



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

### **CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

#### **TESINA DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

##### **TEMA**

**“PREPARACIÓN DE CÉLULAS REACTIVAS CONTROL COOMBS CON LA UTILIZACIÓN DE ANTISUEROS MONOCLONALES Y POLICLONALES PARA VALIDAR ENSAYOS ANTIGLOBULÍNÍCOS DIRECTOS E INDIRECTOS REALIZADOS EN EL SERVICIO DE MEDICINA TRANSFUSIONAL DEL HOSPITAL PROVINCIAL GENERAL DOCENTE DE RIOBAMBA EN EL PERIODO ENERO - JUNIO DE 2014”.**

##### **AUTOR**

Karla Allauca.

##### **TUTOR**

Lic. Fernando Jaramillo.

**RIOBAMBA - ECUADOR**

**2016**



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

### **CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

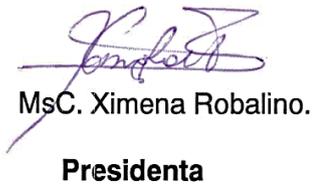
### **TESINA DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

#### **TEMA**

**“PREPARACIÓN DE CÉLULAS REACTIVAS CONTROL COOMBS  
CON LA UTILIZACIÓN DE ANTISUEROS MONOCLONALES Y  
POLICLONALES PARA VALIDAR ENSAYOS ANTIGLOBULÍNICOS  
DIRECTOS E INDIRECTOS REALIZADOS EN EL SERVICIO DE  
MEDICINA TRANSFUSIONAL DEL HOSPITAL PROVINCIAL  
GENERAL DOCENTE DE RIOBAMBA EN EL PERIODO ENERO -  
JUNIO DE 2014”**

**PRESENTADO Y APROBADO ANTE EL TRIBUNAL CONFORMADO  
POR:**

  
MsC. Paul Parra.  
**Miembro**

  
MsC. Ximena Robalino.  
**Presidenta**

  
Lic. Fernando Jaramillo  
**Tutor.**

**RIOBAMBA - ECUADOR**

## **ACEPTACIÓN DEL TUTOR**

Por la presente, hago constar que he leído el protocolo del proyecto de grado presentado por KARLA PAOLA ALLAUCA FREIRE, para optar por el título de licenciada en Laboratorio Clínico e Histopatológico y que acepto asesorar en calidad de tutor a las ejecutoras del proyecto de tesina, durante la etapa de desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación



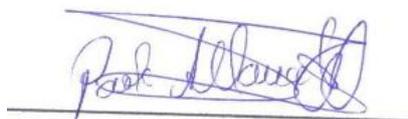
---

Lic. Fernando Jaramillo G.

TUTOR

## **DERECHOS DE AUTORÍA**

Yo **Karla Paola Allauca Freire**, soy responsable de las ideas, criterios, pensamientos y resultados expuestos en el presente trabajo investigativo y de los derechos de autoría pertenecen a la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Karla Allauca', is written over a horizontal line.

**Karla Allauca**

CI. 060436926-4

### **Agradecimiento.**

El presente trabajo de investigación primeramente me gustaría agradecerle a ti mi Dios por haberme bendecido en todo tiempo y en todo momento, a mi distinguida UNACH por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional , a mis padres Carlos y Elisa, a mi hijo Alejandro y a mis hermanas Esmeralda, Yesenia, Ximena y Cecilia por sus consejos y motivaciones diarias durante toda mi formación como persona y profesional y a mis maestros cada uno apporto un granito de arena en mis estudios en especial a mi tutor que me ayudado hasta la finalización de mi trabajo investigativo.

### **Dedicatoria.**

A Dios que me ha permitido llegar hasta este punto por haberme dado salud para culminar mis objetivos, además de su infinita bondad y amor; a mis padres Carlos y Elisa, a mi hijo Alejandro y a mis hermanas Esmeralda, Yesenia, Ximena y Cecilia por haberme apoyado en todo momento por sus consejos, valores y su infinita motivación que me ha permitido ser una persona de bien.

## RESUMEN.

La realización de las pruebas de coombs o llamadas antiglobulínicas, son pruebas que se aplican en la rutina de bancos de sangre o servicios transfusionales, como lo es el servicio de Medicina Transfusional del Hospital General Docente de la ciudad de Riobamba, esta prueba esta destina a valorar la presencia de aglutininas en el propósito de transfusiones de sangre o sus derivados como también el estudio de incompatibilidades de grupos sanguíneos materno fetales y como apoyo en el estudio de reacciones transfusionales a consecuencia del uso y administración de hemoderivados. Esta investigación tiene como objetivo la preparación de células reactivas mediante el empleo de antisueros mono y policlonales para aplicarlos en la validación de ensayos de coombs mediante su poder de intensidad de reacción como también correlacionar este resultado con el empleo de tarjetas screening. De la hipótesis planteada llegamos a comprobar que si se logró validar los ensayos negativos de coombs directos e indirectos al utilizar las células de control preparados con antisueros policlonales y monoclonales, para respaldo de los resultados obtenidos se realizó ensayos de anti IgG y C3d, los cuales fueron negativos correlacionando así el resultados de coombs y el empleo de las células control al obtener positividad en dichos ensayos. Como conclusiones obtenidas citamos que el emplear la combinación de antisueros anti-D monoclonal y policlonal para preparar células control coombs garantizan este medio de control por cuanto la estructura antigénica RhD presenta variaciones en sus epitopes que pueda en su mayoría generar la producción de anticuerpos inespecíficos o irregulares que representan la causa de positividad en los ensayos de coombs, se recomienda validar estas células con pruebas específicas, de IgG y C3d, esto genera en el trabajo realizado un control adicional a la prueba de coombs negativa.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CENTRO DE IDIOMAS

Exts. 1517 - 1518

*Libres por la Ciencia y el Saber*

**ABSTRACT**

The performance of the coombs tests or antiglobulinicas are tests applied in the routine services of Blood Banks and Transfusion Services, as it is in the service of Transfusion Medicine General Teaching Hospital in the city of Riobamba, this test is intended to assess the presence of agglutinins in the purpose of blood transfusion or its derivatives as well as the study of blood group incompatibilities maternal fetal and as support for the study of transfusion reactions resulting from the use and administration of blood products. This research has as objectives the preparation of reactive cells using mono and polyclonal antisera to apply in validating coombs tests by his power intensity reaction as correlate this result with the use of screening cards. From the stated hypothesis it could be possible to prove that was possible to validate negative direct and indirect Coombs tests using control cells prepared with polyclonal and monoclonal antisera, to support the obtained results anti IgG and C3d tests were conducted, which results were negative and correlating the result of Coombs and the use of control cells when these gave positive. Of the conclusions it is stated that the use of the combination of anti-D monoclonal and polyclonal antisera to prepare cells Coombs Control guarantee this control means as the antigenic structure RhD presents variations in epitopes that can most generate the production of non-specific antibodies or irregular representing the cause of positivity in Coombs tests, it is recommended to validate these cells with specific tests, IgG and C3d, this generates in the performed work an additional control to the negative Coombs test.

Translation reviewed by:

  
Ms. Ligia López H.,  
ENGLISH TEACHER



**Campus Norte "Edison Riera R."**  
Avda. Antonio José de Sucre, Km. 1.5 Vía a Guano  
Teléfonos: (593-3) 37 30 880-ext. 3000

**Campus "La Dolorosa"**  
Avda. Eloy Alfaro y 10 de Agosto  
Teléfonos: (593-3) 37 30 910 - ext. 3001

**Campus Centro**  
Duchicela 17-75 y Princesa Toa  
Teléfonos: (593-3) 37 30 880-ext. 3500

**Campus Guano**  
Parroquia La Matriz, Barrio San Roque  
vía a Asaco

[www.unach.edu.ec](http://www.unach.edu.ec)

## ÍNDICE GENERAL.

Aceptación del tutor .....	III
Derechos de autoría.....	IV
Agradecimiento .....	V
Dedicatoria. ....	VI
Introducción. ....	13
CAPITULO I.....	15
1. Problematización.....	15
1.1 Planteamiento Del Problema. ....	15
1.2 Formulación del Problema. ....	16
1.3    Objetivos .....	17
1.3.1 Objetivo General.....	17
1.3.2 Objetivos Específicos. ....	17
1.4 Justificación e Importancia.....	17
CAPITULO II .....	19
2. Marco Teórico.....	19
2.1 Posicionamiento Personal.....	19
2.2 Fundamentación Teórica. ....	20
2.2.1 Test Antiglobulínico .....	20
2.2.1.1 Generalidades.....	20
2.2.1.2 Importancia Clínica.....	22
2.2.1.3 Clasificación. ....	23
2.2.2. Anticuerpos.....	31
2.2.2.1 Anticuerpos Naturales:.....	33
2.2.2.2 Anticuerpos Irregulares:.....	34
2.2.3 Sistema de Grupo Sanguíneo Rh. ....	41
2.2.3.2 RhD. Débil. ....	44
2.2.3.3. RhD. Parcial .....	45
2.2.3.4 Otros Antígenos Rh.....	46
2.2.4 Preparación De Células Control Coombs. ....	48
2.2.4.1 Células Comerciales Control Coombs. ....	48
2.2.4.2 Células Control Coombs Caseras.....	50
2.2.4.3 Representación de la Preparación de células Reactivas., .....	52
2.3    Definición De Términos Básicos. ....	57
2.4    Hipótesis y Variables.....	64

2.4.1 Hipótesis.....	64
2.4.2 Variables. ....	64
Variable Independiente.....	64
2.5 Operacionalización de variables.....	65
Capitulo III.....	66
3. Marco Metodológico.....	66
3.1 Método Científico.....	66
Método Deductivo- Inductivo.....	66
La Aplicación Del Método Analítico.....	66
Tipo De Investigación. ....	66
3.2 Población y Muestra. ....	67
3.2.1 Población. ....	67
3.2.2 Muestra. ....	67
3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	67
3.3.1 Técnicas. ....	67
3.3.2 Instrumentos: ....	67
3.4 Análisis e Interpretación de Resultados. ....	68
3.4.1 Ensayos de Coombs Directos negativos.....	68
3.4.2 Ensayos de Coombs Indirectos negativos.....	69
3.4.4 Relación de la intensidad de reacción con células de control en ensayos de coombs directo e indirecto. ....	71
3.5 Comprobación de la Hipótesis. ....	72
CAPITULO IV.....	73
4. Conclusiones y Recomendaciones.....	73
4.1 Conclusiones. ....	73
4.2 Recomendaciones.....	73
Bibliografía.....	75
Anexos. ....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 Representación del Coombs Directo .....	25
Figura 2 Principio de la Prueba de Coombs Indirecto. ....	28
Figura 3. Estructura básica de una inmunoglobulina.....	32
Figura 4 Esquema de los antígenos y anticuerpos ABO. ....	33
Figura 5. Medio de Reacción de aglutinación.....	36
Figura 6. Marcadores de Reacción de anticuerpos irregulares. ....	37
Figura 7 Anticuerpo Monoclonal.....	37
Figura 8 Alelos del Sistema Rh.....	42
Figura 9 Rh D Total o Completo. ....	43
Figura 10 RhD Débil.....	44
Figura 11 RhD - Débil. ....	44
Figura 12 Variante RhD - Parcial. ....	45
Figura 13 Otros Antígenos Rh. ....	47
Figura 14 Células de Control Coombs Comercial.....	48
Figura 15 Donación de la muestra de sangre. ....	52
Figura 16 Pool de Células.....	53
Figura 17 Reactivo Anti-D para sensibilizar Hematíes.....	54
Figura 18 Preparación de la suspensión con SAG MANITOL.....	54
Figura 19 Principio del ensayo de Coombs .....	55
Figura 20 Ensayo negativo de Coombs. ....	55
Figura 21 Validación de los ensayos de Coombs.....	56
Figura 22 representación gráfica tabla 3.4.1 .....	68
Figura 23 Representación grafica estadística 3.4.2.....	69
Figura 24 Representación gráfica tabla 3.4.3.....	70
Figura 25 Interpretación tabla 3.4.4.....	71
Figura 26 Representación de la comprobación de la hipótesis. ....	72
Figura 27. Preparación de suspensión de células .....	77
Figura 28. Dispensación de solución liss.....	77
Figura 29. Dispensación de muestras .....	78
Figura 30 Ensayos.....	78
Figura 31. Centrifugación.....	79
Figura 32. Lecturas.....	79
Figura 33. Selección de unidades.....	79
Figura 34Validación de Coombs.....	79
Figura 35 Validacion ensayos de pantallas .....	79
Figura 36. Validacion pruebas cruzadas.....	79

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 Incompatibilidad Madre e Hijo ABO.....	22
Tabla 2 Anticuerpos con significado Clínico.....	26
Tabla 3. Esquema sistema ABO. ....	34
Tabla 4 Categoría RhD - Parcial .....	46
Tabla 5 Otros Antígenos Rh.....	47
Tabla 6 Relación muestra y anticoagulante. ....	52
Tabla 7 Tabla estadística de ensayos de coombs directo .....	68
Tabla 8 Ensayos de coombs Indirectos negativos.....	69
Tabla 9 Ensayos con células control coombs.....	70
Tabla 10 Intensidad de reacción con células de control en pruebas TAD y TAI.....	71
Tabla 11 Comprobación de la hipótesis. ....	72

## INTRODUCCIÓN

La realización de las pruebas de coombs o llamadas antiglobulínicas, son pruebas que se aplican en la rutina de bancos de sangre o servicios transfusionales, como lo es el servicio de medicina transfusional del Hospital General Docente de la ciudad de Riobamba, esta prueba esta destina a valorar la presencia de aglutininas en el propósito de transfusiones de sangre o sus derivados como también el estudio de incompatibilidades de grupos sanguíneos materno fetales y como apoyo en el estudio de reacciones transfusionales a consecuencia del uso y administración de hemoderivados.

Las pruebas de coombs son muy útiles para detectar anticuerpos irregulares los cuales suelen ser de tipo IgG y aparecen al existir estímulos antigénicos como por ejemplo transfusiones sanguíneas o durante el embarazo y pueden generar reacciones hemolíticas severas provocando anemias hemolíticas por transfusiones o AHRN

Una prueba de coombs con resultado negativo debe ser comprobada para verificar que no existan anticuerpos irregulares para ello utilizamos las células de control coombs que tienen marcadores IgG para una anti IgG que queda libre en la muestra al colocar el reactivo de coombs

Validar los ensayos antiglobulínicos es parte de la seguridad en el reporte de los ensayos de coombs, se suele utilizar células llamadas comerciales con marcación IgG pero también se las puede preparar en el laboratorio de los servicios transfusionales, cuando estos no se los pueden acceder fácilmente o cuando el consumo ha sido alto y rompe el stock, esta preparación debe ser cuidadosa y vigilada para evitar el uso de células caseras deterioradas y marquen un control falso a favor de un resultado exitoso de coombs que involucren la aceptabilidad de unidades de sangre seleccionadas para una transfusión o que apoyen a un resultado falso de respuesta inmune a una incompatibilidad transfusional o feto materna.

Estas pruebas son beneficiosas pero al mismo tiempo pueden generar reacciones cruzadas en pacientes que tienen inmunoglobulina IgG por infecciones a

consecuencia de una memoria inmunológica por ello la correlación de la prueba de coombs garantiza la conclusión final del resultado.

