerpos contra antígenos de alta frecuencia.

2.2.3.6 AUTOCONTROL

La presencia de un autocontrol positivo afecta la interpretación de otras pruebas y puede afectar igualmente el manejo clínico del paciente, las posibilidades son:

- Presencia de auto anticuerpos fríos o calientes.
- Presencia de halo anticuerpos.
- Presencia de halo anticuerpos dirigidos contra drogas.
- A lo anticuerpos dirigidos contra algunas sustancias presentes en el sistema ejemplo a la albúmina bovina.
- A lo anticuerpos maternos presentes en el recién nacido relacionadas con las células de este.

2.2.3.7 CÉLULAS DE CONTROL COOMBS.

Las células rojas reactivas son suspendidas en un medio conservante especial. Estos reactivos cumplen con los requisitos de las normas y directrices correspondientes, las características del funcionamiento se mencionan en los documentos de venta, que son entregados junto con el producto a solicitud.

El principio del análisis es la técnica de aglutinación, que se basa en la reacción de los antígenos/anticuerpos., resulta esencial obtener resultados fiables del test de antiglobulina (in)directo en la serología de grupos sanguíneos. Como resultado de procedimientos de lavado deficientes, las proteínas de suero (IgG) todavía presentes pueden neutralizar el suero de antiglobulina y, por consiguiente, inhibir la

aglutinación. Para detectar esto y otras causas de reactivos de antiglobulina neutralizados, deben añadirse Coombs Control Cells a todos los tubos de ensayo que presenten un resultado negativo.

Las Coombs Control Cells son preparadas de acuerdo con un procedimiento óptimo desarrollado por Sanguíneo, las Coombs Control Cells y las Coombs Control Cells strong son células rojas humanas sensibilizadas con IgG Grupo O Rhesus D-positivo, que han sido sensibilizadas in vitro con diferentes cantidades de anticuerpos anti-D (IgG). Las Coombs Control Cells strong han sido preparadas para producir una fuerte aglutinación en la presencia de reactivos activos de antiglobulina. Las Coombs Control Cells han sido preparadas para producir una aglutinación menos fuerte en la presencia de reactivos activos de antiglobulina. Las Coombs Control Cells moderadamente sensibilizadas con IgG muestran una indicación más sensible y fiable de la neutralización (parcial) de los reactivos de antiglobulina. Las Coombs Control Cells son lavadas y re suspendidas en un medio conservante especial y pueden ser añadidas directamente a los tubos de ensayo.

2.2.4 ANEMIAS HEMOLITICAS INMUNES

2.2.4.1 ANEMIA HEMOLITICA INMUNE

Los glóbulos rojos sobreviven en circulación bajo condiciones normales alrededor de 100 a 120 días diariamente el 1% de esta masa roja es destruida y reemplazada por nuevas células provenientes de la médula ósea. Un estado hemolítico se presenta cuando la sobrevivencia y in vivo de los glóbulos rojos está acorta, sin embargo bebida que la médula ósea puede incrementar su actividad eritroide entre seis a ocho veces, la anemia no se presenta sino hasta cuando la destrucción sobrepasa su capacidad compensatoria.

2.2.4.2 ANEMIA HEMOLITICA AUTOINMUNE

Las AHAI (anemias hemolíticas autoinmunes) son adquiridas, causadas por mecanismos inmunes, ya que la destrucción está mediada por una reacción antígeno-anticuerpo. En primer término, las manifestaciones clínicas son consecuencia del padecimiento base, ya que en la mayoría de los casos la anemia hemolítica es secundaria; en segundo término, son consecuencia de la hemólisis y del síndrome anémico.

Considerando la velocidad de instalación, en la hemólisis aguda podemos encontrar fiebre, ictericia, taquicardia, palpitations, fatiga, disnea y lipotimia. En la hemólisis crónica la sintomatología puede ser tan leve que pase inadvertida para el paciente, pero podemos encontrar como datos sobresalientes ictericia leve y esplenomegalia cuando el mecanismo es hemólisis extravascular.

Los mecanismos fisiopatológicos de la destrucción en sí son diferentes dependiendo del anticuerpo o inmunoglobulina implicada, que puede ser IgG o IgM, causando hemólisis, extra o intravascular, respectivamente.

El reconocimiento de las formas más comunes de AHAI se dio gracias al desarrollo de la prueba de Coombs en 1945.³ En la AHAI el paciente produce anticuerpos (autoanticuerpos o aloanticuerpos) dirigidos contra antígenos eritrocitarios; cuando el anticuerpo se une a su respectivo antígeno se forma un complejo inmune y se desencadena la cascada del complemento.

El complemento se activa hasta C9 o C3 dependiendo de la clase de anticuerpo involucrado, por lo que la hemólisis puede ser intravascular dando como resultado la liberación de hemoglobina en el torrente circulatorio, o extravascular, por atrapamiento de los eritrocitos en el sistema reticuloendotelial.

Como consecuencia de daño parcial a los eritrocitos pueden encontrarse esferocitos circulantes. ⁴ En la figura 1 se ilustra el camino seguido por la hemoglobina liberada en uno y otro caso, que ayudará a explicarnos las pruebas de laboratorio que deben seleccionarse para apoyar el diagnóstico de hemólisis.

En las AHAI los anticuerpos que se producen van dirigidos generalmente contra todo un sistema de antígenos eritrocitarios y reaccionan a diferentes temperaturas, por lo que se clasifican en anemia hemolítica por anticuerpos calientes, por anticuerpos fríos y por anticuerpos bifásicos.

2.2.4.2.1 ANEMIA HEMOLITICA POR ANTICUERPOS CALIENTES.

Es más frecuente en mujeres y en la tercera y cuarta décadas de la vida; entre otros padecimientos se asocia a lupus eritematoso sistémico y a leucemia linfocítica crónica. El curso puede ser agudo o crónico, con remisiones y exacerbaciones; el paciente produce anticuerpos clase IgG, sensibiliza al eritrocito a 37 °C, puede activar la cascada del complemento hasta C3, lo que coadyuva a la opsonización y a la fagocitosis por los macrófagos. La subclase de la inmunoglobulina producida con más frecuencia es IgG1, aunque también puede encontrarse IgG3, con mayor capacidad de activar el complemento; si esto sucede podemos encontrar hemólisis extravascular con un pequeño componente intravascular. Cuando se produce IgG4 la destrucción puede estar ausente o ser mínima.⁶ La especificidad del anticuerpo se dirige contra todo el sistema Rh; hay que tener claro que ninguna sangre va a ser compatible ya que tanto la sangre Rho(D) positiva como la Rho(D) negativa poseen los otros antígenos del sistema Rh-Hr, como el c, C, e, E en diferentes combinaciones (*Campal Faustino, Inmunología Aplicaciones prácticas, Cap. 9 pág. 95 -110*)

2.2.4.2.2 ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE POR ANTICUERPOS FRIOS.

Se llama también síndrome de aglutininas frías y se producen anticuerpos contra los propios eritrocitos. Es menos frecuente que la anterior, con un pico de incidencia en pacientes ancianos; se asocia a infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*, mononucleosis infecciosa y linfoma; la hemólisis suele ser crónica y se agrava con la exposición al frío; puede observarse ictericia, esplenomegalia y acrocianosis.

Las inmunoglobulinas involucradas son de clase IgM que actúan con mayor eficiencia entre los 4 y 30 °C; la especificidad más frecuente es

contra el sistema I o HI; se distinguen de los anticuerpos fríos naturales irregulares (que son inocuos) porque en esta entidad el anticuerpo aunque reacciona mejor en frío, presenta un mayor rango térmico y el título suele ser muy elevado.⁶ La hemólisis que se produce en estos casos es intravascular, ya que la IgM es eficiente en la activación de la cascada del complemento hasta C9.

En las pruebas de laboratorio encontramos hemoglobina libre en orina, hemosiderinuria, deshidrogenasa láctica y velocidad de sedimentación elevadas; la bilirrubina indirecta puede ser normal o ligeramente elevada; las haptoglobinas están disminuidas o ausentes; en el frotis podemos encontrar esquistocitos, esferocitos y formación de pilas de monedas; la prueba de Coombs puede ser positiva, sobre todo si se usa reactivo que contenga anti-C3b. (*Moyado, H. Rodriguez, El Banco de Sangre y la Medicina Transfusional, Cap.8, pág. 95 – 108*)

2.2.4.2.3 ANEMIA HEMOLÍTICA POR ANTICUERPOS BIFÁSICOS.

En esta entidad los anticuerpos producidos se unen al eritrocito en frío y lo hemoliza a 37 °C.

Esta característica es importante para demostrarlos en el laboratorio; se trata de los anticuerpos denominados de Donath-Landsteiner, la anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos bifásicos es la menos frecuente (2 %) y suele presentarse en niños después de infecciones virales; su curso clínico es tórpido y la destrucción de eritrocitos es intravascular aguda.