La revista chilena de ginecología y obstetricia ha realizado una investigación basada en el “**Manejo de la embarazada con isoinmunización por anticuerpos irregulares**” la cual se refiere a la isoinmunización eritrocitaria feto-materna se define como la presencia de anticuerpos maternos dirigidos contra antígenos presentes en los glóbulos rojos fetales. Los anticuerpos maternos pueden atravesar la barrera placentaria y provocar hemólisis de los glóbulos rojos fetales produciendo anemia hemolítica e hiperbilirrubinemia, características de la enfermedad hemolítica perinatal (EHP). La principal causa de EHP es la incompatibilidad ABO, seguida de la isoinmunización por RhD; esta última ha disminuido su incidencia dado el amplio uso de inmunoglobulina anti D. Sin embargo, el glóbulo rojo tiene más de 400 antígenos, muchos de ellos (>50) capaces de producir isoinmunización y EHP. En este artículo, revisamos la evidencia y proponemos un algoritmo de manejo y seguimiento de las embarazadas con isoinmunización por anticuerpos irregulares. En la isoinmunización por anticuerpos irregulares, los títulos de anticuerpos maternos no se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. La anemia en la EHP por anticuerpos anti-Kell es secundaria a una supresión de la eritroblastosis fetal a diferencia del resto de los sistemas que producen anemia hemolítica. Recomendamos efectuar tamizaje de todas las pacientes en el control prenatal, solicitando grupo sanguíneo, Rh y test de Coombs indirecto. En las pacientes Rh (+) con test de Coombs indirecto positivo es necesario identificar los anticuerpos irregulares. En caso de tener isoinmunización por anticuerpos irregulares con riesgo de EHP, derivar a una unidad de alto riesgo obstétrico para realizar seguimiento de la aparición de anemia fetal midiendo de modo seriado el peak sistólico de la arteria cerebral media. Si se detecta anemia fetal, debemos planificar una cordocentesis para confirmar el diagnóstico y tratar la anemia.

# CAPITULO I

## **1. Problematización.**

### **1.1 Planteamiento Del Problema.**

Las pruebas antiglobulínicas, es el medio principal por el cual se detectan varias interacciones antígeno anticuerpo, esta técnica se realiza como parte de la rutina de detección de anticuerpos, y pruebas cruzadas para las transfusiones de la sangre y sus derivados.

La célula control coombs es un pool de células rojas del grupo O que se han sensibilizado con un anticuerpo IgG. Estas células se han preparado en una suspensión del 4-6% en una solución buffer con conservadores que contienen adenosina y adenina para retardar la hemólisis durante el periodo de vida útil del reactivo.

El reactivo de células rojas no se debe de usar si las células están oscuras, autoaglutinadas o si presentan una hemólisis significativa, se puede presentar una hemólisis ligera con el tiempo, a pesar de los conservantes la manipulación continua deteriora a los hematíes y en algunos casos una inadecuada conservación acelera su destrucción.

Los servicios transfusionales deben disponer de un stock suficiente, pero como son células fabricadas las casa comerciales ofertan un calendario de abastecimiento mensual y programado para el año, al no disponer de células comerciales de control, el servicio de transfusión debe estar capacitado para preparar estas células, por ello la sensibilización con anticuerpos mono y policlonales son las alternativas que se plantean en este trabajo para garantizar el control de resultados de las pruebas antiglobulínicas, se menciona a estos reactivos por la variedad antigénica D que se encuentra en la población.

El éxito de las transfusiones de la sangre y sus derivados los lleva el servicio de transfusión como lo hay en el Hospital Docente de la ciudad de Riobamba, la cobertura de atención de las transfusiones es en la provincia de Chimborazo y en los hospitales de la ciudad, como el Hospital Alfonso Villagómez conocido como el Hospital de Niños y otros hospitales como es los de la zona de salud 3 dentro de ellos Hospital de Guamote, Cajabamba, Alausí y Chunchi.

La o las patologías relacionadas a la necesidad de transfusiones son variadas y las exposiciones a transfusiones múltiples o conocidas como pacientes politransfundidos, multiparidad, enfermedades hemolíticas, generan la producción de anticuerpos que comprometen el estado del paciente y ponen en inseguridad la transfusión de la sangre.

La validación o control de los ensayos para garantizar las transfusiones de sangre han permitido minimizar los riesgos de la transfusión en este tipo de pacientes, es por ello la aplicación del control de la prueba mediante la utilización de las llamadas células de control que serán preparadas para su empleo en las pruebas de coombs que permiten el control de resultados y el éxito de las transfusiones.

En el Hospital Docente de Riobamba, se llevan a cabo más de 3000 transfusiones por año y se han detectado una variedad de anticuerpos relacionados o comprometidos con transfusiones presentes y futuras, las determinaciones de estos anticuerpos son en pacientes mujeres y niños por la relación de incompatibilidad feto materna y multiparidad, es en ellos los cuidados a mantenerse en el diagnóstico de incompatibilidades, identificación de grupos sanguíneos, aplicación y validación de pruebas de coombs y seguridad en las transfusiones.

## **1.2 Formulación del Problema.**

¿ Se logrará validar los resultados de los ensayos de coombs directos e indirectos al emplear células preparadas control coombs y relacionarlas con tarjetas screening policlonales (IgG – C3d), cuando se han utilizado antisueros monoclonales y

policlonales en el Servicio de Medicina Transfusional del Hospital Provincial General Docente de Riobamba?

### **1.3 Objetivos.**

#### **1.3.1. Objetivo General.**

“Validar los resultados de los ensayos antiglobulínicos directos e indirectos al emplear células preparadas de control coombs en ensayos realizados en el servicio de medicina transfusional del Hospital Provincial General Docente de Riobamba en el periodo Enero a Junio de 2014”

#### **1.3.2. Objetivos Específicos.**

- Aplicar el ensayo de coombs directo e indirecto en pacientes sometidos transfusiones para prevenir complicaciones relacionadas a las transfusiones de sangre mediante las pruebas de pantallas y multipanel.
- Preparar células reactivas mediante el empleo de antisueros mono y policlonales para aplicarlos en la validación de los ensayos de coombs mediante su poder de intensidad de reacción.
- Validar resultados de pruebas antiglobulínicas con las células reactivas de coombs y correlacionar sus resultados con el empleo de tarjetas screening.

### **1.4 Justificación e Importancia.**

Las pruebas antiglobulínicas detectan anticuerpos circulantes dirigidos contra los hematíes. El motivo principal por el que una persona puede tener anticuerpos dirigidos contra sus hematíes es haber estado expuesta, a través de una transfusión de sangre o por el embarazo, a hematíes de otra persona.

Los hematíes (o glóbulos rojos de la sangre) suelen tener unas estructuras en su superficie conocidas como antígenos lo que nos muestra que cada persona presenta en sus hematíes un conjunto de antígenos característico, determinado por la herencia, los antígenos principales de superficie de los hematíes humanos son los antígenos O, A y

B, otorgando a los individuos unos grupos sanguíneos característicos: A, B, AB o O, en función de la presencia o ausencia de dichos antígenos.

Otro antígeno de superficie importante es el factor Rh o antígeno D. Si el antígeno D está presente en los hematíes de una persona, se dice que la persona es Rh+ (positivo); si estuviera ausente sería Rh- (negativo).

Las pruebas antiglobulínicas se realizan para valorar anticuerpos IgG presentes en la membrana del hematíe libre o unidos, validar los ensayos es parte de un control de los resultados, es por ello el empleo de las células control coombs, la propuesta de preparar células con reactivos anti-D mono y policlonales, para disponer de este control cuando no se dispongan de reactivos de control comercial y cuando los ensayos de coombs se realizan en la técnica de tubo, la cual requiere de un control de ensayos para garantizar los resultados.

Por la cantidad de transfusiones y atención en demanda de pruebas inmunoematológicas se aplican diferentes técnicas, insumos y reactivos, no todos los centros de trasfusiones, servicios de medicina transfusional o bancos de sangre cuentan con tecnología de última generación para estos ensayos, el H.P.G.D.R en el servicio de medicina transfusional se cuenta con la tecnología de gel para pruebas antiglobulínicas, la calidad de reactivos y equipamientos son de última generación, los costos son elevados, la cantidad de pruebas superan los 3000 determinaciones mensuales, la cobertura en atención es alta, por lo que requieren de mantener un control estricto en la generación de ensayos asociados a las transfusiones, procesos de acreditación como lo tiene el HPGDR, exigen mantener un trabajo de alta calidad, es por ello la utilización de estas células de control cuando no se disponen de medios de ensayos de alta complejidad.

## CAPITULO II

### 2. Marco Teórico.

#### 2.1 Posicionamiento Personal.

La teoría del conocimiento o creencia, es lo que conlleva al trabajo de esta investigación la cual es elaborada basándose o partiendo del conocimiento del pragmatismo considerado la relación teórica y práctica, para alcanzar los objetivos finales de este proceso investigativo, todo ensayo de laboratorio, relaciona el sustento científico con los aportes prácticos.

Una de las corrientes filosófica aplicada en este trabajo investigativo es el pragmatismo en el cual se 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, substancias, y fijarse en los frutos, efectos, resultados prácticos de las ideas. El pragmatismo cree que el pensamiento no tiene por finalidad conocer las verdades metafísicas, sino orientarnos, ajustarnos prósperamente a la realidad. El pensamiento es como una función vital que tiene su papel en la conservación y preservación de la vida. Introduce un nuevo concepto de la verdad.

Para el pragmatismo un pensamiento es verdadero cuando es útil y fomentador de la vida. Este pensamiento pragmatista se enmarca dentro de las filosofías de la vida para las cuales la vida humana es el valor cimero, siendo todos los otros valores medios útiles para el fomento de la vida: la verdad es lo útil y conveniente al hombre; el conocer y el pensar son funciones al servicio de la conservación y promoción de la vida. (TORELLA, 2006).

## **2.2 Fundamentación Teórica.**

### **2.2.1 Test Antiglobulínico**

#### **2.2.1.1 Generalidades.**

En algunos centros obstétricos se recomienda la determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh, así como la PDC en sangre de cordón umbilical o en las primeras horas de vida. Las variantes de esta práctica incluyen la detección rutinaria a todo neonato, a aquellos con antecedentes familiares o maternos relacionados con EHRN, únicamente en mujeres Rh negativo, cuando la madre es del grupo sanguíneo “O” o en aquellos casos con ictericia en las primeras horas de vida., Esto conduce a que la prevalencia de la PDC positiva en la población neonatal.

La enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) es una afección inmunológica autoinmunitaria en la cual la vida del hematíe está acortada como resultado de la acción de anticuerpos maternos que pasaron a través de la placenta y que son específicos contra antígenos de origen paterno presentes en las células rojas del recién nacido.

La etiopatogenia de la EHRN está basada en la incompatibilidad de grupo sanguíneo madre/neonato, lo que origina el desarrollo de una respuesta inmunitaria en la madre (excepto en la incompatibilidad ABO, donde los anticuerpos están preformados), el paso de anticuerpos de la clase IgG a través de la placenta y su unión a la membrana del hematíe.

De los 30 sistemas eritrocitarios identificados, aproximadamente 60 antígenos son capaces de inducir la enfermedad hemolítica del feto y recién nacido Este trastorno se relaciona principalmente con el antígeno D del sistema Rh y con la incompatibilidad al sistema ABO. En la población indígena de Mesoamérica, el grupo sanguíneo O y Rh positivo se observa en más de 95% de los sujetos estudiados. En nuestra población se encuentra una relación similar, lo que genera una alta tasa de antígenos que podrían generar la reacción al unirse con el anticuerpo específico.

La presencia de C3b y C3d en el eritrocito de los casos con PDC positiva refleja, por un lado, el origen neonatal del complemento y, por otro, la activación incompleta del

sistema del complemento sin generar lisis celular, secundaria a la interacción antígeno-anticuerpo antieritrocitario.

La ictericia es un evento clínico frecuente que afecta con intensidad variable aproximadamente a 15% de la población de recién nacidos. La incompatibilidad a grupos sanguíneos y la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) por anticuerpos antieritrocitarios, presentan cifras de 4 hasta 50% de todos los recién nacidos evaluados por hiperbilirrubinemia. Las causas más frecuentes involucradas en la EHRN continúan siendo la incompatibilidad al sistema ABO y la isoimmunización a RhD. Paulatinamente se ha hecho evidente la participación de anticuerpos dirigidos contra otros antígenos del sistema Rh, como son Rhc, RhC o RhE, u otros sistemas eritrocitarios como el Kell, Diego o Duffy. En nuestro medio, el anti-D es el anticuerpo antieritrocitario más frecuentemente involucrado en la EHRN, pero los otros anticuerpos ocupan de 5 a 15% de los casos.

La hiperbilirrubinemia que apunta hacia la ictericia nuclear ('kernicterus') es el mayor problema. La bilirrubina en la sangre de los recién nacidos afectados por EHRN alcanza normalmente su pico máximo entre las 24 y 48 h después del nacimiento. La prueba de Coombs directa (CD) generalmente es negativa, a pesar de que un anticuerpo IgG anti- A o anti-B puede ser eluido de los eritrocitos del recién nacido. En ocasiones el CD es positivo.

Para el caso del sistema ABO, más de 50 % de las madres del grupo sanguíneo O presentan concentraciones clínicamente significativas de anticuerpos anti-A y anti-B del isotipo IgG. Alrededor de 15- 18% de los embarazos son incompatibles al sistema ABO y corren riesgo de enfermedad hemolítica potencial.

En el caso del antígeno RhD, desde menos de uno y hasta 5% de la población obstétrica es RhD negativo, con tasa de isoimmunización hasta de 15% en hospitales obstétricos. En la estrategia global del estudio de la EHRN, se incluye la determinación de la prueba directa de la antiglobulina humana o prueba directa de Coombs (PDC), ya sea con la técnica clásica de aglutinación en tubo o en gel. Esta prueba permite identificar la presencia de anticuerpos antieritrocitarios del isotipo

IgG, provenientes del suero materno en la superficie de los eritrocitos del feto o neonato. En los casos de incompatibilidad ABO más de 80% la PDC es negativa, pero al efectuar la técnica de levigado o eluído, la reactividad en los resultados de la prueba aumenta en la misma proporción. (GONZALEZ, 2009).

### 2.2.1.2 Importancia Clínica.

Permite demostrar la presencia de anticuerpos incompletos mediante el uso de un segundo anticuerpo, que es una antiglobulina. Su uso es para pruebas de compatibilidad o pruebas cruzadas, detección de anticuerpos humanos, pruebas para la variante del antígeno (Ag) Rho llamado Dhu y pruebas en eritrocitos de cordón umbilical o pacientes transfundidos.

Aunque se han identificado más de 60 antígenos eritrocitarios diferentes capaces de provocar una respuesta inmunitaria en un receptor adecuado, este trastorno se relaciona principalmente con el antígeno D del sistema Rh y con los antígenos ABO del sistema del mismo nombre.

De manera general, los niños afectados requieren como modalidad de tratamiento la fototerapia. La necesidad de exanguinotransfusión es rara (aproximadamente 1:1000 a 1:5000). (VILLEGAS, 2007)

Tabla 1 Incompatibilidad Madre e Hijo ABO.

Grupo sanguíneo ABO		Cantidad de pacientes	%
Madre	Recién nacido		
O	A	28	60,8
	B	18	39,2
Total		46	100

Fuente: (VILLEGAS, 2007)

### **2.2.1.3 Clasificación.**

La prueba de Coombs es un examen de sangre que se usa en inmunología y hematología. Este análisis puede detectar la presencia de anticuerpos en suero que reaccionan con antígenos en la superficie de los glóbulos rojos. Hay dos tipos distintos de la prueba de Coombs: el directo y el indirecto

#### **Coombs Directo:**

El Coombs directo se realiza a pacientes en los primeros momentos de una reacción hemolítica y en el diagnóstico de anemias hemolíticas auto inmunes, hemólisis inducidas por drogas, y enfermedad hemolítica del recién nacido.

La prueba de Coombs directa se utiliza principalmente para determinar si una anemia hemolítica, en la que la tasa de destrucción de los hematíes o células rojas de la sangre es superior a la tasa de producción de las mismas, es debida a la presencia de anticuerpos frente a los hematíes. Esto puede suceder en anemias hemolíticas autoinmunes en las que la persona produce anticuerpos frente a antígenos de sus propios hematíes (anticuerpos).

La prueba de Coombs directa también se utiliza para diagnosticar la enfermedad hemolítica en el recién nacido o feto, debida a incompatibilidad sanguíneo entre la madre y el feto ya que en el momento del nacimiento la madre puede haber quedado expuesta a antígenos de los hematíes del recién y puede haber generado anticuerpos contra los hematíes de su hijo. Este sería el caso de un bebé Rh-positivo cuya madre es Rh-negativo.