La especificidad de los anticuerpos está dirigida contra el sistema P, el hallazgo de anemia hemolítica autoinmune con prueba de Coombs negativa ocurre por diferentes causas: cuando el número de anticuerpos unidos a cada eritrocito es menor de 200 moléculas, cuando el anticuerpo tiene una baja afinidad por el antígeno y se disocia con facilidad del eritrocito, cuando el anticuerpo IgM o IgA no es detectado por los reactivos de Coombs usados rutinariamente (que contienen anti-IgG y anti- C3b) y cuando los pacientes tienen deprimida la expresión de algunos antígenos. (*Kelton, J.G. Transfusión Sanguínea, Cap.11 Hemolisis inmune, pág. 111 – 128*)

2.2.4.3 ANEMIA HEMOLÍTICA ADQUIRIDA POR DROGAS.

Algunos autores consideran que en este grupo no todos los casos pueden aceptarse como autoinmunes por el mecanismo de producción, sin embargo, se estudian conjuntamente con las anemias hemolíticas autoinmunes.

Existen tres mecanismos en las anemias hemolíticas adquiridas por drogas y en cada uno se han descrito drogas prototipo; es fundamental entender los mecanismos para poder estudiarlas adecuadamente en el laboratorio por:

***Complejos inmunes:** el paciente produce un anticuerpo contra la droga, en un segundo momento el anticuerpo se une a la droga (formación del complejo inmune), en un tercer momento este complejo inmune se une al eritrocito condicionando su hemólisis.

La droga prototipo es la quinolona, pero hay otras que pueden causar hemólisis por este mecanismo, la hemólisis es intravascular, puede acompañarse de falla renal, las clases de anticuerpos involucrados son IgM e IgG, que activan el complemento hasta C9.

***Adsorción de droga o tipo hapteno:** la droga se une firmemente al eritrocito, el paciente produce un anticuerpo dirigido a la droga, lo que causa la hemólisis; la droga prototipo es la penicilina. La hemólisis se induce en algunos pacientes cuando se les administran dosis importantes; la hemólisis que se presenta es extravascular. Cuando se suspende la droga mejora la supervivencia del eritrocito, pero la hemólisis puede persistir en menor grado algunas semanas, cefalosporina también puede causar hemólisis por este mecanismo, aunque existen casos en que puede presentarse prueba de Coombs directo positivo sin cuadro de hemólisis

***Tipo autoanticuerpos:** ésta es la que realmente podría considerarse autoinmune ya que por un mecanismo aun no bien comprendido, el paciente produce un anticuerpo dirigido contra antígenos eritrocitarios propios, pero no es necesaria la presencia de la droga para que se demuestre la hemólisis.

Los anticuerpos que se producen son indistinguibles de los producidos en la anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes. Generalmente cuando se interrumpe el uso de la droga disminuye la hemólisis, cediendo completamente en un tiempo breve; si se administra nuevamente se reinicia el cuadro hemolítico. La droga prototipo es la alfametildopa y los anticuerpos son clase IgG, con especificidad antisistema Rh. (*Pérez Javier, Guía de laboratorio para servicios de hematologías y Hemoterapia, Anemias*).

2.2.4.4 PREPARACION DE LAS CELULAS CONTROL COOMBS.

Los reactivos antiglobulínicos (AHG) deben usarse de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los resultados falsos negativos suelen deberse al lavado incorrecto de los glóbulos rojos y neutralización de la AHG por parte de la solución salina remanente. Para evitar este problema se agregan eritrocitos recubiertos con IgG a las prueba negativas, se mezclan y centrifugan. Debe observarse aglutinación de 2+ que confirma que el estudio es negativo. Si no se produce aglutinación, la AHG se neutralizó y los hallazgos no son confiables. En consecuencia es necesario repetir la prueba.

TECNICA

Material

- Tubos de 75 x 12 ml
- Glóbulos rojos de grupo O Rh Positivo
- Reactivo anti – D
- Solución salina
- Reactivo antiglobulina
- Pipetas Pasteur
- Frasco con gotero
- Etiqueta
- Serófuga
- Baño maría

Método

- Realizar un pool de glóbulos rojos O Rh Positivo
- Colocar 0,2 – 0,5 ml de sedimento de glóbulos

- Lavar los glóbulos tres veces en solución salina extrayendo la solución salina con la Pipeta Pasteur
- Agregar un volumen igual de Anti – D a los glóbulos rojos sedimentados
- Incubar a 37° C durante 30 minutos
- Lavar los glóbulos rojos cuatro veces
- Realizar una suspensión al 5% con solución salina
- Rotular el frasco y colocar la suspensión
- Para comprobar el procedimiento agregue dos volúmenes de AHG a 1 volumen de la suspensión al 5%, mezclar y centrifugar, la reacción debe ser de 3+. Si es demasiado potente o demasiado débil, los glóbulos rojos no son apropiados para controlar la prueba de antiglobulina

Los glóbulos rojos sensibilizados pueden conservarse en suspensión a 4° C durante 48 horas.

2.2.4.4.1 TÉCNICA PARA LA APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS CONTROL DE COOMBS.

Procedimiento de análisis

1. Añadir 1 gota de células Coombs Control Cells a los tubos de ensayo que contengan un test de antiglobulina sin aglutinación visible, y mezclar bien.
2. Centrifugar durante 20 segundos a 1000 fcr o durante el tiempo apropiado de calibración de la centrífuga.
3. Re suspender las células agitando suavemente y examinar macroscópicamente la aglutinación; ahora la reacción tendría que ser positiva. Interpretación.

Una reacción positiva (es decir, aglutinación) después de añadir las células Coombs Control Cells indica que el procedimiento de lavado se ha efectuado correctamente y que el reactivo de antiglobulina funcionaba correctamente.

Una reacción negativa (es decir, aglutinación no visible) indica que el reactivo de antiglobulina no funcionaba correctamente. Un resultado negativo no es fiable; resulta preciso repetir el test. Se debe investigar la causa del problema y proceder a su corrección. (*Manual de pruebas Inmunohematológicas, Jaramillo Fernando, Cap. Técnicas, pág.75*)

2.2.4.5 PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS FRENTE A UNA REACCIÓN TRANSFUSIONAL

Anemia Hemolítica Aguda de Origen Inmune: Es una reacción inmune en la cual se produce la destrucción de los glóbulos rojos en el espacio intra o extra vascular, producida por la interacción de los anticuerpos del paciente con los antígenos (glóbulos rojos) del donante, pudiendo iniciar una secuencia de respuestas neuroendócrinas que van desde leves hasta severas. La destrucción intravascular es dramática, con sintomatología como: fiebre, escalofrío, hipotensión, náusea, vómito, dolor precordial y choque. La causa principal es por incompatibilidad ABO. En la destrucción extravascular están involucrados otros grupos sanguíneos diferentes al ABO, como el Rh, es más lenta y menos dramática que la anterior. Se presenta en las 24 horas de iniciada la transfusión. La hemólisis intravascular es más común que la extravascular.

Tratamiento:

- Suspender inmediatamente la transfusión y mantener la vía permeable.
- Administrar solución salina al 0,9% para hidratación, 1000 cc IV en las primeras 1 a 2 horas.
- Balance hídrico para evitar sobrehidratación.
- Monitoreo cardíaco, mantener la presión sistólica mayor a 100 mmHg.
- Monitoreo de la función renal, mantener la diuresis mayor a 100ml/hora o 1 a 1,5 ml/kg/h.
- Administrar 20 a 80 mg de furosemida IV y manitol si es necesario.

- Si se produce hipotensión, administrar dopamina 2g/kg/min. En situaciones de choque, 1 a 10 g/kg/min (5 ampollas en 500 cc de solución glucosada al 5% y administrar a 8 gotas por minuto).
- Si se produce coagulación intravascular diseminada, administrar plaquetas, crioprecipitados, plasma y considerar terapia con heparina.
- Solicitar hemograma completo con conteo plaquetario, determinación de TP, TTP, fibrinógeno, úrea, creatinina y pruebas hepáticas.
- Considerar la exanguinotransfusión.
- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servicio de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.

Anemia Hemolítica Tardía de Origen Inmune: Es aquella que se presenta luego de 24 horas de administrada una transfusión; la mayoría se presentan dentro de las dos semanas. La hemólisis es extravascular principalmente. Son menos severas que las hemolíticas agudas.

Algunos pacientes presentan únicamente anemia inesperada, pero otra sintomatología puede ser: fiebre o escalofrío, ictericia, dolor y disnea.

Datos de laboratorio que apoyan el diagnóstico son: anemia, deshidrogenasa láctica elevada, hiperbilirrubinemia, disminución de la haptoglobina, leucocitosis y la presencia de un nuevo anticuerpo irregular así como una prueba de Coombs directo positivo.

Tratamiento:

- Casi nunca se requiere tratamiento específico, pero es prudente controlar la diuresis y función renal y evaluar posibles alteraciones de la coagulación.
- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servicio de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.

Contaminación Bacteriana: De presentación dramática, y por lo general aparece la sintomatología casi inmediatamente después de iniciada la transfusión.

La sintomatología más frecuente es la presencia de fiebre, escalofrío, náusea y vómito; menos frecuente disnea y diarrea. La presencia de fiebre alta o hipotensión poco tiempo después de iniciada la transfusión, son las claves diagnósticas para determinar que una unidad contaminada está siendo administrada.

Las complicaciones clínicas usualmente son choque, falla renal, coagulación intravascular diseminada y muerte.

Diagnóstico diferencial:

Reacción febril no hemolítica, edema agudo no cardiogénico, sepsis no relacionada a la transfusión.

Tratamiento:

- Suspender la transfusión y mantener la vía permeable.
- Recuperar la bolsa involucrada, el equipo de infusión y las bolsas de hemocomponentes que se administraron y enviarlos a cultivo.
- Iniciar el tratamiento con antibiótico aún antes de identificar el germen causante: beta lactámicos y aminoglucósidos. Si están involucrados los con centrados de glóbulos rojos, se recomienda cubrir para pseudomonas.
- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servicio de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.

Edema Pulmonar no Cardiogénico (TRALI): Se le atribuye a la presencia de anticuerpos en el plasma de los componentes transfundidos que actúan directamente contra el HLA de los leucocitos del receptor.

Usualmente se presenta durante la transfusión y su sintomatología incluye: disnea, taquicardia, fiebre, hipotensión y cianosis. La fiebre y la hipotensión cuando están presentes generalmente son moderadas y responden rápidamente a los antipiréticos y fluidos. A los RX hay silueta cardiaca conservada con edema pulmonar.

Tratamiento:

- Suspender inmediatamente la transfusión y mantener la vía permeable.
- Dar tratamiento de soporte: oxígeno.
- Pacientes severamente afectados, traslado a Unidad de Cuidados Intensivos, respiración mecánica.
- Los diuréticos están contraindicados por ausencia de signos de sobrecarga circulatoria.
- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servido de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.

Reacción Anafiláctica: Reacciones anafilácticas o anafilactoideas se presentan con manifestaciones de inestabilidad cardiovascular, incluyendo hipotensión, taquicardia, pérdida de conocimiento, arritmia cardíaca y choque.

Compromiso respiratorio con disnea y estridor son más pronunciados cuando se trata de una reacción alérgica típica.

Diagnóstico diferencial:

Se deben descartar el edema pulmonar agudo no cardiogénico (TRALI), sobrecarga circulatoria, reacción hemolítica y contaminación bacteriana.

Tratamiento:

- Suspender inmediatamente la transfusión y mantener la vía permeable.
- Mantener vías aéreas permeables, monitoreo cardíaco, ventilación mecánica, intubación, oxígeno.
- Colocar al paciente en posición Trendelenburg.
- De ser necesario administrar adrenalina 1:1000, 0,4 ml subcutáneo y si no revierte el cuadro, adrenalina 0,5 ml en 10 cc de solución salina intravenosa cada 5 minutos hasta que revierta el cuadro.
- Broncodilatadores (aminofilina) 480 mg intravenosos en 30 minutos.
- Administrar corticoides (hidrocortisona) 500 mg IV.

- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servicio de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.

Sobrecarga Circulatoria: Las transfusiones podrían provocar edema pulmonar agudo por sobrecarga de volumen. El riesgo de sobrecarga es mayor en niños pequeños y en ancianos, especialmente en los pacientes añosos sometidos a intervenciones ortopédicas; de igual manera pacientes con compromiso cardíaco o pulmonar y anemia crónica, que no toleran el incremento rápido de la volemia. La sintomatología principal es: disnea, cianosis, ortopnea, cefalea intensa, hipertensión o insuficiencia cardíaca congestiva durante o poco tiempo después de la transfusión.

Tratamiento:

- Disminuir el goteo de la transfusión.
- Administrar furosemida 40 mg IV.
- Colocar al paciente en posición semisentado.
- Administrar oxígeno.
- Considerar flebotomía terapéutica.
- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servicio de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.

Reacción Febril no Hemolítica: Se define como la elevación de la temperatura en un grado o más. La fiebre puede acompañarse de escalofrío. La sintomatología generalmente se presenta durante la transfusión, pero puede aparecer hasta luego de una hora de finalizado el procedimiento. En neonatos la presentación puede ser atípica.

El diagnóstico diferencial se debe hacer con: reacciones hemolíticas, contaminación bacteriana, edema agudo no Cardiogénico.

Tratamiento:

- Interrumpir la transfusión y mantener la vía permeable.
- Descartar una reacción transfusional hemolítica o contaminación bacteriana del componente.

- La fiebre de la reacción febril no hemolítica es autolimitante y se resuelve en 2 a 3 horas, por lo que el uso de antipiréticos queda a criterio médico.
- Antipiréticos tipo acetaminofen 325 a 500 mg.
- Si ocurrieron más de 2 reacciones, administrar hemocomponentes leucoreducidos.
- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servicio de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.

Reacción Alérgica Urticariante: Las reacciones alérgicas leves son comunes y se presentan en el 2% de las transfusiones, son comunes con todos los componentes y están asociadas a las proteínas del plasma.

La sintomatología incluye, prurito, urticaria, eritema y enrojecimiento cutáneo. En edema laríngeo con compromiso de las vías aéreas respiratorias altas hay presencia de ronquera, estridor y sensación de presencia de cuerpo extraño.

Cuando hay compromiso de las vías respiratorias bajas, pueden presentarse sibilancias, compresión del pecho, dolor subesternal, disnea, ansiedad o cianosis; además de sintomatología gastrointestinal como náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea.

Tratamiento:

- Interrumpir la transfusión y mantener la vía permeable.
- Si hay compromiso de vías respiratorias, valorada necesidad de intubación.
- Si hay disnea evidente administrar oxígeno.
- Reacciones alérgicas leves usualmente responden a antihistamínicos intravenosos de preferencia difenhidramina, 50 a 100mg.
- Una vez cedidos los síntomas, reiniciar la transfusión.
- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servicio de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.

Procedimiento general frente a una Reacción Transfusional:

- Toda reacción a una transfusión debe ser documentada.
- Inmediatamente después de producida la reacción envíe al servicio de transfusión o banco de sangre:
 - a) Muestras de sangre extraídas inmediatamente después de la transfusión
 - b) 5 cc de sangre en tubo sin anticoagulante (tapa roja).
 - c) 5 cc de sangre en tubo con anticoagulante (tapa lila).
- La unidad de sangre o hemocomponente y el equipo de transfusión con residuos de eritrocitos o plasmas de la sangre transfundida del donante.
- Enviar al laboratorio la primera muestra de orina después de la reacción, para investigación de hemoglobinuria.
- Si se sospecha de choque séptico causado por una unidad de sangre contaminada, tome una muestra de sangre en frasco especial para hemocultivo.
- Reportar en la historia clínica y en la Ficha de Notificación de las reacciones transfusionales: Anexo 4, para ser enviado al Servicio de Transfusión o al Banco de Sangre que despachó la unidad.
- Documente en la historia clínica lo siguiente:
 - a) El tipo de reacción transfusional.
 - b) El período de tiempo entre el inicio de la transfusión y la aparición de la reacción.
 - c) El volumen y el tipo de los hemocomponentes sanguíneos transfundidos.
 - d) El número único (código) de donación de todos los hemocomponentes transfundidos.
- Después de la investigación inicial de la reacción transfusional envíe al banco de sangre para estudios de laboratorio lo siguiente:
- Muestras de sangre extraídas a las 12 y 24 horas después del comienzo de la reacción:
 - a) 5 cc de sangre en tubo sin anticoagulante (tapa roja).

- b) 5 cc de sangre en tubo con anticoagulante (tapa lila).
- c) Toda la orina producida al menos 24 horas después de presentada la reacción.
- d) Comunicar de manera inmediata al médico responsable de la transfusión acerca de los resultados obtenidos. (*Ministerio de Salud Pública, Cap.8. pág. 48 – 52*)

2.3 DEFINICIÓN DE TERMINOS BÁSICOS

AGLUTINACIÓN.- Proceso por el cual los glóbulos rojos se unen y ligan entre sí.

ANTICUERPO.- Proteína protectora producida por la respuesta inmune de un individuo estimulado por una sustancia extraña generalmente proteica. Actúa en la defensa contra los patógenos, a menudo por neutralización o identificación de un agente que debe ser eliminado.

ANTICUERPO NATURAL.- Anticuerpo que aparece en el torrente sanguíneo en ausencia de estimulación antigénica conocida.

Antígeno.- Cualquier sustancia reconocida por el organismo como extraña, que estimula una respuesta inmune.

ALOINMUNIZACIÓN: Es la generación de aloanticuerpos (anticuerpos irregulares o isoanticuerpos) contra antígenos de la misma especie, generalmente de las células sanguíneas como consecuencia de una transfusión o embarazo anterior.

BOLSA DE SANGRE PEDIÁTRICA: Se obtiene en equipos especiales con 4 u 8 bolsas satélites en circuito cerrado que permiten obtener de 4 a 8 alícuotas de sangre provenientes de un mismo donante con un período de vida útil similar al de la bolsa madre. Para esto se requiere mantener el circuito cerrado mediante un sistema de conector estéril.

CONCENTRADO DE GLÓBULOS ROJOS: Es aquel componente sanguíneo obtenido de la centrifugación de la sangre total una vez que se separa la mayor parte del plasma.