Anteriormente, la presencia de anticuerpos frente al antígeno Rh constituía la causa más frecuente de enfermedad hemolítica del recién nacido, si bien actualmente esta situación es rara gracias al uso de tratamientos preventivos administrados a la madre durante y después de cada embarazo. La causa más frecuente de enfermedad hemolítica del recién nacido en la actualidad es la incompatibilidad ABO entre una

madre del grupo O y su bebé. Este tipo de incompatibilidad materno-fetal suele ser leve.

La prueba de Coombs directa también puede utilizarse para evaluar una posible reacción transfusional. Si después de haber recibido una transfusión de sangre se presenta fiebre u otros síntomas o signos sugestivos de una reacción hemolítica transfusional, la prueba de Coombs directa indicará si la persona ha generado anticuerpos contra los hematíes transfundidos. Si se detecta anticuerpos fijados a la superficie de los hematíes, éstos pueden ser destruidos (hemolizados) o eliminados de la circulación antes de lo normal. (Clinical, 2012).

### **Técnica del Coombs Directo:**

Análisis que permite identificar anticuerpos, complemento o ambos, adheridos a la membrana del eritrocito, mediante el uso de anticuerpos contra la gammaglobulina humana (suero de Coombs).

### **Materiales.**

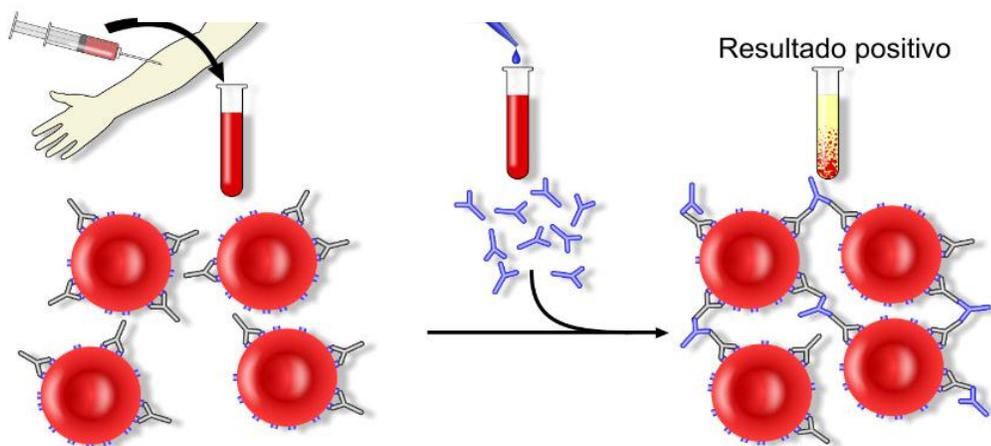
- Tubos 12 x75
- Suspensión de células de receptor
- Solución salina 0,9%
- Marcador
- Pipetas pasteur
- AHG
- Células Control Coombs
- Gradilla para tubos
  
- Termo bloque a 37° C

- Cronómetro

### Técnica.

- Identificar un tubo como CD y el nombre del receptor
- Añadir 1 gota de la suspensión de células del receptor
- Añadir 2 gotas de AHG, mezclar
- Centrifugar 15 segundos a 3000 rpm
- Resuspender los eritrocitos cuidadosamente y realizar la observación macroscópica sobre una fuente de luz indirecta, comprobando si existe aglutinación o hemólisis.
- Las reacciones negativas confirmar con Control Coombs, añadir una gota a cada tubo y mezclar suavemente y centrifugar 15 segundos a 3000 rpm.
- Resuspender los eritrocitos cuidadosamente sobre una lámpara de luz indirecta, comprobando que exista 2 cruces (++) de aglutinación que demuestra que el reactivo AHG utilizado está funcionando adecuadamente.

Figura 1 Representación del Coombs Directo



Fuente: <http://rutasdelasangre.blogspot.com/2014/12/test-de-antiglobulina-humana.html?view=sidebar>

## Interpretación de los resultados

- Una reacción de aglutinación negativa indica que no hay anticuerpos o complemento fijado en la membrana de los glóbulos rojos
- Una reacción de aglutinación positiva indica la presencia de anticuerpos irregulares o complemento fijados en la membrana de los glóbulos rojos. (JARAMILLO, 2012)

Tabla 2 Anticuerpos con significado Clínico.

Clínicamente significativos	Significativos si reaccionan a 37°C	Significativos algunas veces	Clínicamente benignos
ABO	Lea	Yt <sup>a</sup>	Chido/Rodgers
Rh	M, N	G	JMH
Kell	P1	Gy <sup>a</sup>	Knops
Duffy	Lutheran	Hy	Bg
Kidd	A1	At <sup>a</sup>	Xg
SsU	Sda	Colton	Csa
Vel	AnWj	Cromer	Yk <sup>a</sup>
PP1Pk		Dombrock	McC <sup>a</sup>
H (Oh)		Indian	
		Jra	
		Lan	
		LW	
		Scianna	

Fuente: Dra. Fabiana bastos- Universidad Buenos Aires.

## Coombs Indirecto

El test de coombs se realiza por primera vez en la primera consulta de embarazo con el ginecólogo, tanto a las madres Rh positivas como a las Rh negativas. Si el test de Coombs indirecto es negativo se debe repetir entre las semanas 24 y 34 de embarazo, al menos dos veces, para tener la seguridad de que no se han formado anticuerpos anti-Rh positivo en ese tiempo. Si el test de Coombs indirecto es positivo hay que valorar el riesgo que tiene el embarazo y determinar si es necesario realizar transfusiones sanguíneas al feto puncionando el cordón umbilical. El control del embarazo será entonces más estricto, con consultas y ecografías más frecuentes.

Si la madre es Rh negativo y da a luz a un hijo Rh positivo, se debe vacunar a la madre con gammaglobulina humana dentro de las 72 horas siguientes. Esta gammaglobulina hace que la madre no forme anticuerpos anti-Rh positivo y que un próximo embarazo de un bebé Rh positivo carezca de riesgo (SACEDA, 2016)

La prueba de Coombs indirecta se utiliza para detectar anticuerpos dirigidos contra aglutinógenos de grupos sanguíneos de hematíes, distintos de los antígenos ABO. Se realiza siempre que se prevé una transfusión de sangre. Si se detecta algún anticuerpo, debe procederse a una prueba de identificación de anticuerpos para conocer cuál de ellos está presente.

Al verificar la compatibilidad entre donante y receptor, y en el caso de que se detecten anticuerpos, se realiza una prueba de Coombs indirecta modificada. Es importante que la sangre del donante no contenga los antígenos frente a los cuales el receptor presenta ya anticuerpos.

Si alguien presenta una reacción transfusional (inmediata o tardía), el médico solicitará las dos pruebas de Coombs (directa e indirecta) para investigar la causa de la reacción. Una vez se haya resuelto la situación, puede solicitarse nuevamente la prueba indirecta para saber si el paciente ha desarrollado más anticuerpos.

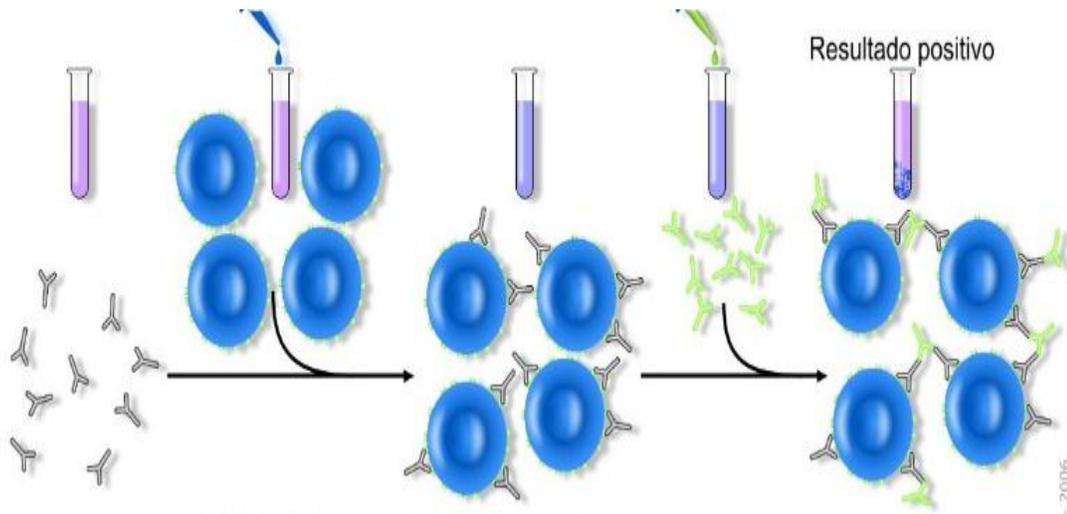
Durante la gestación o embarazo la prueba de Coombs indirecta se utiliza para detectar anticuerpos que podrían atravesar la barrera placentaria o placenta y atacar las células del feto, causando la EHRN (enfermedad hemolítica del recién nacido).

Revisten especial importancia unos anticuerpos de un sistema de grupos sanguíneos conocido como sistema Rh. Una madre Rh negativa puede desarrollar estos anticuerpos si resulta expuesta a hematíes de un recién nacido Rh-positivo. Como prevención, se realiza a todas las madres Rh-negativa una prueba de Coombs indirecta durante el embarazo (a las 28 semanas) y nuevamente en el momento del parto. Si no se detecta anticuerpos Rh a las 28 semanas, se administra a la embarazada una inyección de inmunoglobulina de tipo Rh (Ig-Rh) con la finalidad de

eliminar de su circulación cualquier rastro de hematíes fetales Rh positivos, así se previene el desarrollo de anticuerpos de tipo Rh por parte de la madre.

En el momento del nacimiento se determina el sistema Rh del recién nacido. Si el bebé es Rh negativo, la madre no requerirá ninguna otra inyección de Ig-Rh; si el bebé es Rh positivo y la madre no tiene anticuerpos frente al antígeno D, se le administrará Ig-Rh. Esta prueba también puede realizarse para diagnosticar una anemia hemolítica autoinmune, junto con una prueba de Coombs directa. Esto sucede cuando una persona produce anticuerpos frente a sus propios antígenos, y puede ser el caso de ciertos trastornos autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, de enfermedades malignas como la leucemia linfocítica crónica y de ciertas infecciones como por ejemplo la neumonía por micoplasma y la mononucleosis. También hay quién puede desarrollarla como consecuencia de la toma de ciertos medicamentos, como penicilina. (Chemistry, 2012)

Figura 2 Principio de la Prueba de Coombs Indirecto.



Fuente: <http://rutasdelasangre.blogspot.com/2014/12/test-de-antiglobulina-humana.html?view=sidebar>

**Técnica de Coombs Indirecto:** El rastreo de anticuerpos irregulares también conocido como: coombs indirecto, prueba de antiglobulina indirecta, screening de anticuerpos, células I, II o III, o pantallas I, II, II, permite identificar en suero o

plasma anticuerpos específicos contra algún antígeno de fenotipo conocido de la membrana del eritrocito, mediante el uso anticuerpos contra la gamaglobulina humana (suero de Coombs), excepto del sistema ABO.

### **Materiales**

- Tubos 12 x75
- Suero o plasma del receptor
- Suspensión de células de receptor
- Solución salina 0,9%
- Suspensión de células I
- Suspensión de células II
- Suspensión de células III
- Marcador
- Pipetas pasteur
- LISS
- AHG
- Células Control Coombs
- Gradilla para tubos
- Centrífuga inmunohematológica
- Termo bloque a 37° C
- Cronómetro.

### **1° PASO FASE SALINA.**

- Resuspender suavemente la suspensión de eritrocitos o pantallas I, II y III invirtiendo los frascos varias veces
- Identificar 4 tubos de vidrio limpios como I, II y III, y autocontrol

- Colocar 1 gota de la suspensión de células I, II y III en el tubo correspondiente, y una gota de la suspensión de célula del receptor en el control
- Añadir a cada tubo 2 gotas del suero o plasma del receptor
- Mezclar cuidadosamente e incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar 15 segundos a 3000 rpm
- Resuspender los eritrocitos cuidadosamente y realizar la observación macroscópica sobre una fuente de luz indirecta, comprobando si existe aglutinación o hemólisis.

### **2° PASO FASE DE LISS.**

- Añadir a cada tubo 4 gotas de LISS.
- Agitar suavemente e incubar durante 8 minutos a 37° C.
- Luego centrifugar 15 segundos a 3000 rpm.
- Resuspender los eritrocitos cuidadosamente y realizar la observación macroscópica sobre una fuente de luz indirecta, comprobando si existe aglutinación o hemólisis.

### **3° PASO FASE AHG.**

- Lavar 3 veces el contenido de los tubos con solución salina isotónica eliminando el sobrenadante, luego del 3° lavado, se debe eliminar todo el sobrenadante de tal manera que no queden residuos de salina que puedan interferir con el reactivo de AHG. Cada lavado de 1 minuto a 3000 rpm no llenando total del tubo con solución salina isotónica
- Añadir a cada tubo 2 gotas de AHG.
- Mezclar suavemente y centrifugar durante 15 segundos a 3000 rpm.
- Resuspender los eritrocitos cuidadosamente y realizar la observación macroscópica sobre una fuente de luz indirecta, comprobando si existe aglutinación o hemólisis.
- Las reacciones negativas confirmar con Control Coombs
- Añadir una gota a cada tubo.

- Mezclar suavemente y centrifugar 15 segundos a 3000 rpm.
- Resuspender los eritrocitos cuidadosamente sobre una lámpara de luz indirecta, comprobando que exista 2 cruces (++) de aglutinación que demuestra que el reactivo AHG utilizado está funcionando adecuadamente.

### **Interpretación de resultados.**

- Una reacción negativa indica la ausencia de anticuerpos irregulares detectables en el suero plasma del receptor
- Una reacción positiva indica la presencia de anticuerpos irregulares.
- Cuando se utiliza hematíes reactivos comerciales registrar en la tabla de antígenos y compararlo con el patrón de reacciones y la configuración de antígenos pueden indicar el tipo de anticuerpo presente. Se debe realizar pruebas adicionales para identificar el anticuerpo.
- Una reacción positiva con una o más células reactivas y un autocontrol negativo sugiera la presencia de un aloanticuerpo específico.
- Una reacción positiva con todos los hematíes reactivos y un autocontrol positivo puede deberse a un autoanticuerpo.
- Si existe una reacción positiva con todas las células reactivas y un autocontrol positivos, pero a su vez, se detecta que la reacción positiva con una o varias de las células reactivas es más intensa que la observada en el autocontrol, será preciso descartar en la muestra del paciente la posible presencia de un aloanticuerpo subyacente. (JARAMILLO, 2012)

### **2.2.2. Anticuerpos**

Los anticuerpos son moléculas de peso molecular aproximado de 150 kDa, pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas (Ig). Son moléculas capaces de reconocer otras moléculas, los antígenos.