COMPONENTES PLASMÁTICOS: Son todos aquellos componentes sanguíneos carentes de glóbulos rojos.

CÉLULA SENSIBILIZADA.- Célula recubierta de anticuerpos, pero no aglutinada.

CONSENTIMIENTO INFORMADO: Es el documento firmado por el paciente o su representante, por el cual se otorga autorización al procedimiento invasivo de transfusión de sangre o hemocomponentes que se pretende realizar, luego de una explicación y de asegurarse que ha sido comprendida.

EXANGUINOTRANSFUSIÓN: Es el procedimiento por el cual se sustituye la sangre de un paciente por sangre homóloga, intercambiándose pequeños volúmenes sucesivamente con fines terapéuticos.

ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO.- Cuadro en el cual los anticuerpos maternos cruzan la placenta y atacaban a los eritrocitos fetales que poseen los antígenos correspondientes.

HEMOCOMPONENTES LEUCOREDUCIDOS O LEUCODEPLETADOS: Son aquellos hemocomponentes de la sangre, en que por procedimientos especiales (sistema óptico o filtración) se ha reducido la cantidad de leucocitos.

HEMOLISINA.- Anticuerpo que se combina con el complemento y destruye (hemoliza) los glóbulos rojos portadores del antígeno correspondiente.

HEMÓLISIS.- Destrucción (lisis) de la membrana eritrocitaria que libera el contenido: hem y globina. Resulta de la reacción entre un anticuerpo

INCOMPATIBILIDAD SANGUÍNEA: Es determinada por la presencia de uno o más anticuerpos en el suero del receptor dirigidos contra antígenos eritrocitarios de la sangre a transfundir o transfundida (incompatibilidad mayor). Ocurre también cuando los antígenos del receptor reaccionan contra los anticuerpos presentes en el plasma a transfundir (incompatibilidad menor).

PRUEBAS PRETRANFUSIONALES O DE COMPATIBILIDAD: Son aquellas pruebas requeridas con el fin de garantizar la compatibilidad entre el donante de sangre y el receptor de una transfusión. Dentro de éstas están: tipificación directa e inversa ABO, tipificación RhD, rastreo de

anticuerpos irregulares, prueba de antiglobulina humana directa (coombs directo) y prueba cruzada mayor.

RECIÉN NACIDO DE BAJO PESO Y MUY BAJO PESO: Recién nacidos de bajo peso son aquellos que pesan menos de 1500 g, Y muy bajo peso aquellos que pesan menos de 1000 g.

TRANSFUSIÓN ABO COMPATIBLE: Se define como transfusión ABO compatible cuando el receptor de un componente recibe la sangre de un grupo igualo diferente al suyo pero compatible, sin ocasionar ningún riesgo. Por ejemplo:

RECEPTOR GRUPO A: puede recibir concentrado de glóbulos rojos O, componentes plasmáticos AB, y los de su propio grupo sanguíneo.

RECEPTOR GRUPO B: puede recibir concentrado de glóbulos rojos B, componentes plasmáticos AB, y los de su propio grupo sanguíneo.

RECEPTOR GRUPO AB: puede recibir concentrado de glóbulos rojos A, B, O Y componentes plasmáticos sólo de su grupo AB.

RECEPTOR GRUPO O: sólo podrá recibir concentrado de glóbulos rojos grupo O, y componentes plasmáticos A, B, AB Y los de su mismo grupo.

TRANSFUSIÓN INTRAUTERINA: Es la transfusión realizada al feto antes de su nacimiento.

TRANSFUSIÓN ISOGRUPO: Se define "isogrupo" cuando los componentes sanguíneos seleccionados pertenecen al mismo grupo sanguíneo. Por ejemplo concentrado de glóbulos rojos A, destinado para un paciente de grupo A; concentrado de plaquetas O, para un paciente de grupo O.

TRANSFUSIÓN MASIVA: Se define como el reemplazo del volumen sanguíneo total del paciente por sangre homóloga, en menos de 24 horas.

2.4 HIPOTESIS Y VARIABLES

2.4.1 HIPOTESIS: Se puede validar a las pruebas antiglobulínicas mediante la preparación y empleo de las células control coombs caseras.

2.4.2 VARIABLES

2.4.2.1 VARIABLE INDEPENDIENTE

Preparación y utilización de las células control Coombs caseras.

2.4.2.2 VARIABLE DEPENDIENTE

Validación de las pruebas antiglobulínicas.

2.5 OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE	CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADORES	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
Preparación y utilización de las células control coombs caseras.	Son células con carga antigénica y de antiglobulina para estimular la reactividad en los ensayos de coombs con resultados negativos.	Células reactivas de control	Intensidad de reacción	<p>TÉCNICA</p> <p>Para la preparación de las células de control Coombs.</p> <p>INSTRUMENTOS</p> <p>Guía de observación</p>
Validación de las pruebas antiglulínicas	Prueba que permite detectar la presencia de anticuerpos irregulares causantes de la alteración inmunológicas eritrocitarias	Prueba Inmunohematologica.	Intensidad de reacción	<p>TÉCNICA:</p> <p>Para la aplicación de las células control de Coombs en ensayos antiglobulínicos con resultados negativos.</p> <p>Observación</p> <p>INSTRUMENTOS</p> <p>Guía de observación</p>

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 MÉTODO CIENTÍFICO.

Se utilizó en el presente trabajo investigativo el método científico porque contiene un conjunto de pensamientos universales, leyes y principios comprobables importantes en el aporte de la validación de las pruebas antiglobulinicas cuyo trabajo está relacionado al apoyo de diagnóstico por laboratorio de trastornos hematológicos ocasionados por la presencia de anticuerpos irregulares que se destinan a la destrucción de los hematíes ocasionando como respuesta la destrucción de los glóbulos rojos y su descenso en el contaje total de los mismos ocasionando como efecto cuadros de anemia que en algunos casos pueden ser tolerables por el organismo y en otros no. Como método científico está constituido por leyes principios normas y reglas que conforman un conjunto de conocimientos sistemáticos ligados a la vialidad, medibles para concluir y recomendar cambios que se requieran ante la realidad de los hechos en beneficio del bienestar de los pacientes sometidos a evaluaciones Inmunohematológicas, transfusiones de sangre y sus derivados o a los estados de gestacionales, esto permite que en el desarrollo del trabajo se plantea hipótesis leyes y teorías a confirmarse o a manipularse.

METODO DEDUCTIVO- INDUCTIVO:

Se aplica el método deductivo inductivo debido a que cualquier área del conocimiento y sobre todo en este tema de trabajo investigativo relacionado al campo de la salud, radica en poder plantear hipótesis leyes y teorías para alcanzar una comprensión más amplia y profunda del origen desarrollo y transformación de los fenómenos, para no limitarse únicamente en hechos empíricos que logran acercarse a nuestros medios por la experiencia, en la inducción va de los hechos particulares a las afirmaciones de carácter general y en este trabajo de tesina no se quiere alcanzar únicamente al resultado negativo de ensayos antiglobulínicos

porque en las muestras hay la carencia del anticuerpo en estudio, esto implica que los resultados pasan por observaciones de confirmación de hipótesis planteadas. Con la deducción permite llegar al objetivo de evaluación mediante la medición de leyes y principios que también son observables cuantificables y manipula así como se plantea en el tema validar el resultado del ensayo de Coombs con aplicación de células de control que pueden ser preparadas en el laboratorio y respaldar los resultados en pruebas de alta importancia en el diagnóstico, pronóstico y control de trastornos hematológicos ligados a la reducción del número de glóbulos rojos.

LA APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Se utilizó el método analítico porque permite descomponer los elementos que componen al tema de estudio de esta manera se plantea la teoría, se sustenta la práctica y se emite resultados para validar ensayos y apoyarnos en la comprobación de la hipótesis, analizando sus dos elementos importantes con los que se estructura el tema de estudio que son las variables tanto dependiente como independiente, así el empleo de células reactivas elaboradas o preparadas pueden validar ensayos antiglobulínicos de respuesta negativa a la presencia de anticuerpos irregulares.

TIPO DE INVESTIGACION

La investigación se caracteriza por ser de tipo descriptiva- explicativa de campo no experimental.

DESCRIPTIVA.

El tipo de investigación utilizada es descriptiva debido a que permite describir los eventos que se dan para llegar a las conclusiones, apoyándose en teoría científica ya descrita y planteada en una población específica con un tipo determinado de muestras en estudio.

EXPLICATIVA.

Se emplea este tipo de estudio debido a que satisface las necesidades con las que se sustenta la base teórica y práctica para así dar a conocer el motivo del planteamiento de tema y como se logra paso a paso su

estudio y conclusión final, haciéndole al lector una explicación sencilla concisa y entendible.

DISEÑO DE INVESTIGACION

Esta investigación fue de campo

DE CAMPO

Debido a que el proceso investigativo se llevó a cabo en un lugar específico donde se manipula técnicamente las muestras en estudio sin riesgos sanitarios para el operario y el medio ambiente como es en el laboratorio del subcentro de salud Chambo.