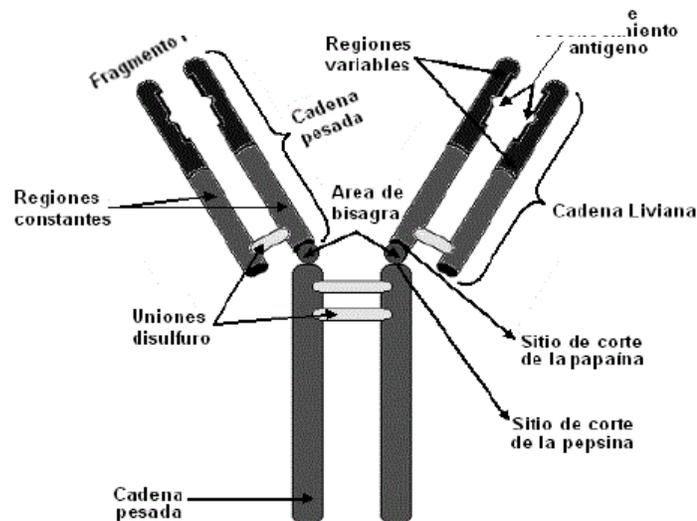
La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo radica en las secuencias variables de sus cadenas proteicas, generadas por recombinación de una serie de "gene cassettes" en el proceso de producción de los linfocitos B durante el desarrollo

embrionario. La combinatoria de estas secuencias puede producir más de un billón de secuencias diferentes. Esta información es almacenada en el 'pool' de linfocitos B presentes en nuestro tejido linfático. La estructura básica de un anticuerpo se llega a esquematizar por estar formado por dos cadenas proteicas pesadas y dos ligeras, unidas por puentes disulfuro. Se dividen en varias clases que se identifican según el tipo de cadena pesada en: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

La acción de enzimas proteolíticas sobre los anticuerpos permite obtener fragmentos que presentan actividades biológicas diferenciales. Los fragmentos obtenidos son:

- **Fc.** Corresponde al extremo C-terminal de las dos cadenas pesadas. Este fragmento está constituido por la región constante de la cadena pesada y es característica de cada clase de inmunoglobulinas. Es en esta región donde radican las funciones efectoras de la molécula como son la fijación del complemento
- **F(ab')<sub>2</sub>.** Corresponde al extremo N-terminal de las dos cadenas pesadas y a las dos cadenas ligeras. Se obtiene por digestión con pepsina. **F(ab).** Corresponde al extremo N-terminal de una cadena pesada y a una cadena ligera, unidas por puentes disulfuro. Se obtiene por digestión con papaina.

Figura 3. Estructura básica de una inmunoglobulina.



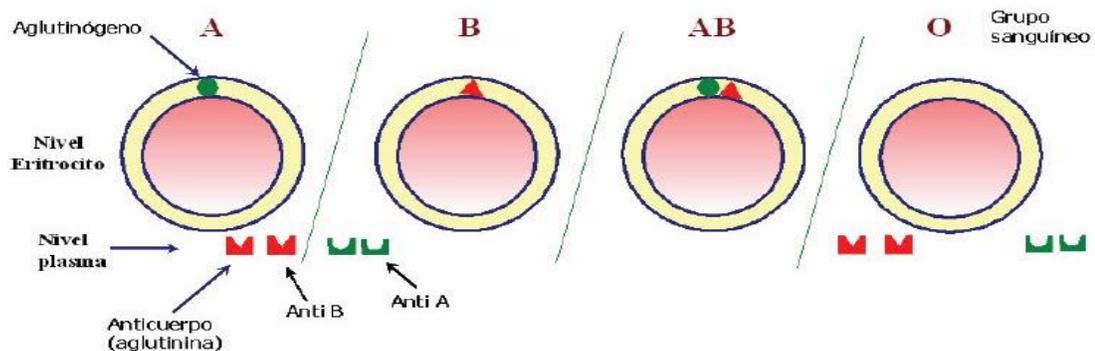
De las distintas clases de inmunoglobulinas las que se encuentran predominantemente en el suero de animales inmunizados son las IgM y las IgG. Las IgM se sintetizan durante la respuesta primaria y se asocian en una estructura pentamérica. Su capacidad de reconocimiento de epítopes es por ello de 10. Las IgG se sintetizan tanto durante la respuesta primaria como secundaria, siendo en esta última donde se consiguen los mayores niveles de producción. Su acción bivalente les permite interactuar con más de una molécula de antígeno. (MARGINI, 1996)

### 2.2.2.1 Anticuerpos Naturales:

Desde los inicios de la inmunología se describen a los anticuerpos naturales aquellos que no necesitan de un estímulo inmunogénico, el cual es reconocido como extraño para el organismo de una persona.

Los anticuerpos anti A y anti B, son producidos por individuos que carecen de los antígenos A y B respectivamente, de acuerdo con la regla que un antígeno y su anticuerpo correspondiente nunca se encuentran juntos en la sangre de la misma persona. Dichos anticuerpos son predominantemente del tipo IgM y también (menos frecuentes y de carácter inmunogénico), del tipo IgG. Este tipo de anticuerpos, puede ser producido por individuos del grupo O.

Figura 4 Esquema de los antígenos y anticuerpos ABO.



Fuente: <http://www.blogdebiologia.com/relaciones-alelicas.html>

Los anticuerpos del sistema ABH, son denominados "naturales", ya que aparecen en las primeras etapas de la vida extrauterina, por exposición a antígenos ubicuos

presentes en superficies bacterianas y ciertos tipos de alimentos, que tienen una composición similar a los antígenos presentes en la membrana de los eritrocitos y producen inmunización. Lógicamente, el reconocimiento primitivo de lo propio a cargo del sistema inmunológico, hace que los anticuerpos que se produzcan no sean de los antígenos correspondientes al mismo individuo. Los anticuerpos del sistema ABH, pueden reaccionar a la temperatura corporal y activar al complemento, causando una rápida destrucción intravascular de los hematíes. (COOP, 2012)

Tabla 3. Esquema sistema ABO.

<b>Grupo de sangre</b>	<b>Antígeno presente en glóbulos rojos</b>	<b>Anticuerpo presente en el plasma</b>
<b>A</b>	A	Anti B
<b>B</b>	B	Anti A
<b>AB</b>	AB	No presenta anticuerpos
<b>O</b>	-	Anti A y B

Fuente: [www.google.com.ec/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source](http://www.google.com.ec/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source)

### 2.2.2.2 Anticuerpos Irregulares:

Son el resultado de la exposición a antígenos desconocidos por el individuo al momento de la transfusión o en las mujeres por el embarazo. Son generalmente inmunoglobulinas G, las cuales producen hemólisis extravascular en el bazo o en el hígado mediante fagocitosis del complejo eritrocito más anticuerpo. Estos anticuerpos son dirigidos contra antígenos de sistemas diferentes al ABO.

Los anticuerpos 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 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 exanguinotransfusión.

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.

Figura 5. Medio de Reacción de aglutinación.



Fuente: <http://es.slideshare.net/cepecaptrujillo/1-inmunohematologia-52874514>

**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.

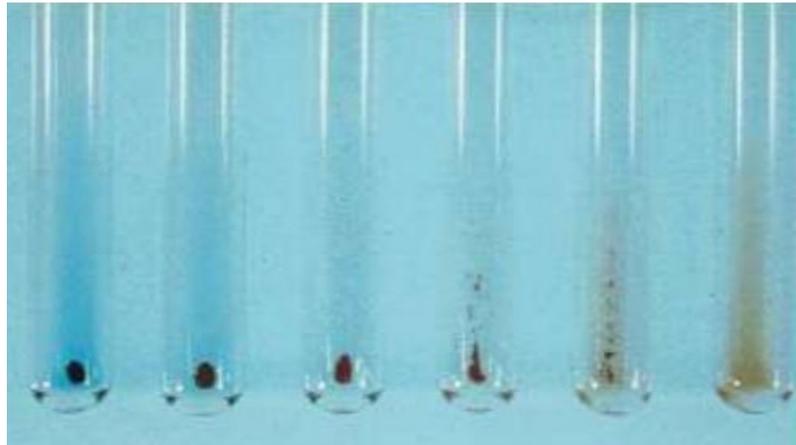
**Enzimas:** potencializan la reacción antígeno anticuerpo reduciendo la superficie de carga y removiendo estructuras que interfieren en el acceso de las moléculas del anticuerpo.

**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. (LUNA, 2005)

Figura 6. Marcadores de Reacción de anticuerpos irregulares.

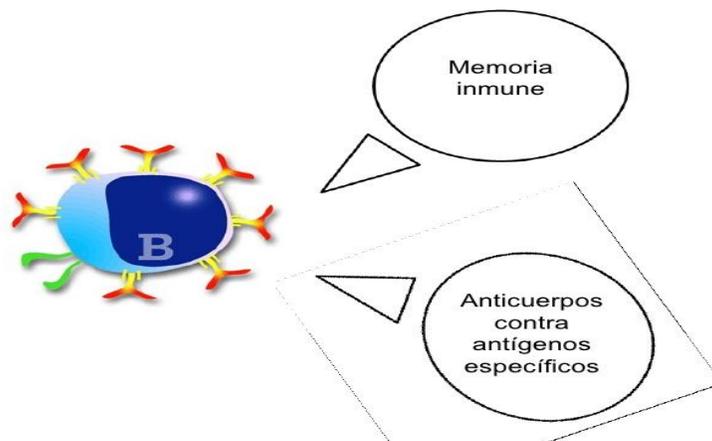


Fuente: <http://es.slideshare.net/cepecaptrujillo/1-inmunoematologia-52874514>.

### 2.2.2.3 Anticuerpos Monoclonales.

Son inmunoglobulinas provenientes de un solo clon de linfocitos B y por lo tanto de idéntica porción variable y específica, esos anticuerpos pueden actuar como como anticuerpos neutralizantes o inducir funciones efectoras a través de sus fragmentos Fc, otros intervienen en el crecimiento de células tumorales, otras defunciones es intervenir en la activación de la vía clásica del complemento. (GEFFER, 2013)

Figura 7. Anticuerpo Monoclonal.



Fuente: <http://es.slideshare.net/giancharly/anticuerpos-monoclonales>

Se describen los antecedentes y el estado actual de los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-Rh(D). Estos AcM han dado lugar a una vía alternativa de producción de reactivos hemoclasificadores no dependientes de la inmunización deliberada de humanos basada en la tecnología de hibridomas. Los AcM contra el antígeno D son imposibles de obtener en roedores por la poca inmunogenicidad de este antígeno en dichas especies, pero los linfocitos B de los humanos sensibilizados con hematíes Rh(D) positivos pueden producir anticuerpos anti-Rh(D) en cultivo de tejidos después de la infección y la transformación de las células con el virus de Epstein Barr (VEB). No obstante, la complejidad de esta obtención viene dada por la existencia de individuos con hematíes con fenotipos D débiles ( $D^U$ ) que tienen una expresión cualitativamente menor del antígeno y los D parciales (variantes de D) (categorías) donde el antígeno se puede presentar incompleto, ya que carecen de uno o más epítopes del mosaico D "normal", que posee más de 30. Para lograr una especificidad adecuada de un reactivo basado en AcM, este debe reconocer varios epítopes de los más comunes, y usualmente se prefiere una mezcla de anticuerpos clase IgG e IgM. Gracias a la nueva generación de reactivos anti-Rh(D) basados en AcM se ha incrementado la proporción de individuos previamente reconocidos como  $D^U$ , que ahora son agrupados por pruebas directas de hemaglutinación como Rh(D) francamente positivos.

Una de las dificultades en la clasificación parcial de los hematíes D es la escasez de reactivos adecuados, los cuales se han obtenido del suero de individuos con fenotipos parciales de D que se han aloinmunizado anti-D, o a través de los AcM. Aunque los primeros AcM humanos clase IgG obtenidos en el mundo no fueron superiores a los sueros policlonales y fallaban en la detección de los fenotipos D débiles y de las variantes D,<sup>32</sup> la obtención de AcM clase IgM anti-D estables, como los clones MAD-2 y FOM-1<sup>33</sup> provocó un cambio radical en la serología del sistema Rh. Estos AcM dieron lugar a reactivos con altos títulos de anticuerpos, que trabajan bien tanto a temperatura ambiente como a 37 °C, que unidos a los AcM clase IgG, desarrollados al final de la década del 80, han convertido a los hemoclasificadores basados en AcM

humanos en los productos de elección para la clasificación sanguínea en el sistema Rh.

En relación con los requerimientos de especificidad, por la complejidad del antígeno Rh(D), muchos consideran que un buen hemoclasificador no se debe elaborar sobre la base de un solo AcM, sino que es preferible una mezcla, por lo que hay que evaluar mediante la prueba de antiglobulina (prueba de Coombs) la presencia de la variante  $D^U$  en casos críticos del estudio del grupo Rh(D) negativo y utilizar células  $D^U$  en el panel celular, para la generación de reactivos basados en AcM anti-Rh(D), con vistas a monitorear su calidad.

Con la nueva generación de AcM reactivos anti-Rh(D) se ha incrementado la proporción de individuos previamente reconocidos como  $D^U$  (débil D, positivo por prueba de antiglobulina indirecta) que ahora son agrupados por pruebas directas de hemaglutinación como Rh(D) francamente positivos. Sin embargo, el primer requisito de un reactivo anti-Rh(D) debe ser que de forma segura y sin ambigüedades aglutine a los hematíes que aparentemente expresan un complemento completo de epítopes D, por lo cual la mayoría de los expertos considera que la prueba de antiglobulina indirecta no es ya esencial para la detección de los débiles D positivos ( $D^U$ ), siempre que se usen AcM que reconozcan a esta expresión, aunque para obtener la licencia o registro sanitario no es necesario que los reactivos anti-Rh(D) detecten a todas las variantes de hematíes D débiles o parciales. Se insiste en la necesidad de un panel celular internacional para la evaluación definitiva de estos reactivos y la obtención de AcM en diferentes países, lo que sin dudas contribuirá a su más rápida creación. (JIMENEZ, 2009)

#### **2.2.2.4 Anticuerpos Policlonales**

Son anticuerpos derivados de diferentes líneas de células B, los linfocitos encargados de la respuesta ante elementos ajenos (antígenos) mediante anticuerpos. Los anticuerpos policlonales son una mezcla de inmunoglobulina, secretados en contra de

un antígeno específico, cada una reconociendo diferentes epítomos.

Habitualmente se obtienen de lo que se denomina un antisuero. Obtenido de la inyección reiterada de un antígeno en un animal, con el fin de generar una respuesta inmune. De este animal se toma una muestra de sangre y de esta muestra es obtenido el suero que finalmente es purificado para obtener la variedad de anticuerpos policlonales de interés.

El antígeno Rh(D) también es responsable de la enfermedad hemolítica del recién nacido (HDN, del inglés Haemolytic Disease of the Newborn). Este estado se origina en niños recién nacidos de Rh(D+) de madres de Rh(D-) previamente sensibilizadas al antígeno Rh(D) como resultado de atravesar la placenta, los anticuerpos IgG anti-Rh(D), durante el embarazo y provocar la destrucción de los RBC fetales. La sensibilización de la madre de Rh(D-) al antígeno Rh(D) se produce, a menudo, durante el nacimiento de un primer niño de Rh(D+), debido a algunos RBC que entran en la circulación materna y son reconocidos como extraños, por el sistema inmune materno. Para reducir la incidencia de la HDN, es una práctica de rutina en el Reino Unido, y en otros muchos países, dar anticuerpos anti-Rh(D) a las madres de Rh(D-) inmediatamente después del nacimiento de un niño de Rh(D+), de forma que cualquier RBC con Rh(D+) que haya podido entrar en la circulación materna sea eliminado rápidamente.

Por el momento, se usan, rutinariamente, dos protocolos de diagnóstico. Un ensayo implica la aglutinación indirecta con una IgG anti-D. Estos anticuerpos se conocen como “incompletos”; no consiguen aglutinar los RBC de Rh(+ve) en suspensión salina.

Tradicionalmente, se ha superado este problema mediante la adición de los, así llamados, potenciadores. Estos son polímeros biológicos, tales como albumina de bovino, o polímeros no biológicos, tales como polivinilpirrolidona, que modifica la superficie y permite a las células ser aglutinadas mediante el reactivo IgG.

No obstante, estos potenciadores dan, a veces, una falsa reacción positiva al provocar la aglutinación no específica de los glóbulos rojos revestidos con IgG, como ocurre en ciertas enfermedades, por ejemplo en la anemia hemolítica autoinmune.

En consecuencia, cuando se usa este tipo de reactivo, se debe realizar, en paralelo con cada ensayo, un control del reactivo que contiene solo el potenciador pero no anti-D, lo cual es costoso, tanto para el fabricante, como para el usuario, puesto que el ensayo requiere incubación prolongada.

En un método alternativo de aglutinación indirecta, un segundo reactivo que se puede usar para aglutinar los RBC revestidos con anti-D, es el suero anti-inmunoglobulina (Reactivo de Coombs), que sirve para reticular las moléculas de IgG unidas a diferentes RBC.

El otro ensayo utiliza anticuerpos IgM contra el Rh (D), que, debido a su naturaleza multivalente, son aglutininas directas. Las IgM anti-D policlonales, que se producen de forma natural, tienen las desventajas de que la reacción de aglutinación es prolongada y de que son difíciles de obtener. Algunas IgM anti-D monoclonales humanas están disponibles, y se pueden usar como reactivos, pero tienen la desventaja de que reaccionan pobremente, o nada en absoluto, con ciertos glóbulos rojos con variantes de D. (Scott, 2009)

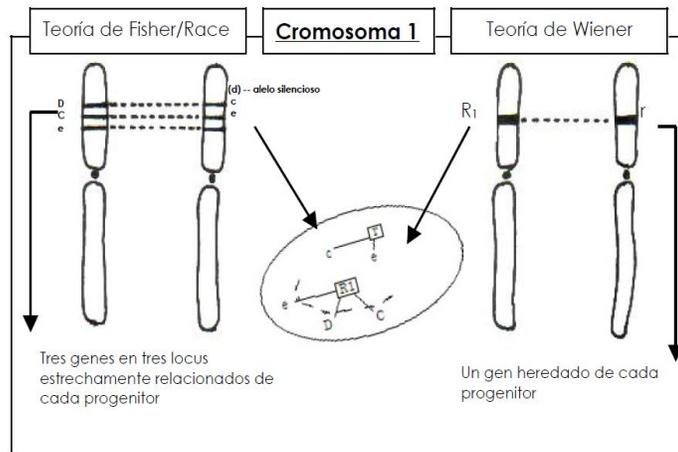
### **2.2.3 Sistema de Grupo Sanguíneo Rh.**

El conocimiento científico de los grupos sanguíneos constituyó un gran avance hacia la dilucidación del mecanismo de algunas enfermedades hereditarias y esclarecimiento de maternidades dudosas, pero por sobre todas las cosas fue una conquista terapéutica que permitió la transfusión de sangre entera sin riesgos.

Los grupos sanguíneos se transmiten hereditariamente. Para los diferentes sistemas, que incluyen genes (alelos) dominantes, codominantes y recesivos, se conocen más de 300 antígenos en la superficie del glóbulo rojo. La interacción de un enorme número de locus y alelos implica una alta posibilidad de recombinación y expresión.

Actualmente habría más de 500.000 millones de fenotipos posibles y se cree que con los aún no descubiertos, esa cifra sea de billones (gran polimorfismo).

Figura 8. Alelos del Sistema Rh.



Fuente: Gargiulo Daniel- Sistema Rh.

En 1940 Landsteiner y Wiener efectuaron comunicaciones en el sentido que si inyectaban eritrocitos de mono Rhesus a conejos o cobayos, estos animales producían un anticuerpo que, después de su absorción, aglutinaban los eritrocitos de un 85% aproximadamente, de personas norteamericanas de raza blanca. Denominaron a este anticuerpo anti - Rh (Rhesus) y el antígeno que se detectaba recibió el nombre de antígeno Rh. Poco antes de esto Levine y Stetson habían encontrado un anticuerpo en el suero de una mujer del grupo O, que antes no había sido transfundida, que presentó una reacción después de recibir una transfusión de sangre del Grupo O de su marido. Más tarde la paciente dio a luz un feto macerado, y estos autores sugirieron que había producido un anticuerpo para un antígeno eritrocítico fetal heredado del marido. Al parecer los anticuerpos humanos y animales eran idénticos, y por lo tanto se aceptó el nombre de anti - Rh para el anticuerpo humano. Más tarde se vio que los dos anticuerpos no eran iguales y por tal motivo continuó denominándose anti - Rh al anticuerpo humano y se le dio el nombre de anti - LW al anticuerpo animal en honor a Landsteiner y Wiener, sus descubridores. (PETRIDES, 2005).

Los antígenos del sistema Rh son algunas veces responsables de reacciones por transfusión menos severas que el ABO. Son proteínas y rara vez se encuentran en el medio, de modo que los anticuerpos preformados son raros. Los genes que codifican los antígenos del sistema Rh están localizados en el brazo corto del cromosoma 1.

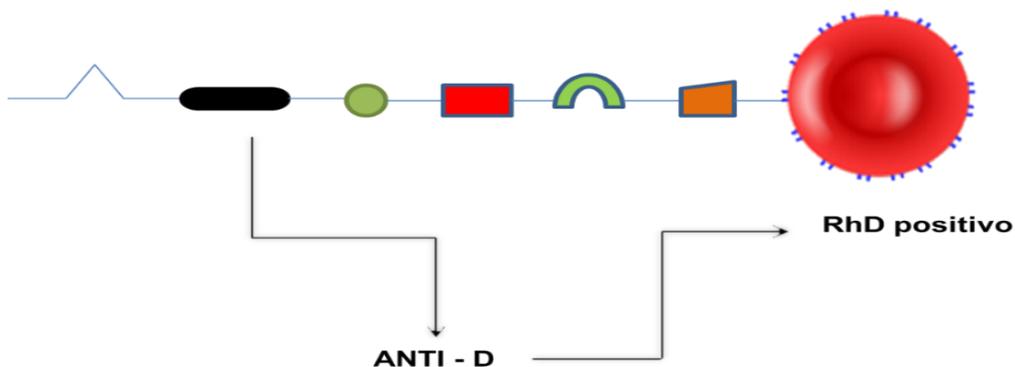
Este sistema se llama Rh, porque inicialmente se atribuyó a un antígeno detectado en el mono Rhesus, los términos Rh positivo y negativo se refieren a la presencia o ausencia del antígeno D, el más inmunogénico de los antígenos después de los ABO. (PETRIDES, 2005)

### 2.2.3.1 RhD Total

A diferencia del sistema ABO, en el sistema Rh-Hr no existen aglutininas (o anticuerpos) naturales y cuando se presentan son el resultado de una inmunización previa.

El antígeno Rho (D), después de los antígenos ABO, es el más importante en la práctica de transfusión. Aproximadamente 75% de las personas Rho (D) negativo desarrollan ante D al ser expuestos a eritrocitos Rho (D) positivo. (GARGIULO, 2005)

Figura 9. Rh D Total o Completo.



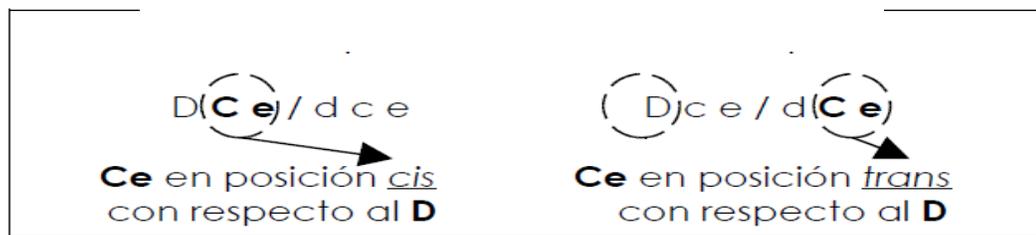
Fuente: (JARAMILLO, 2012)

Rh positivo indica la presencia de Rho (D) en el fenotipo. Rh negativo indica ausencia de Rho (D) en el fenotipo. Existe la posibilidad del Rh nulo (Rh null), rarísimo; esta sangre no reacciona con ninguno de los antisueros Rh descritos y puede considerarse como ausencia de estos antígenos en los eritrocitos de la persona. (GARGIULO, 2005).

### 2.2.3.2 RhD. Débil.

Investigaciones realizadas con anticuerpos monoclonales demostraron que el antígeno D es un mosaico compuesto por varios epítopes diferentes lo que ocasiona variables antigénicas de tipo cuantitativas y cualitativas que dan origen a los fenotipos D débiles y D parcial respectivamente.

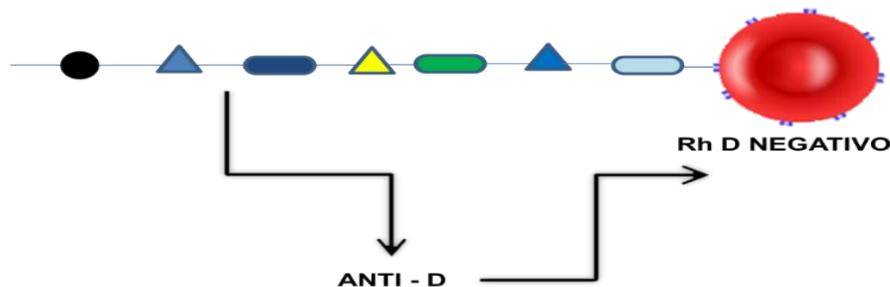
Figura 10. RhD Débil.



Fuente: (GARGIULO, 2005)

Los eritrocitos de fenotipo D débil poseen un número menor de sitios antigénicos, puede deberse a un gen que produce menor cantidad de antígeno

Figura 11. RhD - Débil.



Fuente: (JARAMILLO, 2012)

Estos casos no se tratan de una diferencia cualitativa sino debido puramente a una menor cantidad de sitios antigénicos, el término Du propuesto por Stratton en 1949, debe ser abolido y reemplazado por el de D débil.

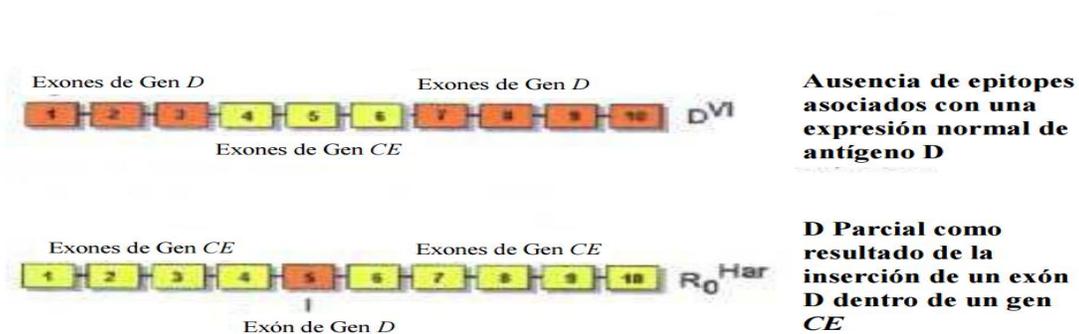
Algunos fenotipos D parcial pueden presentar una disminución cuantitativa del antígeno D, pudiendo ser erróneamente clasificados como D débil, debido a que la identificación de éste fenotipo depende fundamentalmente del reactivo "anti D (Rho)" y del método utilizado para su investigación.

Se deberían tomar precauciones al realizar la vieja técnica del Du (terminar, luego de la incubación con reactivo anti-D, con SAGH - PAI) ya que puede llevar a tipificar erróneamente a un dador/paciente Rh negativo, portador de un auto o aloanticuerpo, cómo Rh positivo (Du Positivo).- Por este motivo algunos autores abogan por el abandono en forma definitiva de esta prueba.

### 2.2.3.3. RhD. Parcial

Se descubrieron algunos raros casos en que individuos, que habían sido fenotipados cómo Rh positivos, es decir son portadores del antígeno D igual se sensibilizaban (producían anticuerpos anti-D) al ser estimulados con glóbulos rojos portadores de dicho antígeno (transfusiones – embarazos)

Figura 12. Variante RhD - Parcial.



Fuente: [lideplayer.es/slide/118043/](http://lideplayer.es/slide/118043/)

Estudios posteriores demostraron que los eritrocitos con este fenotipo se caracterizan por la ausencia de uno o más epitopes del mosaico que componen el antígeno "D", de ahí la capacidad de producir aloanticuerpos específicos hacia él o los epitopes faltantes, al ser inmunizados con glóbulos rojos Rh D positivo. (GEFFER, 2013)

Tabla 4. Categoría RhD - Parcial

Categ. I		Obsoleta - presencia transitoria de anti-D
Categ. II		No se pudo obtener suero para terminar su estudio
Categ. III	a)	Los reactivos monoclonales de uso corriente no diferencian a éstos de un D normal
	b)	
	c)	
Categ. IV	a)	
	b)	
Categ. V	a)	Los reactivos monoclonales de uso corriente no lo reconocen como una variante del antígeno D - Suelen ser detectados en la fase de la antiglobulina
	b)	
	c)	
<b>Categ. VI</b>		<b>Carecen de la mayoría de los epitopes del antígeno D Pertenece a esta categoría aproximadamente el 0,002 % de la población blanca, y se encuentra asociado mayoritariamente a Ce. La mayor parte de los individuos producen anti-D de significación clínica (EHFN - RHT) y sus eritrocitos no reaccionan en las pruebas directas con los reactivos anti-D comunes_</b>
Categ. VII		Se asocia a la presencia del antígeno Targett (Rh 40)

Fuente: (Chemistry, 2012)

#### 2.2.3.4 Otros antígenos Rh.

Después del "D" los antígenos C, c, E y e son los de mayor importancia en el Sistema, estos 5 antígenos son los responsables de más del 99% de los problemas clínicos relacionados con dicho sistema; ya que algunos individuos que carecen de la expresión de alguno de ellos, pueden cuando son inmunizados, producir anticuerpos contra el antígeno faltante.

Tabla 5. Otros Antígenos Rh.

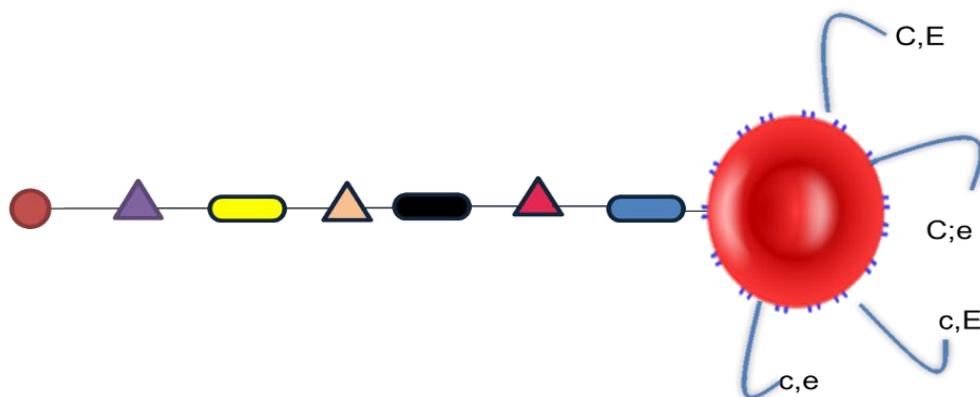
Denominación del antígeno				FRECUENCIA
Fisher-Race	Wiener	Rosenfield	ISBT	
D	Rho	RH 1	004-001	83,16 %
C	rh'	RH 2	004-004	67,83 %
E	rh''	RH 3	004-005	28,68 %
d	hr <sub>0</sub>	----	----	65,24 %
c	hr'	RH 4	004-002	81,28 %
e	hr''	RH 5	004-003	97,59 %

Fuente: (GARGIULO, 2005)

### Antígenos "C" y "c"

El antígeno "C" tiene una frecuencia aproximada del 68% en la población general, frente a una frecuencia del 81% del antígeno "c", este último es el más inmunógeno luego del D y como tal es causante de riesgo en la E.H.F.N.

Figura 13. Otros Antígenos Rh.



Fuente: (JARAMILLO, 2012)

## Antígenos "E" y "e"

El antígeno "E" tiene una frecuencia del 27% en la población general mientras que el "e" ronda cercano al 98%.

Algunos antígenos significativos de baja frecuencia

- **Cw** (originariamente denominado Willie) ubicado con el N° Rh 8, es producido por un gen Cw/C o Cw/c puede ocasionar EHFN.
- **EW** es mucho más raro, ubicado como Rh 11
- **Ce** o Rh 10 es un antígeno compuesto, producto de la unión de genes ya que se encontró un anticuerpo no separable anti-Ce cuando se encuentra en posición *cis* -Dce o dCe- (Ro o r').
- **ce**, antígeno "f" o Rh 6 al igual que el anterior determina un componente antigénico cuando ambos se encuentran en posición *cis*.
- **CE**, antígeno Jarvis o Rh 22 es producto de genes DCE y dCE (Rz y ry). (RODRIGUEZ, 2014)

### 2.2.4 Preparación de células control coombs.

#### 2.2.4.1 Células comerciales control coombs.

Figura 14. Células de control coombs comercial.