3.2 POBLACION Y MUESTRA

POBLACION

La presente investigación está constituida por 210 ensayos, es relativamente pequeño por ello no se extrae muestra.

MUESTRA

Se trabaja con la totalidad de la población que es de 210 ensayos.

3.3 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

TÉCNICAS

Observación

Análisis documental.de la sustentación teórica

Recopilación bibliográfica

INSTRUMENTOS:

Guía de observación.

Guía para el reporte de resultados..

3.4 TÉCNICAS PARA EL ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Cuadros Estadísticos

Representación graficas de las tabulaciones.

Interpretación de las tabulaciones.

ESTADÍSTICAS

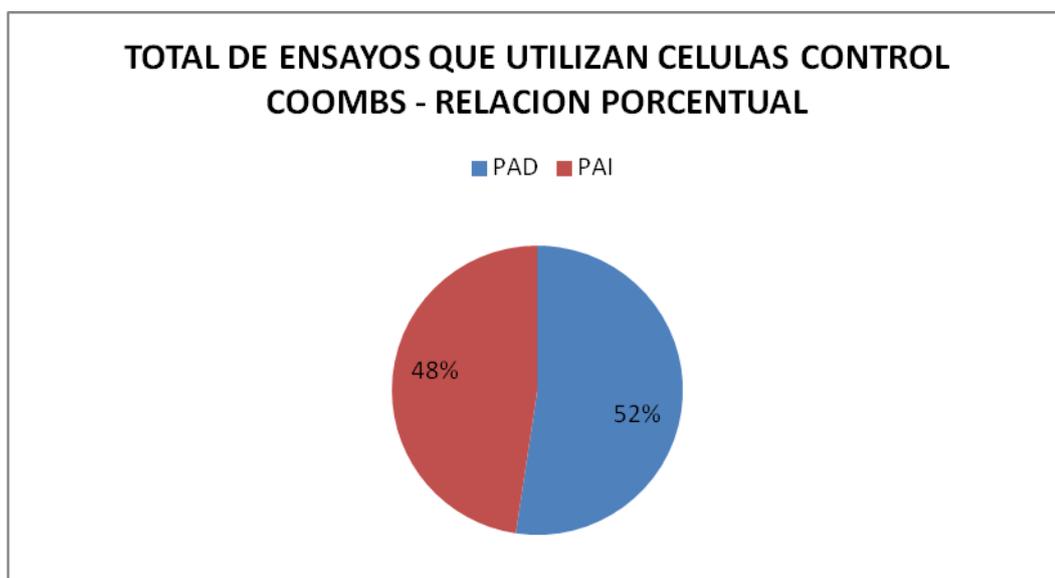
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Tabla 4 . Ensayos en los que se utilizó células control coombs

TOTAL	PAD	PAI
210	110	100

*Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.
Diseño: José Barreto.*

Ilustración 20 Representación gráfica de la tabla N° 4



*Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.
Diseño: José Barreto.*

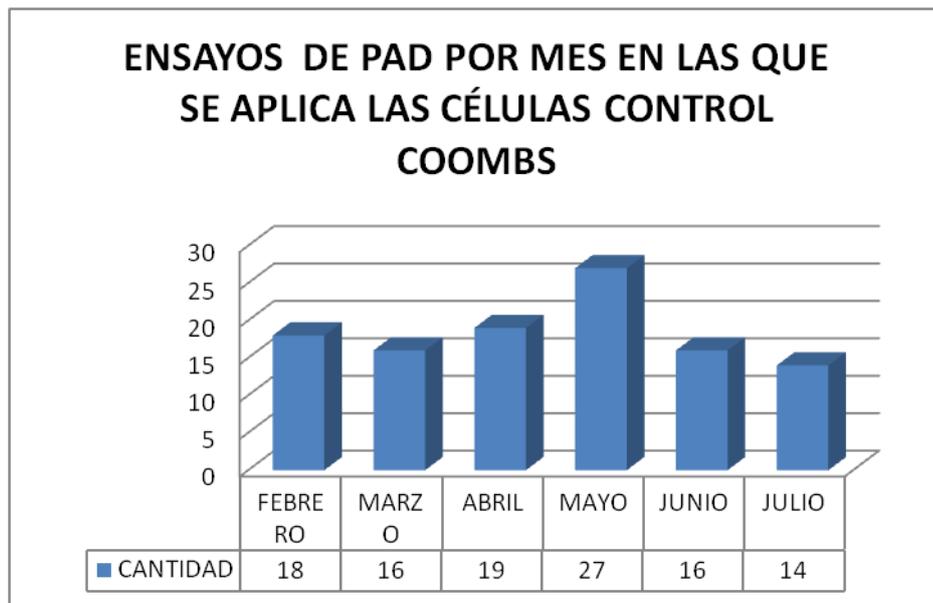
INTERPRETACIÓN: La gráfica o ilustración representa la relación porcentual de ensayos practicados y en los que se utilizó las células caseras para control de las pruebas de coombs. De 210 ensayos, 110 son ensayos de coombs directo (PAD) representados en un 52% de las muestras estudiadas y 100 de coombs indirecto (PAI) representados en un 48% de muestras estudiadas, se requieren que sus resultados sean en primera instancia negativos, para que se positivice al utilizar las células control coombs, dando un valor de control a los resultados negativos antiglobulínicos

Tabla 5. Cantidad de ensayos PAD que se realiza por mes y en las que se utiliza las células de control coombs.

COOMBS DIRECTO	
MES	CANTIDAD
FEBRERO	18
MARZO	16
ABRIL	19
MAYO	27
JUNIO	16
JULIO	14
TOTAL	110

*Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.
Diseño: José Barreto.*

Ilustración 21 Representación gráfica de la tabla estadística N°5



*Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.
Diseño: José Barreto.*

INTERPRETACIÓN: De los 110 ensayos de coombs directo en las que se aplicaron células control coombs caseras, el mes de junio tiene el registro de la menor cantidad de ensayos que son 14 a relación del mes de Mayo en el que se registra mayor cantidad de ensayos, a un total de 27.

Tabla 6. Ensayos por mes de Coombs Indirecto en los que se aplica células de control coombs.

MES	CANTIDAD
FEBRERO	10
MARZO	15
ABRIL	25
MAYO	18
JUNIO	12
JULIO	20
TOTAL	100

*Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.
Diseño: José Barreto.*

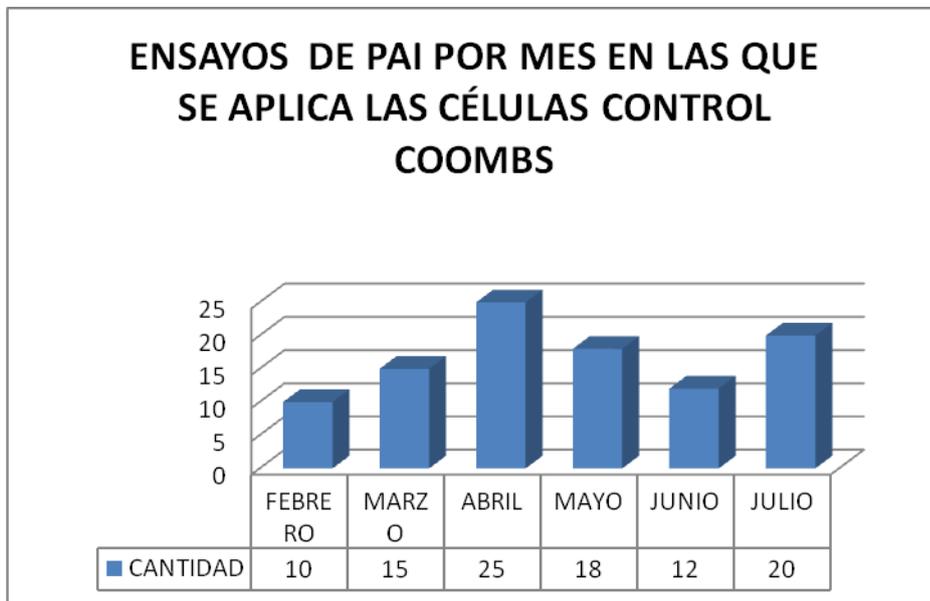


Ilustración 22 Representación gráfica de la tabla estadística 6.

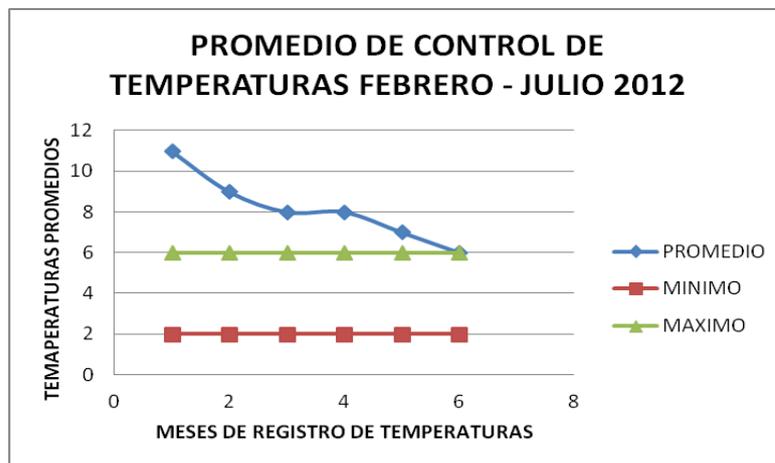
*Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.
Diseño: José Barreto.*

INTERPRETACIÓN: Los ensayos de coombs indirecto en las que se aplican las células caseras de control coombs tienen un mayor porcentaje de evaluaciones en el mes de abril, con 25 determinaciones y un menor porcentaje en el mes de febrero con un total de 10 ensayos.