Fuente: <http://www.grupolabca.com.mx/laboratorios%20clinicos/Licon/banco%20de%20sangre>

Las células rojas reactivas se emplean en bancos de sangre y servicios de transfusiones como control analítico ante un resultado negativo de la prueba de antiglobulina humana, se adicionan a todas las pruebas de antiglobulina indirecta que en la fase de coombs han dado un resultado negativo. Cada vial contiene 10 ml de una suspensión de células a concentración del 4-6%

Su uso no es universal en nuestro medio debido, fundamentalmente, a la disponibilidad insuficiente de células comerciales y a la corta durabilidad de las células preparadas por el propio laboratorio.

Los métodos usualmente empleados en el laboratorio de inmunohematología evidencian la reacción entre un anticuerpo y su antígeno correspondiente a través de la aglutinación con el empleo de reactivos que pueden agruparse en cuatro grupos básicos: células rojas reactivas, antiseros que contienen anticuerpos dirigidos a antígenos específicos, suero de antiglobulina humana (AGH) –que detectan inmunoglobulinas y/o complemento.

Las células para el control de coombs (CC) son células rojas humanas del grupo O Rh positivo recubiertas con anticuerpos de la clase IgG anti D. Se añaden a cualquier resultado de prueba antiglobulina humana negativa, se centrifuga y luego se comprueba la aglutinación. El resultado debe ser positivo después de la adición de las células control de coombs.

Estas células «check» permiten asegurarse de que el procedimiento se ha realizado correctamente. Si las células control de coombs no hacen la reacción positiva, la prueba no es válida. Dentro de las posibles causas de este resultado podrían citarse el no haber añadido el suero AHG a los tubos, el lavado inadecuado de las células o el deterioro del reactivo de AHG, entre otras.

Es por ello que la utilización de estas células en las pruebas de laboratorio que empleen el suero de coombs como reactivo principal son requeridas en los estándares para bancos de sangre y servicios de transfusiones de la Asociación Americana de

Bancos de Sangre (AABB), por constituir un sistema de control analítico ante un resultado negativo de la prueba de antiglobulina humana. A pesar de ello, su empleo no es universal en nuestro medio debido, fundamentalmente, a la disponibilidad insuficiente de células comerciales y a la corta durabilidad de las células preparadas por el propio laboratorio.

Estas células comerciales esta preparadas:

- Se utilizaron eritrocitos O de fenotipo conocido (cc D Ee K-) proveniente de un donante regular de células.
- El plasma hiperinmune anti D con título de anticuerpos 1/32 se obtuvo de un dador habitual de plasma por aféresis productiva; ambos, negativos a pruebas virológicas establecidas.
- Se preparó un concentrado de eritrocitos lavados (CEL) a partir de una unidad de sangre total siguiendo procedimientos establecidos, separándose al final en dos unidades de 100 mL cada una.
- Se adicionó gentilmente el doble de volumen de plasma anti D a cada bolsa de CEL, se incubaron en baño maría a 37 oC por espacio de una hora.
- Se lavaron seis veces en solución salina a 0.9% y se preparó una suspensión de hematíes entre 3 y 5% en solución SAGM.
- Se almacenó en las propias bolsas plásticas a 4 °C, tomándose muestras para la evaluación inicial y periódica de la calidad. (SANCHEZ, 2014)

#### **2.2.4.2 Células control coombs caseras.**

##### **Muestra:**

Sangre Toral (CPDA1) del grupo “O” RhD positivo (CcDEe), (cDEe), (ccDeE).

##### **Materiales:**

- 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

**Preparación de la muestra:**

- Se prepara un pool de células que contengan el antígeno D.
- Centrifugamos por 10 minutos a 3000 rpm.
- Retiramos el sobrenadante (plasma) por aspirado con pipeta pasteur.
- Lavamos por tres ocasiones el volumen obtenido del paquete globular con solución salina al 0.9%.
- Agregamos reactivo Anti-D monoclonal y policlonal en tubos diferentes la misma cantidad de células empaquetadas obtenidas después del lavado con solución salina, (5 ml de paquete globular con 5 ml de Anti-D)
- Incubamos a 37° C por 30 minutos homogenizando continuamente hasta llegar al tiempo límite de incubación.
- Lavamos los hematíes de 4 a seis veces para retirar el Anti-D no fijado a los hematíes.
- Preparamos una suspensión con SAG MANITOL al 5% añadiendo así por ejemplo colocamos 1 ml de SAG MANITOL por cada 50 ul de glóbulos lavados y sensibilizados.
- Colocar en un gotero con fecha, hora y nombre de la persona responsable de la preparación.

**Conservación:**

- 2 a 6 °C.

### Controles:

- Registro de temperatura diaria por lo menos tres veces al día.
- Valoración del aspecto: Células hemolizadas; SAG transparente o turbio.
- Intensidad de reacción en control diario: 3 y 2 cruces indicativo de una buena estabilidad del reactivo.
- Intensidad de 1 o cero cruces indicativo de la pérdida de estabilidad y poder de reacción.

### 2.2.4.3 Representación de la preparación de células reactivas.,

#### Obtención de sangre total.

Figura 15. Donación de la muestra de sangre.



Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Donaci%C3%B3n\\_de\\_sangre](https://es.wikipedia.org/wiki/Donaci%C3%B3n_de_sangre)

#### Cantidad de muestra de sangre y anticoagulante CPDA-1.

Tabla 6. Relación muestra y anticoagulante.

Sangre Recolectada	CPDA-1
5 ml	0.7 ml
10 ml	1.4 ml
450 ml	63 ml

Diseño: Karla Allauca.

**Preparación del pool de células recolectadas:**

Figura 16. Pool de Células



Diseño: Karla Allauca.

**Retiro del plasma por aspirado.**



Diseño: Karla Allauca.

## Agregamos reactivo anti-D

Figura 17. Reactivo Anti-D para sensibilizar Hematíes



Diseño: Karla Allauca.

## Preparación de suspensión con SAG – MANITOL.

Figura 18. Preparación de la suspensión con SAG MANITOL.



Diseño: Karla Allauca.

## Ensayo positivo de una prueba de coombs.

Figura 19. Principio del ensayo de coombs



Diseño: Karla Allauca.

## Ensayo negativo de una prueba de coombs.

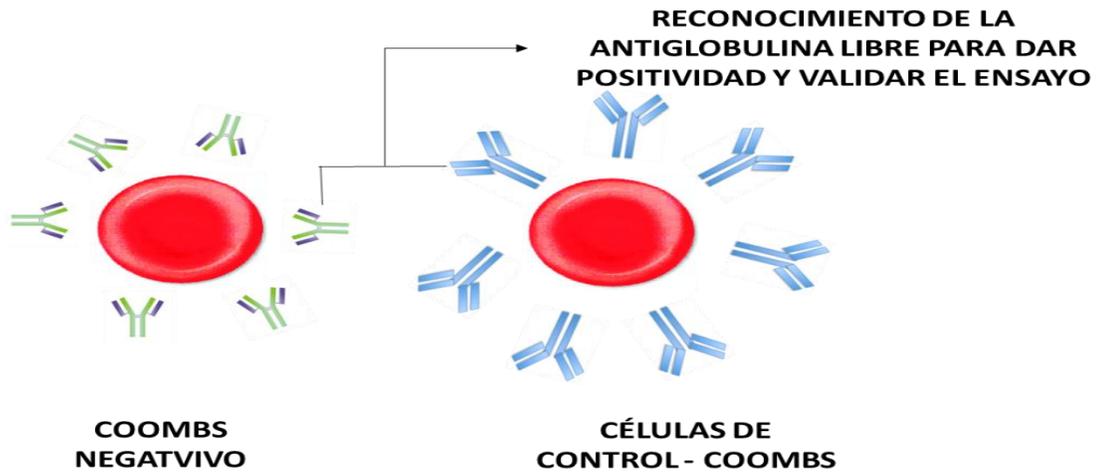
Figura 20. Ensayo negativo de Coombs.



Diseño: Karla Allauca.

## Acción de las células control coombs.

Figura 21. Validación de los ensayos de Coombs



Diseño: Karla Allauca.

### 2.3 Definición de términos básicos.

1. **Aglutinación.-** Proceso por el cual los glóbulos rojos se unen y ligan entre sí.
2. **Albumina.-** Principal proteína del plasma.
3. **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.
4. **Antígeno.-**Cualquier sustancia reconocida por el organismo como extraña, que estimula una respuesta inmune.
5. **Aféresis Terapéutica:** es el procedimiento por el cual se extrae selectivamente, *ex vivo*, un componente sanguíneo con características patológicas, con fines terapéuticos.
6. **Aféresis:** es el procedimiento por medio del cual, en forma manual o mecánica, se extrae selectivamente, *ex vivo*, un componente sanguíneo con restitución de los demás componentes de la sangre.
7. **Aloinmunización:** es la generación de aloanticuerpos (o anticuerpos irregulares o isoanticuerpos) contra antígenos, generalmente de las células sanguíneas, como consecuencia de transfusión o embarazo anterior.
8. **Alta o ingreso a stock** de los hemocomponentes: es el proceso de verificación del cumplimiento correcto de todas las etapas de calificación y rotulado de los hemocomponentes y su pase de una heladera de tránsito (no apta para transfundir) a una heladera de stock disponible (apta para transfundir).

- 9. Anticuerpos naturales** (o isoinmunes): son los anticuerpos que están presentes en el suero del individuo sin la evidencia de un estímulo antigénico previo. En el momento actual se sabe que los anticuerpos “naturales” dirigidos contra antígenos eritrocitarios son consecuencia del reconocimiento de estructuras antigénicas compartidas con bacterias del tubo digestivo.
- 10. Aseguramiento de la calidad:** es el conjunto de evaluaciones efectuadas en el proceso de producción de un bien o servicio con objeto de lograr la garantía de calidad propuesta.
- 11. Auditoría de la transfusión:** es la fiscalización del uso adecuado y racional de los hemocomponentes y hemoderivados dentro de una institución sujeto a directivas previamente establecidas.
- 12. Autoanticuerpos:** son anticuerpos generados por un individuo dirigidos contra antígenos de los tejidos del propio individuo.
- 13. Autoexclusión:** en el contexto de la donación de sangre o hemocomponentes es la oportunidad que se le brinda al donante de abstenerse de donar sangre o si ha donado sangre de que la misma no sea utilizada con fines transfusionales. Si la autoexclusión es efectuada de forma tal que el donante no se da a conocer en el momento de expresar su voluntad de autoexclusión (mediante un sistema informático codificado o mediante el depósito de la expresión de su voluntad en una urna) se dice que la misma es confidencial (CUE: Confidential Unit Exclusion).
- 14. Autosuficiencia:** aplicado a la organización de la transfusión de sangre, se define como la obtención de la satisfacción de todas las necesidades de sangre, hemocomponentes y hemoderivados de la población, con los recursos de la propia población y por medio de los recursos de la propia organización.

**15. Componentes.-** Cualquier componente sanguíneo que contiene glóbulos rojos: eritrocitarios: ej. concentrado de glóbulos rojos, glóbulos rojos en soluciones aditivas y glóbulos rojos empacados.

**16. Baja De Stock:** es el retiro de una unidad para su transfusión o descarte.

**17. Banco De Sangre:** es la institución que se encarga de la promoción de la donación de sangre, la selección de donantes, la extracción de sangre entera o hemocomponentes de aféresis, procesamiento, calificación inmunohematología, calificación serológica, crio preservación, conservación, distribución y control de calidad de los productos y los servicios.

**18. Bioseguridad:** es la prevención de riesgo biológico aplicado al entorno de la Unidad de Medicina Transfusional. Se aplica al personal, donantes y pacientes.

**19. Calificación o tamizaje serológico:** es el análisis de los marcadores infecciosos transmisibles por transfusión aplicada a una muestra de sangre obtenida de cada donante.

**20. Categoría de un servicio de hemoterapia:** está dado por la complejidad de las funciones que cumple y la infraestructura de equipamiento, planta física y recursos humanos con la que cuenta.

**21. Concentrado plaquetario (CP):** es el hemocomponente que contiene la fracción de la sangre entera rica en plaquetas, suspendidas en aproximadamente 50 ml de plasma. Promediamente contiene  $5,5 \times 10^{10}$  plaquetas por unidad.

- 22. Concentrado plaquetario de donante unico (CPDU):** es el hemocomponente obtenido por aféresis a un solo donante, que contiene promedialmente 3,0 10<sup>11</sup> plaquetas en unos 300 ml de plasma.
- 23. Conducta de riesgo:** en el contexto de la selección de donantes y con referencia a la posibilidad de padecer una enfermedad infecciosa transmisible por transfusión, se refiere a la conducta o actitud que se sabe expone al individuo al contagio.
- 24. Consejería:** es la entrevista médica por la cual se informa al donante seropositivo la afección detectada. El asesoramiento es efectuado en forma confidencial, debiendo asegurarse la adecuada comprensión de la información ofrecida, con el objeto de que éste se abstenga de donar sangre, conozca el mecanismo de transmisión para que adopte las medidas del caso con su pareja sexual y se dirija al centro asistencial correspondiente para recibir la necesaria atención médica.
- 25. Consentimiento informado o consentimiento legal:** es el documento firmado por un donante o receptor por el cual otorga su consentimiento al procedimiento invasivo que se pretende realizar, luego de una exhaustiva explicación del procedimiento y luego de asegurarse que la explicación dada ha sido comprendida.
- 26. Contrato de fraccionamiento:** es el acuerdo comercial por el cual un Laboratorio o Planta de Fraccionamiento de Plasma lleva a cabo el fraccionamiento del plasma humano para un Banco de Sangre recolector.
- 27. Control de calidad externo o auditoría:** es la evaluación realizada por un agente externo a cada Unidad de Medicina Transfusional de los análisis o ensayos que ésta efectúa. Tiene por objeto verificar que las técnicas, reactivos, procedimientos e interpretación de los resultados obtenidos es correcta.

- 28. Control de calidad interno:** es el conjunto de pruebas realizadas cada vez que se efectúa un análisis o ensayo, o conjunto de ensayos de la misma técnica, que aseguran que los resultados obtenidos son los correctos.
- 29. Exangineotransfusión:** es el procedimiento por el cual se sustituye la sangre de un paciente por sangre homóloga, intercambiándose pequeños volúmenes sucesivamente, con fines terapéuticos.
- 30. Extracción centralizada:** es la extracción de sangre que se realiza en una planta física fija y permanentemente adaptada a tales efectos.
- 31. Extracción descentralizada:** es la extracción de sangre que se realiza por medio de una unidad móvil, dentro de la misma o en locales transitorios, previa coordinación local.
- 32. Fracción pediátrica:** (o Parcial Pediátrico) es una unidad de ST, SD, PF o CP de pequeño volumen obtenido a partir de una unidad standard del hemocomponente respectivo.
- 33. Fraccionamiento del plasma:** es el proceso industrialización del plasma humano por medio del cual se aíslan, purifican, concentran, estabilizan y formulan las proteínas plasmáticas transformándolas en hemoderivados.
- 34. Garantía de calidad:** es la certificación de que se han logrado los objetivos de calidad de acuerdo a las pautas (o normas) pre-establecidas.
- 35. Glóbulos rojos congelados:** es la unidad de Sangre desplasmatizada conservada en estado congelado, a una temperatura inferior a  $-80^{\circ}\text{C}$ , con el agregado de una sustancia crioprotectora que impide su hemólisis masiva.