Tabla 6 Registro de promedios de control de temperaturas.

MES	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO
FEBRERO	11	2	6
MARZO	9	2	6
ABRIL	8	2	6
MAYO	8	2	6
JUNIO	7	2	6
JULIO	6	2	6

*.Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.
Diseño: José Barreto.*



*Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.
Ilustración 23. Grafica de la tabla N7*

INTERPRETACION: El registro de temperaturas de los meses de la investigación, denotan variedad en los días de control y sus equivalentes en promedio, los parámetros mínimos de control son de 2 grados centígrados y máximos a 6 grados centígrados, así lo establece las normativas de Bancos de sangre y servicios de transfusión. Los promedios de temperaturas obtenidos y tabulados se los hace con la finalidad de brindar una conservación adecuada a las células coombs que se prepararon para su estudio y a su vez que las muestras de sangre empleadas sean conservadas técnicamente para denotar la eficacia de estas células en la validación de los ensayos de coombs.

Tabla 7. Células control coombs preparadas con CPDA1.

VIGENCIA/DIAS	PODER DE REACCION	CONSERVACION	ANTICOAGULANTE
2	2	11	CPDA1
2	3	9	CPDA1
3	3	8	CPDA1
3	3	7	CPDA1
4	3	6	CPDA1

Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.

Diseño: José Barreto.

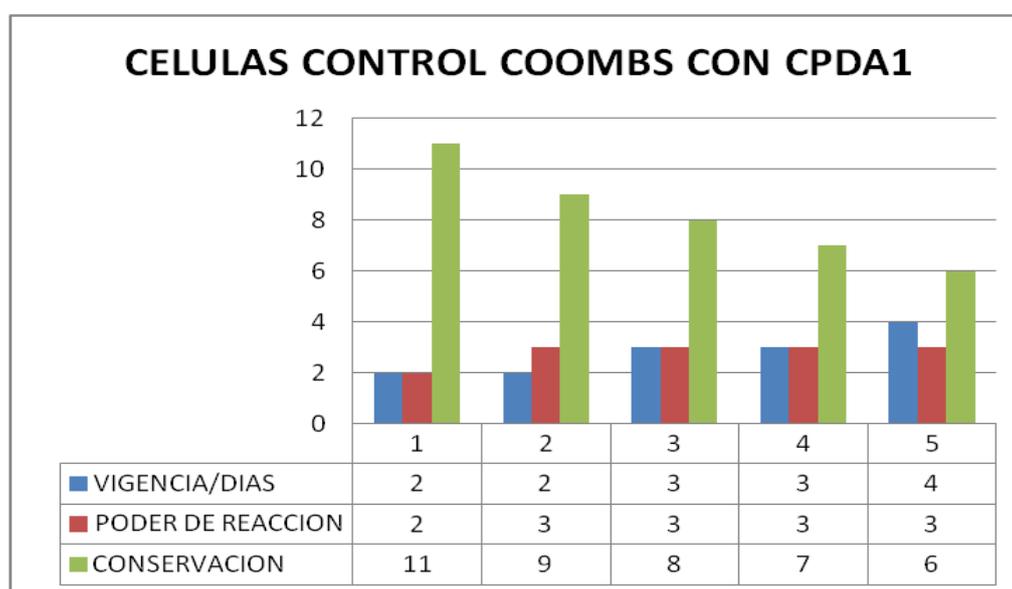


Ilustración 24. Células control coombs con CPDA1

Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.

Diseño: José Barreto.

INTERPRETACIÓN: Las células control coombs preparadas con CPDA1, presentan menor tiempo de vigencia de las preparadas con Sag manitol, este factor de vigencia se relaciona con la temperatura de conservación y la intensidad de reacción, a temperaturas mayores del promedio de 6 grados centígrados, se limita la vigencia a 2 días y su poder reaccionante a intensidad de 2 cruces, (temperatura de conservación 11 grados centígrados) siendo el poder máximo de 4 cruces. Células preparadas y conservadas a temperatura promedio de 6 grados centígrados, experimentan vigencia de 4 días con poder reaccionante de 3 cruces.

Tabla 8. Células control de Coombs preparadas con SAG - Manitol

CÉLULAS CONTROL COOMBS PREPARADAS CON SAG MANITOL			
VIGENCIA/DIAS	PODER DE REACCION	CONSERVACION	ANTICOAGULANTE
3	2	11	SAG - MANITOL
3	2	9	SAG - MANITOL
4	3	8	SAG - MANITOL
4	3	7	SAG - MANITOL
6	3	6	SAG - MANITOL

Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.

Diseño: José Barreto.

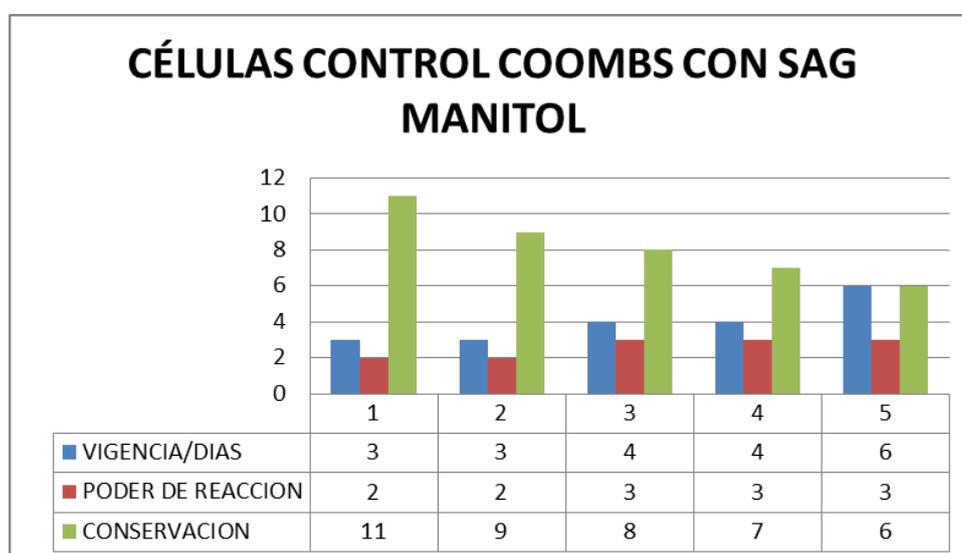


Ilustración 25. Gráfica de la tabla 9 Células preparadas con SAG Manitol

Fuente: Laboratorio Chambo Área de salud N°1.

Diseño: José Barreto.

INTERPRETACION: Las células control Coombs preparadas con Sag Manitol y conservadas a temperaturas reglamentarias tienen un mejor pronóstico de efectividad de reacción y tiempo de conservación, a mayores temperaturas promedio de 11 grados centígrados su límite de vigencia es de 3 días, la intensidad reaccionante es de 2 cruces, a diferencia de la vigencia de 6 días cuando el promedio de la temperatura de conservación es de 6 grados centígrados, aquí su efectividad reaccionante es de 3 cruces

COMPROBACIÓN DELA HIPÓTESIS

CELULAS CONTROL	VIGENCIA	REACCIÓN	COOMBS DIRECTO	COOMBS INDIRECTO
CPDA1	3	2	110	0
SAG MANITOL	4	3	0	100

Con la preparación de las células control coombs con SAg manitol su vigencia se prolonga y su titulación de reacción es mejorada a la de las células preparadas con CPDA1, por lo tanto se puede validar los ensayos de coombs directos e indirectos negativos al emplear las células control de coombs demostrando su efectividad con la reacción de aglutinación interpretada con dos y tres cruces de intensidad de reacción.

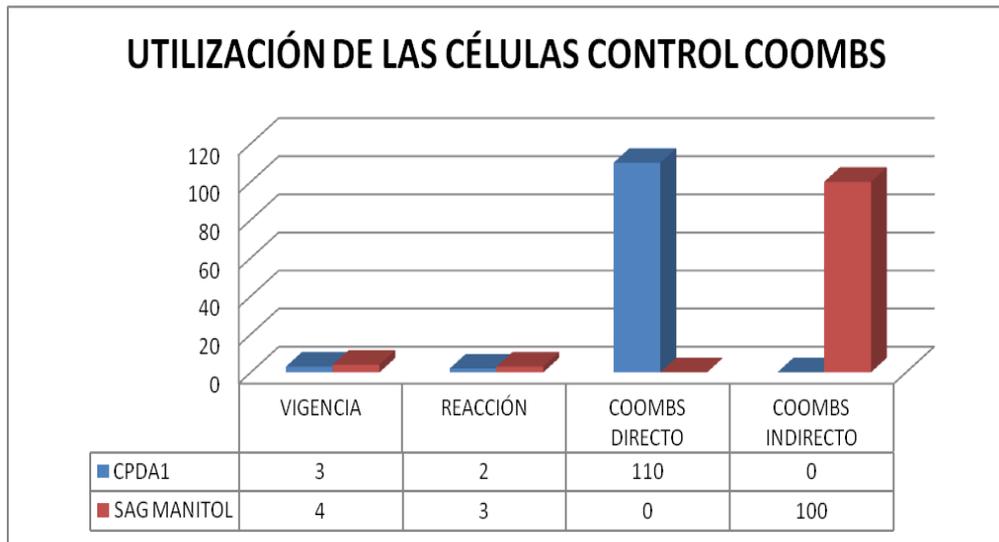


Ilustración 26. Representación gráfica de la Hipótesis

CAPITULO V.

4. CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES.

4.1 CONCLUSIONES.

- El empleo de las pruebas de coombs son de gran utilidad cuando se requiere la evaluar la presencia de anticuerpos irregulares de tipo IgG en pacientes sometidos a etapas pre transfusión, post - transfusión o embarazos, su interés clínico se basa en la etapa que se desarrolla o adquiere este anticuerpo y su grado de concentración para incrementar la respuesta inmune hemolítica, ocasionando en algunos casos la muerte del paciente como puede presentarse en la enfermedad hemolítica del recién nacido.
- Las pruebas de coombs directa valora al anticuerpos IgG unido y que esta reaccionado con el hematíe in vivo y a consecuencia de esto el paciente presente una anemia hemolítica y la prueba de coombs directo es útil su ensayo cuando se quiere valorar la presencia del anticuerpo IgG libre y no reaccionante con el hematíe para lo cual se utiliza un soporte de antígeno que estimule a la reacción confirmando su presencia.
- La utilización de las células de control coombs es para verificar la presencia de la antiglobulina libre que forma parte de la composición del reactivo de coombs y que no ha detectado al anticuerpo o inmunoglobulina IgG.

4.2 RECOMENDACIONES.

- La prueba de coombs directa valora la inter acción del antígeno con el anticuerpo unido al hematíe y que está estimulando la participación del sistema de complemento para producir como respuesta la hemolisis de los glóbulos rojos, en la prueba de coombs indirecto se valora al anticuerpo libre a consecuencia de un estímulo antigénico y que en la persona poseedora de este inmunoglobulina no se da la respuesta por carecer del antígeno específico.
- Para estudios y confirmación de la enfermedad hemolítica el recién nacido, se recomienda la aplicación de la prueba de coombs directa en el RN y del coombs indirecto en la madre para confirmar la presencia del anticuerpo en la madre y que fue transferida al recién nacido y en el la respuesta de la hemolisis de los glóbulos rojos.
- Para la preparación de las células de control coombs se requiere del empleo de hematíes grupo cero que carezcan de antígenos A y/o B y que no generen una reacción positiva a consecuencias de la presencia de anticuerpos de tipo IgM en el suero o plasma del paciente en estudio, dando lugar a una validación inadecuada de las pruebas de coombs negativas.

BIBLIOGRAFÍA.

- Jaramillo, F. (2010). Técnicas. *Manual de Pruebas Inmunohemtaológicas*, 75.
- Jaramillo, F. (2010). *blogspot - Inmunohemtaología*. Obtenido de www.inmohema.blogspot.com
- Javier, P. (2011). Anemias Hemolíticas. *Guía de Laboratorio para servicios de hematología y Hemoterapia*, 19 - 76.
- Kelton, J. y. (2000). *Transfusión Sanguínea Bases Teóricas Y Aplicación Clínica*. Madrid España: Doyna.
- Linares, J. (1997). *Inmunohemmatología Aplicada a los Bancos de Sangre*. Venezuela.
- Linares, J. (1998). *Inmunohemtaología y Terapia Transfusional*. Venezuela.
- Luna, G. J. (2005). Anticuerpos Irregulkares Y su importancia Médica. *Revista Médica del IMSS*, 17-30.
- Pública, M. d. (207). Reacciones Transfusionales. *Manual para el uso de componentes sanguíneos*.
- Rodriguez, M. H. (2004). *El Banco de sangre y la Medicina Transfusional*. Mexico: Panamericana.
- Rogero, L. L. (, 1997, Segunda Edicion, Madrid - España). *Inmunología, Patología del sistema Inmune*.
- Rojas, W. (2008). *Inmunología*. Colombia: 15 Edicion, Corporacion para la investigaciones Biológicas.
- Rubio, C. F. (2005). *Inmunología Aplicación Práctica* . Madrid: Paraninfo.
- Sanabria, A. V. (5° edición Editorial Médica Panamericana 1996.). *Anticuerpos, sus propiedades y pespectivas. La revista médica para estudiantes*, 38.
- Vega, B. G. (2009). Antigenos e Inmunógenos. *Inmunología para el médico general*,

LINCOGRAFÍA.

<http://farmapuntes.wikispaces.com/file/view/tema8.0-t.pdf>

<http://atlas.med.uchile.cl/indice.html>

<http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v4n2/art5.pdf>

http://www.sanquin.nl/repository/reagentia/ifu/K1138_Coombscontrolcells-strong_01012012_es.pdf

<http://www.uv.es/derma/CLindex/CLpiodermatitis/CLPiodermatitis.html>

<http://dieumsnh.qfb.umich.mx/bioquimica/glosario.htm>

<http://epidemiologiamolecular.com/respuesta-inmune-frente-virus-gripe/>

http://www.ffis.es/volviendoalobasico/13respuesta_inmunitaria_a_los_microrganismoorganismos.html

<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/epitope>

<http://resumendeinmunologia.blogspot.com/2011/08/estructura-basica-de-los-anticuerpos.html>

http://kuriosidadescientifiks.blogspot.com/2013/10/antigenos-y-anticuerpos_2.html

http://es.123rf.com/imagenes-de-archivo/immunoglobulin_a.html

<http://www.merriam-webster.com/art/med/antibody.htm>

http://organografia.unileon.es/html/Organos%20hematopoyeticos%20y%20linfoides_IV_archivos/frame.

<http://chemistryofasthma.blogspot.com/2008/11/inmunoglobulina-e.html>

[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Inmunoglobulina+D
&lang=2](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Inmunoglobulina+D&lang=2)

[http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/deptos/dbiogeo/recursos/Apu
ntes/ApuntesBioBach2/7-Inmunologia/inmuadap.htm](http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/deptos/dbiogeo/recursos/Apuntes/ApuntesBioBach2/7-Inmunologia/inmuadap.htm)

http://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_de_Coombs

ANEXOS

REGISTROS DE TEMPERATURAS.

MES DE FEBRERO				
DIAS	TEMPERATURA	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO
1	10	11	2	6
2	12	11	2	6
3	9	11	2	6
4	8	11	2	6
5	10	11	2	6
6	14	11	2	6
7	8	11	2	6
8	11	11	2	6
9	10	11	2	6
10	13	11	2	6
11	9	11	2	6
12	10	11	2	6
13	15	11	2	6
14	10	11	2	6
15	9	11	2	6
16	12	11	2	6

MES DE MARZO				
DIAS	TEMPERATURA	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO
1	10	9	2	6
2	8	9	2	6
3	9	9	2	6
4	7	9	2	6
5	11	9	2	6
6	8	9	2	6
7	9	9	2	6
8	10	9	2	6
9	12	9	2	6
10	8	9	2	6
11	7	9	2	6
12	10	9	2	6
13	13	9	2	6
14	11	9	2	6
15	7	9	2	6
16	9	9	2	6
17	8	9	2	6
18	10	9	2	6
19	8	9	2	6
20	9	9	2	6
21	11	9	2	6
22	12	9	2	6

MES DE ABRIL				
DIAS	TEMPERATURA	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO
1	9	8	2	6
2	8	8	2	6
3	7	8	2	6
4	6	8	2	6
5	8	8	2	6
6	10	8	2	6
7	6	8	2	6
8	8	8	2	6
9	9	8	2	6
10	10	8	2	6
11	6	8	2	6
12	10	8	2	6
13	5	8	2	6
14	7	8	2	6
15	9	8	2	6
16	10	8	2	6
17	11	8	2	6
18	7	8	2	6
19	8	8	2	6
20	9	8	2	6

MES DE MAYO				
DIAS	TEMPERATURA	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO
1	5	8	2	6
2	7	8	2	6
3	8	8	2	6
4	6	8	2	6
5	9	8	2	6
6	11	8	2	6
7	8	8	2	6
8	10	8	2	6
9	6	8	2	6
10	9	8	2	6
11	5	8	2	6
12	11	8	2	6
13	7	8	2	6
14	9	8	2	6
15	10	8	2	6
16	12	8	2	6
17	6	8	2	6
18	7	8	2	6
19	9	8	2	6
20	10	8	2	6
21	7	8	2	6
22	8	8	2	6

MES DE JUNIO				
DIAS	TEMPERATURA	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO
1	4	7	2	6
2	9	7	2	6
3	6	7	2	6
4	10	7	2	6
5	3	7	2	6
6	5	7	2	6
7	11	7	2	6
8	7	7	2	6
9	3	7	2	6
10	7	7	2	6
11	9	7	2	6
12	4	7	2	6
13	7	7	2	6
14	10	7	2	6
15	8	7	2	6
16	4	7	2	6

MES DE JULIO				
DIAS	TEMPERATURA	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO
1	2	6	2	6
2	6	6	2	6
3	8	6	2	6
4	3	6	2	6
5	6	6	2	6
6	9	6	2	6
7	2	6	2	6
8	5	6	2	6
9	10	6	2	6
10	5	6	2	6
11	7	6	2	6
12	8	6	2	6
13	3	6	2	6
14	2	6	2	6
15	8	6	2	6
16	6	6	2	6
17	9	6	2	6
18	4	6	2	6
19	7	6	2	6
20	3	6	2	6

PREPARACIÓN DE CÉLULAS REACTIVAS CON PERSEVERANTES.