- 36. Glóbulos rojos lavados:** es la unidad de Sangre Desplasmatazada sometida a tres lavados sucesivos con solución salina fisiológica con el objetivo de reducir el plasma contaminante.
- 37. Glóbulos rojos rejuvenecidos:** es la unidad de sangre desplasmatazada conservada en estado congelado a una temperatura inferior a  $-80^{\circ}\text{C}$ , con el agregado de una sustancia crioprotectora que impide su hemólisis masiva.
- 38. Glóbulos rojos rejuvenecidos:** es la unidad de sangre desplasmatazada vencida que es sometida a un proceso por el cual se restituye el tenor normal de 2,3 DPG y de ATP eritrocitarios.
- 39. Hemólisis.-**Destrucción (lisis) de la membrana eritrocitaria que libera el contenido: hem y globina. Resulta de la reacción entre un anticuerpo hemolítico y el antígeno eritrocitario correspondiente, en presencia de complemento.
- 40. Medicina Transfusional:** Es la rama de la medicina que lleva a cabo todas las actividades relacionadas con la producción de sangre, hemoderivados y hemocomponentes, procesamiento *in vivo* e *in vitro*, así como la evaluación clínica de los pacientes y su tratamiento por medio de la transfusión y/o aféresis.
- 41. Período neonatal:** es el período comprendido entre el nacimiento y los 28 días de vida.
- 42. Período ventana:** es la etapa de la evolución de una enfermedad en la cual el individuo, recientemente infectado, no presenta en sangre los marcadores virales buscados por las pruebas del tamizaje.

- 43. Plasma Fresco (PF):** es la unidad de plasma humano congelada antes de las 8 horas de extraída, de un volumen promedio de 200 mil, que contiene las proteínas Plasmáticas lábiles que intervienen en la coagulación.
- 44. Plasmaferesis:** es la aféresis aplicada a la obtención intensiva de plasma humano, generalmente con objeto de industrializar el mismo.
- 45. Prueba de coombs directo (o Coombs directo):** análisis que permite identificar anticuerpos, complemento o ambos, adheridos a la membrana del eritrocito o a otras células, mediante el uso de anticuerpos contra la gamaglobulina humana (suero de Coombs)
- 46. Reactivo de anti globulina humana (Coombs):** Producto empleado para la detección de globulinas humanas adheridas a los eritrocitos y a otras células humanas. El poliespecífico, también detecta actividad de complemento humano (C3d y C3b).
- 47. Seguridad transfusional:** es el conjunto de medidas tomadas para garantizar la calidad y reducir los riesgos de efectos adversos consecuencia de la transfusión de sangre, hemocomponentes y hemoderivados.
- 48. Selección del donante:** es el conjunto de estrategias empleadas para asegurarse que la extracción de sangre a un individuo no va a resultar nocivo para el mismo ni para el/los eventuales receptor/es.
- 49. Seroteca:** es el conjunto de muestras de suero conservadas, generalmente alícuotas congeladas, provenientes de donantes y/o pacientes.

## **2.4 Hipótesis y Variables.**

### **2.4.1 Hipótesis.**

Se pueden validar los resultados negativos de ensayos antiglobulínicos directos e indirectos al utilizar células control coombs preparadas con antisueros monoclonales y policlonales.

### **2.4.2 Variables.**

#### **Variable Independiente.**

Preparación de células reactivas control coombs.

#### **Variable Dependiente.**

Validación de ensayos antiglobulínicos.

## 2.5 Operacionalización de variables.

VARIABLE	CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADORES	INSTRUMENTO
<p><b>Independiente:</b> Preparación de células reactivas control coombs.</p>	<p>Conocidas como check cells, permiten validar la antiglobulina libre y no fijada a la IgG del hematíe en estudio.</p>	<p>Célula de control antiglobulínico .</p>	<p>Reacción de hemaglutinación positiva al identificar ausencia de IgG</p>	<p>Técnica: Observación</p> <p>Instrumento: Guía de Observación.</p>
<p><b>Dependiente:</b> Validación de ensayos antiglobulínicos</p>	<p>Pruebas que identifican anticuerpos irregulares libres o unidos al hematíe.</p>	<p>Prueba inmunohepatológica</p>	<p>Hemaglutinación positiva o negativa</p>	<p>Técnica: Observación</p> <p>Instrumento: Guía de Observación</p>

## CAPÍTULO III

### **3. Marco Metodológico.**

#### **3.1 Método Científico.**

Se emplea el método científico en el presente trabajo por ser un método sujeto a comprobaciones, basados en enunciados, principios y leyes, así como los principios técnicos empleados para la preparación de las células control y su eficacia en los ensayos antiglobulínicos negativos los cuales son elaborados en base a un procedimiento de ejecución y control para valorar su eficacia.

#### **Método Deductivo- Inductivo.**

Se emplea este método por partir en principio de hechos particulares a lo general, esto se explica por iniciar el estudio en los ensayos antiglobulínicos negativos obtenidos en el Servicio de Medicina Transfusional y validarlos sus resultados con las células de control.

#### **Método Analítico.**

Se emplea este método por cuanto la base de estudio son los resultados de ensayos antiglobulínicos obtenidos y garantizar sus resultados mediante la aplicación de las células de control, estas células fueron preparadas a partir del empleo de técnicas, materiales e instrumentos, para luego ser puestas en estudio con los ensayos de coombs y dar su interpretación de validación.

#### **Tipo de investigación.**

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

**Descriptiva.-** Porque una vez que se realiza el primer estudio profundo de la problemática a investigarse describimos con fundamentos de causa y consecuencia.

**Explicativa.-** Porque sobre la base del procedimiento de la información recopilación de textos, libros, folletos, llegamos a establecer las causas y consecuencias por las que se realizan las pruebas de compatibilidad.

**De campo.-** Debido a que el proceso investigativo se llevara a cabo en un lugar específico en este caso en el laboratorio de inmunohematología del Servicio de Medicina Transfusional del Hospital General Docente de Riobamba.

### **3.2 Población y muestra.**

#### **3.2.1 Población.**

La presente investigación está constituida por el total de ensayos que se realizara durante el tiempo planteado en la investigación que es de 196 pruebas de coombs realizadas en el servicio de medicina transfusional del Hospital General Docente de Riobamba.

#### **3.2.2 Muestra.**

No se extrae muestra, se trabaja con el total de la población que es de 196 ensayos

### **3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.**

#### **3.3.1 Técnicas.**

Observación

Análisis documental.

Recopilación bibliográfica

#### **3.3.2 Instrumentos:**

Guía de observación: datos de los resultados.

### 3.4 Análisis e interpretación de resultados.

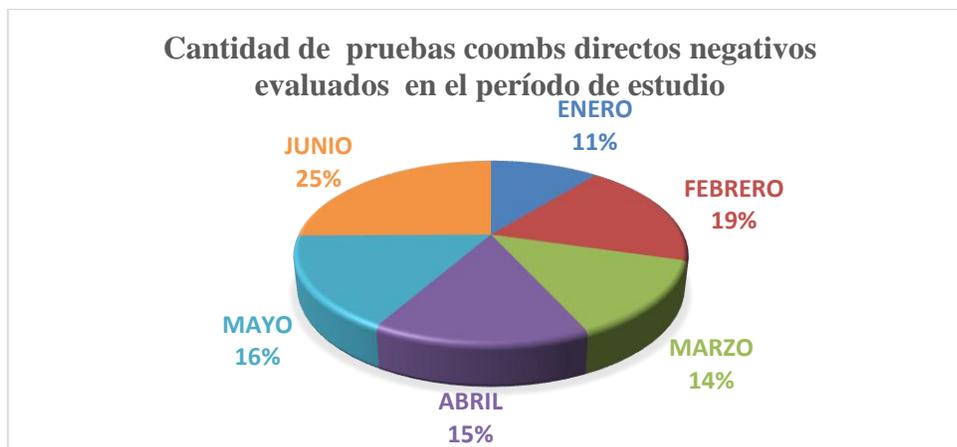
#### 3.4.1 Ensayos de coombs directos negativos.

Tabla 7. Tabla estadística de ensayos de coombs directo

MES	COOMBS DIRECTO	%
ENERO	15	11 %
FEBRERO	26	19 %
MARZO	19	14 %
ABRIL	21	15 %
MAYO	23	16 %
JUNIO	35	25 %
TOTAL	139	100 %

Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

Gráfico 22. Representación gráfica tabla 7



Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

**Análisis:** Las determinaciones de coombs directos negativos realizados durante el período enero – junio son una cantidad de 139 ensayos de los cuales durante el mes de junio se realizó el mayor número de esta prueba antiglobulínica con un 25 % del total mientras que en el mes de enero hubo menos demanda con un 11 %.

**Interpretación:** El HPGDR posee diferentes que requieren de estas pruebas para diagnóstico y tratamiento de incompatibilidades de grupos sanguíneos, diagnósticos de enfermedades hemolíticas, transfusiones de sangre y sus derivados.

### 3.4.2 Ensayos de coombs indirectos negativos.

Tabla 8. Ensayos de coombs indirectos negativos

MES	COOMBS INDIRECTOS	%
ENERO	8	14%
FEBRERO	12	21%
MARZO	10	18%
ABRIL	9	16%
MAYO	7	12%
JUNIO	11	19%
TOTAL	57	100%

Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca

Gráfico 23. Representación gráfica estadística de tabla 8



Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

**Análisis:** Las determinaciones de coombs indirectos negativos realizados durante el período enero – junio son una cantidad de 57 ensayos de los cuales durante el mes de febrero se realizó el mayor número de esta prueba antiglobulínica con un 21 % del total mientras que en el mes de mayo hubo menos demanda con un 12 %.

**Interpretación:** La prueba de coombs indirecta negativa y validada descarta presencia de anticuerpos irregulares que podrían generar reacciones al administrarse sangre con presencia de antígenos incompatibles.

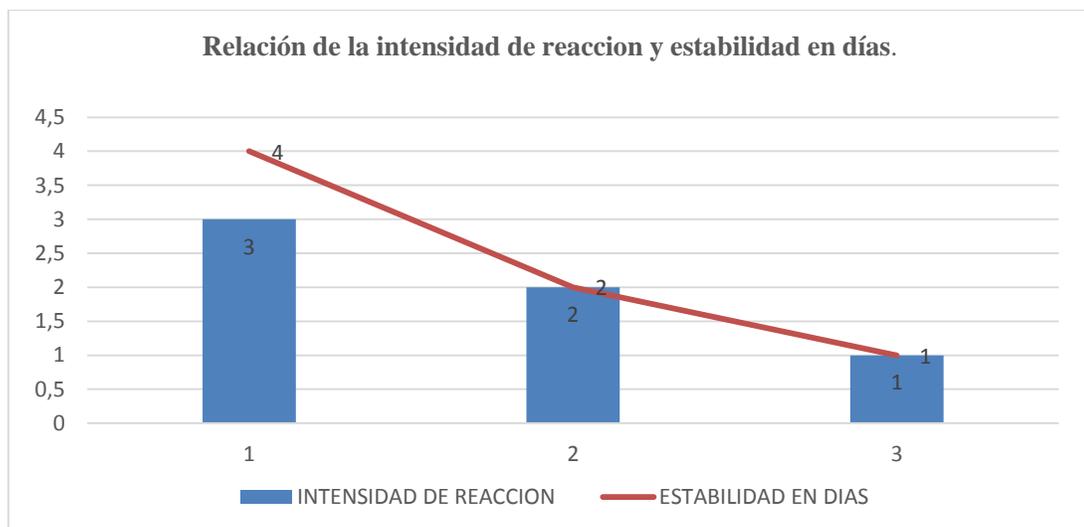
### 3.4.3 Intensidad de reacción al emplear células de control.

Tabla 9. Intensidad de reacción ensayos con células control coombs

<b>Intensidad de reacción con células de control.</b>	<b>Estabilidad en días</b>
3	4
2	2
1	1
Total: 7 días de estabilidad	

Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

Gráfico 24. Representación gráfica tabla 9



Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

**Análisis:** las células preparadas control coombs tienen un tiempo de estabilidad de 7 días de los cuales según el paso del tiempo va a variar entre 3 y 1 + de intensidad de reacción, durante cuatro días tuvieron una estabilidad de 3+ durante dos días de 2+ y es notable la variación de intensidad de reacción que decae hasta una cruz de reactividad.

**Interpretación.-** Esta positividad indica que la prueba de coombs con reporte negativa es de confiabilidad para transfusiones de sangre o descarte de incompatibilidades feto maternas.

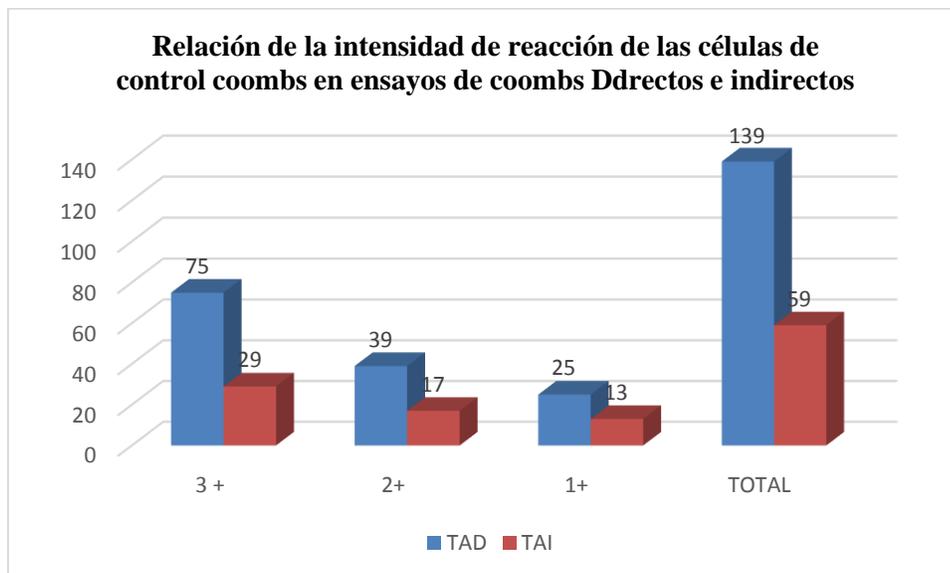
### 3.4.4 Relación de la intensidad de reacción con células de control en ensayos de coombs directo e indirecto.

Tabla 10. Intensidad de reacción con células de control en pruebas TAD y TAI.

ENSAYOS	3 +	2+	1+	TOTAL
TAD	75	39	25	139
TAI	29	17	13	59

Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

Gráfico 25. Interpretación tabla 10



Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

**Análisis:** las células de control coombs dan positividad con la variación de intensidad de reacción en ensayos negativos de coombs directos e indirectos de los cuales se obtuvieron resultados con 3+ en el mayor número de ensayos lo que garantiza los resultados obtenidos en las pruebas antiglobulínicas

**Interpretación.-** Permiten la validación de estas pruebas, por cuanto la anti globulina humana queda libre y al unirse a estas células de control positiviza por cuanto las células sensibilizadas con IgG permiten la unión y la reacción de aglutinación.

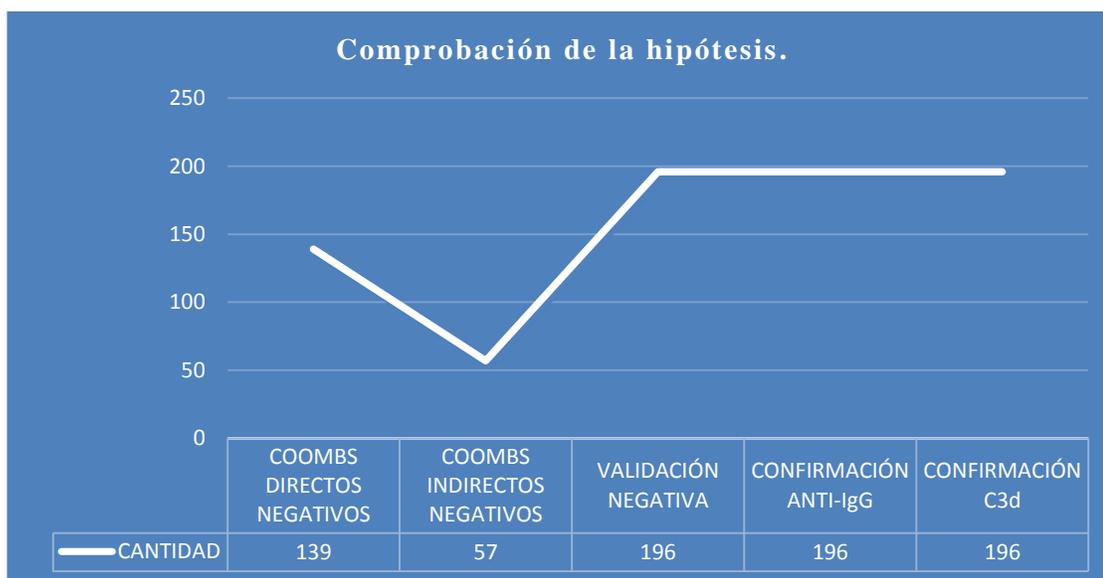
### 3.5 Comprobación de la hipótesis.