SUSPENSIÓN 1:20		
VOLUMEN FINAL	GR (UL)	S. SALINA 0.9% (UL)
1 ml	50	950
2 ml	100	1900
3 ml	150	2850
4 ml	400	3600
5 ml	250	4750

REFERENCIA DE INTENSIDAD		
CRUCES	AGLUTINADOS	REPRESENTACION
4	UNICO	
3	UN AGLUTINADO GRUESO Y FINOS DISPERSOS	
2	DISPERSOS, CLARAMENTE VISIBLES	
1	PEQUEÑOS AGLUTINADOS DISPERSOS	

HEMATIES CON CPDA1		
CANTIDAD DE SANGRE TOTAL	CANTIDAD DE CPDA1	VOLUMEN TOTAL
1 ml	0,14 ml	1,14 ml
2 ml	0,28 ml	2,28 ml
3 ml	0.42 ml	3.42 ml
4 ml	0.56 ml	4,56 ml
5 ml	0.70 ml	5.70 ml
6 ml	0.84 ml	6.84 ml
7 ml	0.98 ml	7.98 ml
8 ml	1.12 ml	9.12 ml
9 ml	1.26 ml	10.26 ml
10 ml	1.40 ml	11.40 ml

HEMATIES CON SAG MANITOL		
CANTIDAD DE ST	SE ADICIONA ADSOL	VOLUMEN FINAL
1 ml	0.22 ml	1.22 ml
2 ml	0.44 ml	2.44 ml
3 ml	0.66 ml	3.66 ml
4 ml	0.88 ml	4. 88 ml
5 ml	1.10 ml	6.10 ml
6 ml	1.32 ml	7.32 ml
7 ml	1.54 ml	8.54 ml
8 ml	1.76 ml	9.76 ml
9 ml	1.98 ml	9.98 ml
10 ml	2.20 ml	12.20 ml

COOMBS DIRECTO VALIDADO CON CELULAS CONTROL COOMBS

PRUEBA	RESULTADO	CONTROL
1	Negativo	Positivo
2	Negativo	Positivo
3	Negativo	Positivo
4	Negativo	Positivo
5	Negativo	Positivo
6	Negativo	Positivo
7	Negativo	Positivo
8	Negativo	Positivo
9	Negativo	Positivo
10	Negativo	Positivo
11	Negativo	Positivo
12	Negativo	Positivo
13	Negativo	Positivo
14	Negativo	Positivo
15	Negativo	Positivo
16	Negativo	Positivo
17	Negativo	Positivo
18	Negativo	Positivo
19	Negativo	Positivo
20	Negativo	Positivo
21	Negativo	Positivo
22	Negativo	Positivo
23	Negativo	Positivo
24	Negativo	Positivo
25	Negativo	Positivo
26	Negativo	Positivo
27	Negativo	Positivo
28	Negativo	Positivo
29	Negativo	Positivo
30	Negativo	Positivo
31	Negativo	Positivo
32	Negativo	Positivo
33	Negativo	Positivo
34	Negativo	Positivo
35	Negativo	Positivo
36	Negativo	Positivo
37	Negativo	Positivo
38	Negativo	Positivo
39	Negativo	Positivo
40	Negativo	Positivo
41	Negativo	Positivo
42	Negativo	Positivo
43	Negativo	Positivo
44	Negativo	Positivo
45	Negativo	Positivo
46	Negativo	Positivo
47	Negativo	Positivo
48	Negativo	Positivo
49	Negativo	Positivo
50	Negativo	Positivo

51	Negativo	Positivo
52	Negativo	Positivo
53	Negativo	Positivo
54	Negativo	Positivo
55	Negativo	Positivo
56	Negativo	Positivo
57	Negativo	Positivo
58	Negativo	Positivo
59	Negativo	Positivo
60	Negativo	Positivo
61	Negativo	Positivo
62	Negativo	Positivo
63	Negativo	Positivo
64	Negativo	Positivo
65	Negativo	Positivo
66	Negativo	Positivo
67	Negativo	Positivo
68	Negativo	Positivo
69	Negativo	Positivo
70	Negativo	Positivo
71	Negativo	Positivo
72	Negativo	Positivo
73	Negativo	Positivo
74	Negativo	Positivo
75	Negativo	Positivo
76	Negativo	Positivo
77	Negativo	Positivo
78	Negativo	Positivo
79	Negativo	Positivo
80	Negativo	Positivo
81	Negativo	Positivo
82	Negativo	Positivo
83	Negativo	Positivo
84	Negativo	Positivo
85	Negativo	Positivo
86	Negativo	Positivo
87	Negativo	Positivo
88	Negativo	Positivo
89	Negativo	Positivo
90	Negativo	Positivo
91	Negativo	Positivo
92	Negativo	Positivo
93	Negativo	Positivo
94	Negativo	Positivo
95	Negativo	Positivo
96	Negativo	Positivo
97	Negativo	Positivo
98	Negativo	Positivo
99	Negativo	Positivo
100	Negativo	Positivo
101	Negativo	Positivo

**COOMBS INDIRECTO VALIDADO CON CELULAS CONTROL
COOMBS**

COOMBS INDIRECTO CON CELULAS CONTROL		
PRUEBA	RESULTADO	CONTROL
1	Negativo	Positivo
2	Negativo	Positivo
3	Negativo	Positivo
4	Negativo	Positivo
5	Negativo	Positivo
6	Negativo	Positivo
7	Negativo	Positivo
8	Negativo	Positivo
9	Negativo	Positivo
10	Negativo	Positivo
11	Negativo	Positivo
12	Negativo	Positivo
13	Negativo	Positivo
14	Negativo	Positivo
15	Negativo	Positivo
16	Negativo	Positivo
17	Negativo	Positivo
18	Negativo	Positivo
19	Negativo	Positivo
20	Negativo	Positivo
21	Negativo	Positivo
22	Negativo	Positivo
23	Negativo	Positivo
24	Negativo	Positivo
25	Negativo	Positivo
26	Negativo	Positivo
27	Negativo	Positivo
28	Negativo	Positivo
29	Negativo	Positivo
30	Negativo	Positivo
31	Negativo	Positivo
32	Negativo	Positivo
33	Negativo	Positivo
34	Negativo	Positivo
35	Negativo	Positivo
36	Negativo	Positivo
37	Negativo	Positivo
38	Negativo	Positivo
39	Negativo	Positivo
40	Negativo	Positivo
41	Negativo	Positivo
42	Negativo	Positivo
43	Negativo	Positivo
44	Negativo	Positivo
45	Negativo	Positivo
46	Negativo	Positivo
47	Negativo	Positivo
48	Negativo	Positivo
49	Negativo	Positivo
50	Negativo	Positivo

51	Negativo	Positivo
52	Negativo	Positivo
53	Negativo	Positivo
54	Negativo	Positivo
55	Negativo	Positivo
56	Negativo	Positivo
57	Negativo	Positivo
58	Negativo	Positivo
59	Negativo	Positivo
60	Negativo	Positivo
61	Negativo	Positivo
62	Negativo	Positivo
63	Negativo	Positivo
64	Negativo	Positivo
65	Negativo	Positivo
66	Negativo	Positivo
67	Negativo	Positivo
68	Negativo	Positivo
69	Negativo	Positivo
70	Negativo	Positivo
71	Negativo	Positivo
72	Negativo	Positivo
73	Negativo	Positivo
74	Negativo	Positivo
75	Negativo	Positivo
76	Negativo	Positivo
77	Negativo	Positivo
78	Negativo	Positivo
79	Negativo	Positivo
80	Negativo	Positivo
81	Negativo	Positivo
82	Negativo	Positivo
83	Negativo	Positivo
84	Negativo	Positivo
85	Negativo	Positivo
86	Negativo	Positivo
87	Negativo	Positivo
88	Negativo	Positivo
89	Negativo	Positivo
90	Negativo	Positivo
91	Negativo	Positivo
92	Negativo	Positivo
93	Negativo	Positivo
94	Negativo	Positivo
95	Negativo	Positivo
96	Negativo	Positivo
97	Negativo	Positivo
98	Negativo	Positivo
99	Negativo	Positivo
100	Negativo	Positivo