Tabla 11. Comprobación de la hipótesis.

ENSAYOS	RESULTADO	CANTIDAD
COOMBS DIRECTOS NEGATIVOS	Negativo	139
COOMBS INDIRECTOS NEGATIVOS	Negativo	57
VALIDACIÓN NEGATIVA DE COOMBS	Positivo	196
CONFIRMACIÓN ANTI-IgG	Negativo	196
CONFIRMACIÓN C3d	Negativo	196

Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

Gráfico 26. Representación de la comprobación de la hipótesis.



Fuente: Servicio de Medicina Transfusional – HPGDR  
Diseño: Karla Allauca.

**Comprobación:** Si se logró validar los ensayos de negativos de coombs directos e indirectos al utilizar las células de control y estos ensayos fueron comprobados con la utilización de tarjetas screening de gel policlonal (IgG + C3d), sus resultados fueron negativos correlacionando así el resultados de coombs y el empleo de las células control cuando con estas dio positividad.

## CAPITULO IV

### 4. Conclusiones y Recomendaciones.

#### 4.1 Conclusiones.

- La aplicación de ensayos de coombs directos e indirectos previenen las complicaciones asociadas a las transfusiones e incompatibilidades feto maternas en las que interactúan las inmunoglobulinas IgG.
- El emplear la combinación de antisueros anti-D monoclonal y policlonal para preparar células control coombs garantizan este medio de control por cuanto la estructura antigénica RhD presenta variaciones en sus epitopes que pueda en su mayoría generar la producción de anticuerpos inespecíficos o irregulares que representan la causa de positividad en los ensayos de coombs.
- La validación de los ensayos de coombs es efectiva al emplear células de control en las pruebas de coombs directa como indirecta por detectar a la antiglobulina libre que no se fijó al soporte hemático.

#### 4.2 Recomendaciones

- Se recomienda que los ensayos de coombs directos e indirectos negativos deben ser validados con las células de control coombs, estas pueden ser preparadas en el laboratorio o adquiridas comercialmente.
- Se debe emplear la combinación de antisueros anti-D en la preparación de las células de control coombs por cuanto este antígeno es el de mayor poder inmunogénico causante de reacciones inmunes en el organismo de quien lo posee junto con los anticuerpos específicos.

- Para este ensayo al preparar células de control se recomienda validar estas células con pruebas específicas, de IgG y C3d, esto genera en el trabajo realizado un control adicional a la prueba de coombs negativa.

## **Bibliografía.**

1. BATISTA, H. (2004). Actualidades del sistema Rh. *Inmunología Medigraphig*, 34-43.
2. Chemistry, A. A. (27 de 12 de 2012). Lab Test on Line. Obtenido de Lab Test on Line: [http://www.labtestsonline.es/tests/Antiglobulin\\_Indirect.html?tab=3](http://www.labtestsonline.es/tests/Antiglobulin_Indirect.html?tab=3)
3. Clinical, A. A. (10 de 11 de 2012). Lab test on line. Obtenido de Lab test on line: [http://www.labtestsonline.es/tests/Antiglobulin\\_Direct.html?tab=3](http://www.labtestsonline.es/tests/Antiglobulin_Direct.html?tab=3)
4. COOP, B. (2012). Grupos sanguíneos. Obtenido de Baes Grupos sanguíneos: <http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/fisiologia.humana/APUNTE%20GS.pdf>
5. GARGIULO, D. (2005). Sistema Rh. Especialidades paramédicas - Argentina, 203-245.
6. GEFFER, F. (2013). *Inducción a la Inmunología Humana*. Buenos Aires: Panamericana.
7. GONZALEZ, H. (2009). Utilidad de la prueba de coombs en el tamizaje neonatal. *Medigraphig.org.mx*, 502 - 510.
8. JARAMILLO, F. (2012). *Pruebas de Coombs*. Riobamba, Chimborazo, Ecuador.
9. JIMENEZ, R. (2009). ANTIBODIES, MONOCLONAL; HERPESVIRUS 4, HUMAN; MOLECULAR BIOLOGY; BLOOD GROUPS. Instituto de Hematología e Inmunología, 234-289.
10. LUNA, J. (2005). Anticuerpos Irregulares y su importancia en Medicina Transfusional. *Revista medica Instituto de Seguro Mexicano*, 205- 230.
11. MARGINI, R. (1996). Inmunoquímica e inmunología. Obtenido de Inmunoquímica e inmunología: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/anticuerpos.htm#arriba>
12. PETRIDES, M. M. (2005). *Guía Práctica de Medicina Transfusional*. Madrid: SETS.

13. RODRIGUEZ, M. (2014). El Banco de Sangre y la Medicina Transfusional. Mexico: Panamericana.
14. SACEDA, D. M. (15 de Marzo de 2016). Web Consultas. Obtenido de Web Consultas: <http://www.webconsultas.com/embarazo/vivir-el-embarazo/pruebas-durante-el-embarazo/coombs-2413>
15. SANCHEZ, P. F. (2014). Preparacion de celulas control. Patología Clínica, 241 - 245.
16. Scott, M. L. (2009). Anticuerpos Anti - D Rh. National Blood Authority, 245.
17. TORELLA, G. (2006). Pragmatismo. Revista Cubana.
18. VILLEGAS, C. D. (2007). Enfermedad Hemolitica del recién nacido por Incompatibilidad. Revista Cubana, 79-80.

Anexos.



Figura 27. Preparación de suspensión de células  
Diseño: Karla Allauca.

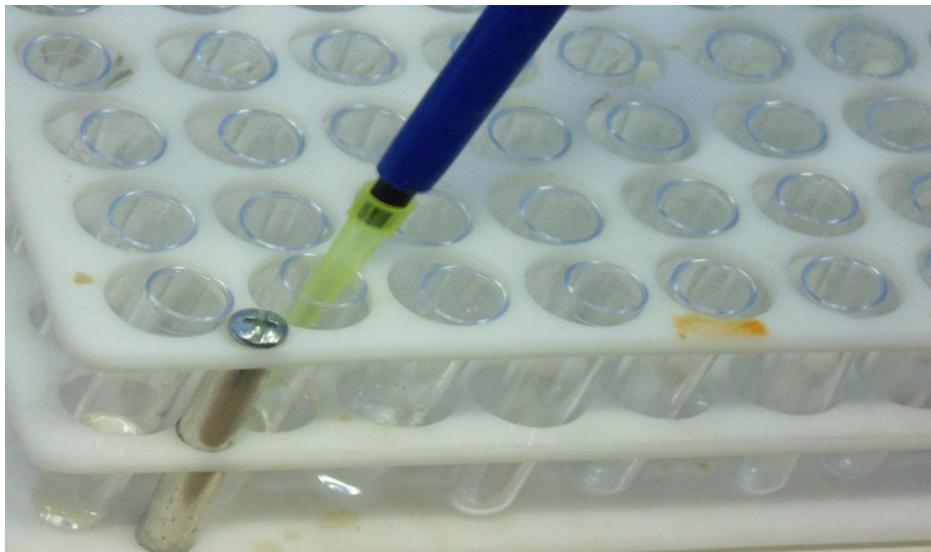


Figura 28. Dispensación de solución liss.  
Diseño: Karla Allauca

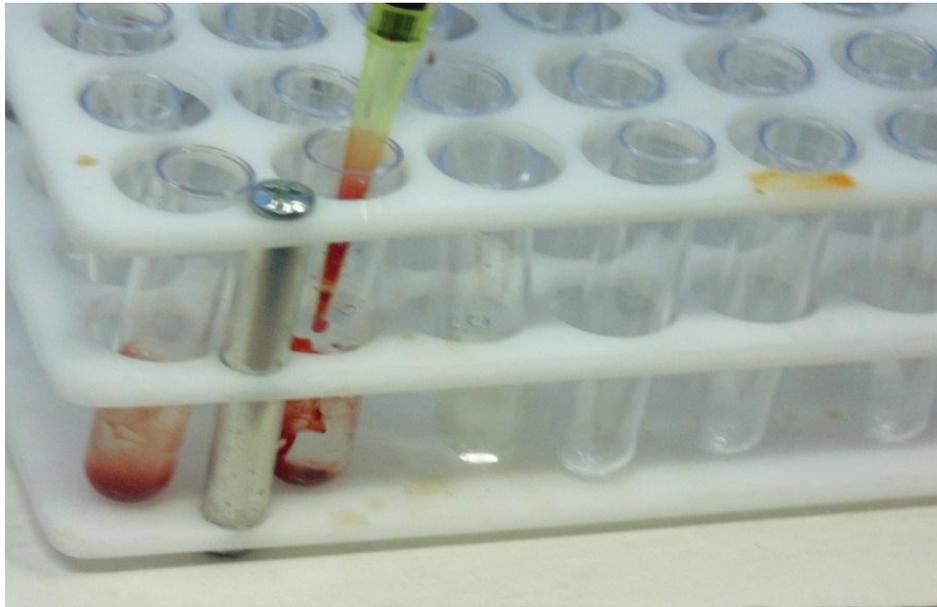


Figura 29. Dispensación de muestras  
Diseño: Karla Allauca



Figura 30. Ensayos  
Diseño: Karla Allauca



Figura 31. Centrifugación  
Diseño: Karla Allauca

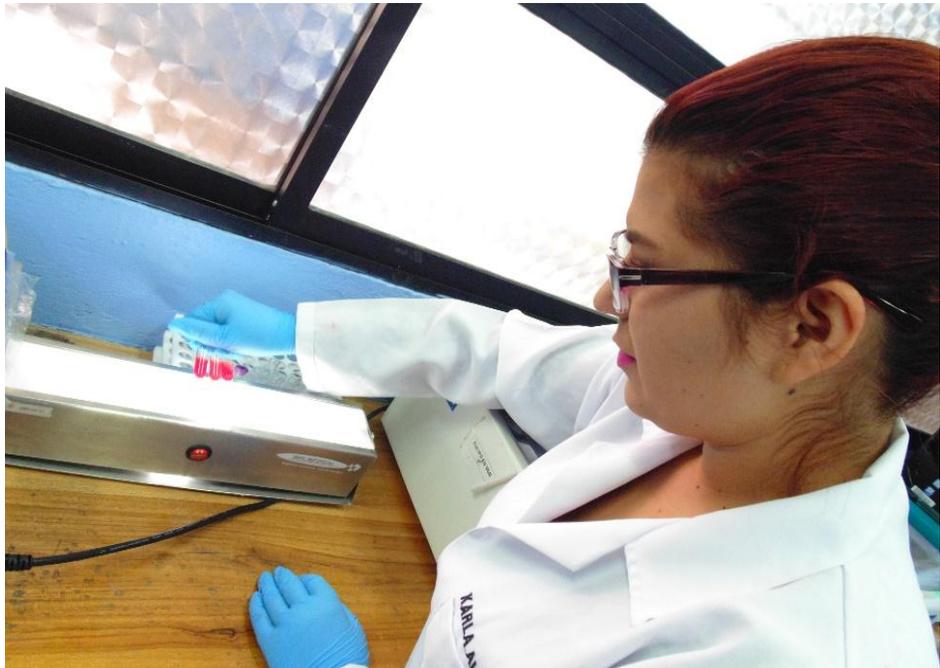


Figura 32. Lecturas  
Diseño: Karla Allauca



Figura 33. Selección de unidades  
Diseño: Karla Allauca

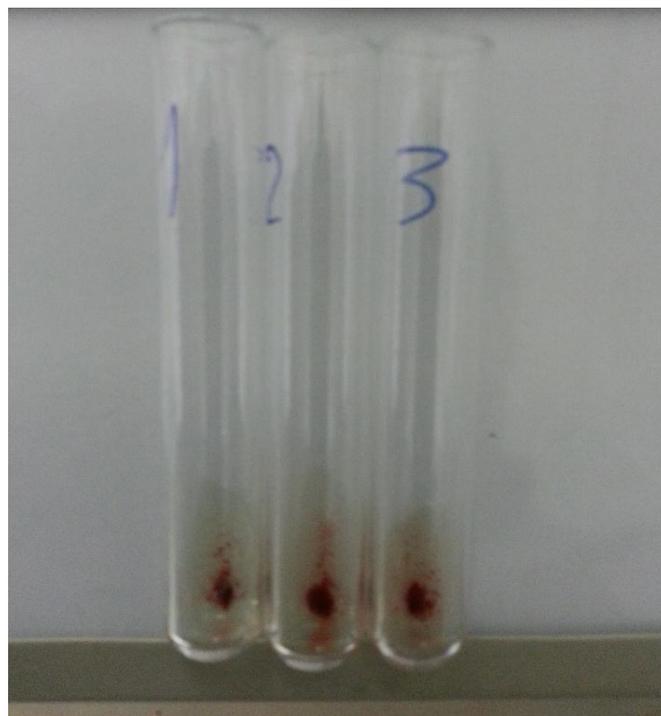


Figura 34. Validación de Coombs  
Diseño: Karla Allauca

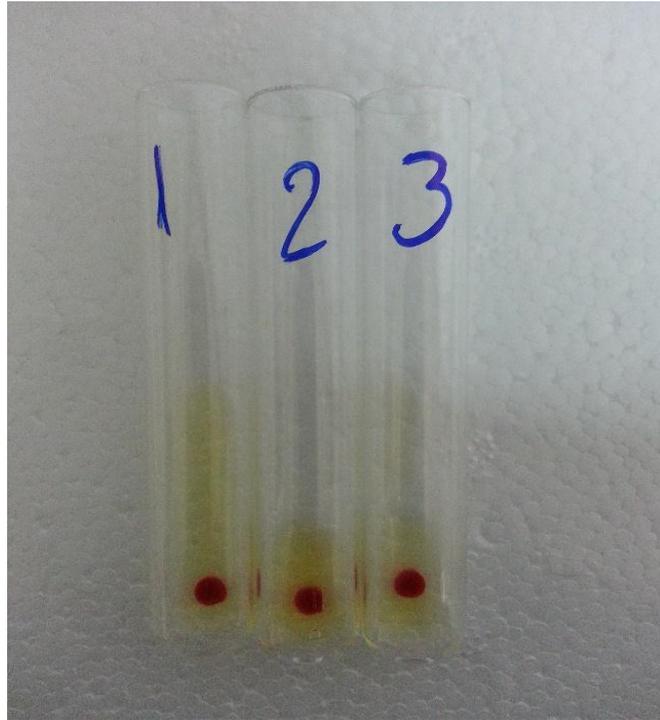


Figura 36. Validación pruebas cruzadas  
Diseño: Karla Allauca

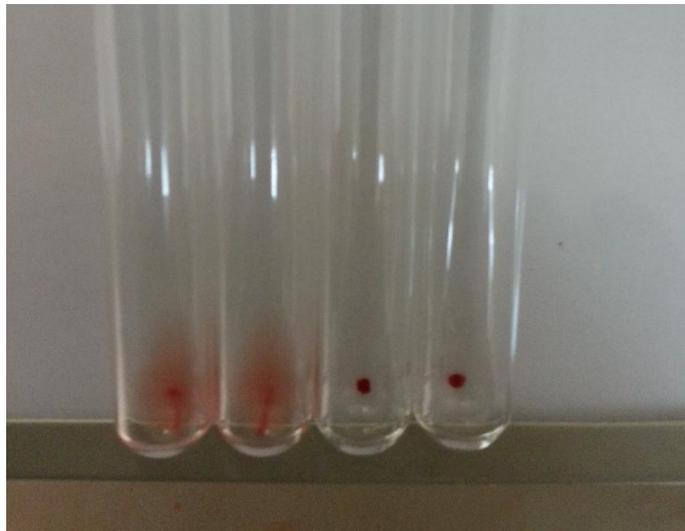


Figura 35. Validación ensayos de pantallas  
Diseño: Karla Allauca