

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Optimización de la técnica aglutininas en frío para la  
determinación del grupo sanguíneo A, B y Rh en  
manchas sanguíneas secas. Ayacucho – 2015.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:  
Bach. ENCISO ORTIZ, Carla

AYACUCHO – PERÚ  
2017



Con mucha gratitud esta tesis para mi familia, a los que siempre llevo en mi corazón.



## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma Mater*, forjadora de profesionales de calidad humana, al servicio de la sociedad.

A la plana docente de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por los conocimientos impartidos durante mi formación académica profesional.

A la Blga. Ruth Elsa Huamán De La Cruz, asesora del presente trabajo de investigación, por su valioso apoyo y dedicación prestada.

De igual manera al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón, por su apoyo en este trabajo de investigación.



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Biología forense	4
2.3. Serología forense	4
2.4. Mancha	4
2.5. Sangre	5
2.6. Aspecto bioquímico del grupo ABO	6
2.7. Factor Rh	7
2.8. Factores que afectan la aglutinación eritrocitaria	7
2.9. Albúmina bovina	10
2.10. Fundamento de la técnica Aglutininas en frío	10
2.11. Fundamento de la técnica Absorción- Elución	11
2.12. Optimización	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Lugar de muestreo	15
3.2. Población, muestra y muestreo	15
3.3. Etapa pre analítica	15
3.4. Etapa analítica	16
3.5. Etapa post analítica	19
3.6. Diseño metodológico	21
IV. RESULTADOS	23
V. DISCUSIONES	29
VI. CONCLUSIONES	33
VII. RECOMENDACIONES	35
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
IX. ANEXOS	39



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Determinación de los grupos sanguíneos A, B y factor Rh mediante la técnica aglutininas en frío. Ayacucho 2016.	25
Tabla 2 Determinación de los grupos sanguíneos A, B y factor Rh mediante la técnica aglutininas en frío optimizada. Ayacucho 2016.	26
Tabla 3 Determinación de los grupos sanguíneos A y B mediante la técnica aglutininas en frío optimizada, aglutininas en frío y absorción elución. Ayacucho 2016.	27
Tabla 4 Determinación del factor Rh de los grupos sanguíneos A y B mediante la técnica aglutininas en frío optimizada, aglutininas en frío y absorción elución. Ayacucho 2016.	28



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Representación esquemática del grupo ABO	7
Figura 2 Fundamento de la técnica Absorción- elución	13



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1	41
Estimación del grado de concordancia en la determinación del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío y aglutininas en frío optimizada, utilizando el estadístico Kappa.	
Anexo 2	42
Estimación del grado de concordancia en la determinación del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío y absorción elución, utilizando el estadístico Kappa.	
Anexo 3	43
Estimación del grado de concordancia en la determinación del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío optimizada y absorción elución, utilizando el estadístico Kappa.	
Anexo 4	44
Estimación del grado de concordancia en la determinación del factor Rh del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío y aglutininas en frío optimizada, utilizando el estadístico Kappa.	
Anexo 5	45
Estimación del grado de concordancia en la determinación del factor Rh del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío y absorción elución, utilizando el estadístico Kappa.	
Anexo 6	46
Estimación del grado de concordancia en la determinación del factor Rh del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío optimizada y absorción elución, utilizando el estadístico Kappa.	
Anexo 7	47
(a) Toma de muestra de la sangre, (b) tela poli algodón de color blanco, (c) muestras de sangre del grupo sanguíneo A y B, (d) manchado por goteo en la tela de poli algodón.	
Anexo 8	48
(a)Telas manchadas con sangre del grupo sanguíneo A, secado a temperatura por 72 horas, (b) telas manchadas con sangre del grupo sanguíneo B, secado a temperatura por 72 horas, (c) etiquetado en sobres de plástico con cierre hermético.	
Anexo 9	49
(a)Reactivos utilizados en la investigación; Antisueros monoclonales Biotech y albúmina bovina, (b) control de	

	calidad de los Antisueros monoclonales, (c) recorte de las telas manchadas 10 x 10 mm, (d) maceramiento de las manchas por 24 horas en las placas excavadas.	
Anexo 10	(a) Maceramiento por 24 horas en placa excavada, (b) tubos con las telas maceradas (c) lavado de las telas con solución salina fisiológica al 0,85% de manera suave por 5 veces y 8 veces para el factor Rh (d) formación del botón de hematiés luego de la centrifugación.	50
Anexo 11	Observación de los resultados obtenidos.	51
Anexo 12	Protocolo del procedimiento de la técnica aglutininas en frío	52
Anexo 13	Protocolo del procedimiento de la técnica aglutininas en frío optimizada	53
Anexo 14	Protocolo del procedimiento de la técnica aglutininas en frío optimizada para Rh	54
Anexo 15	Protocolo del procedimiento de la técnica absorción-elución	55
Anexo 16	Validez y cálculo de pruebas diagnósticas: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica aglutininas en frío optimizada	56
Anexo 17	Prueba diagnóstica: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo mediante la técnica aglutininas en frío optimizada, aglutininas en frío y absorción elución para el grupo sanguíneo A y B. Ayacucho 2016.	57
Anexo 18	Prueba diagnóstica: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo mediante la técnica aglutininas en frío optimizada, aglutininas en frío y absorción elución para el factor Rh del grupo sanguíneo A y B. Ayacucho 2016.	58
Anexo 19	Valoración del Índice Kappa	59
Anexo 20	Matriz de consistencia	60

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación, tuvo como objetivo la optimización de la técnica aglutininas en frío para la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh en manchas sanguíneas secas, Ayacucho 2015. Se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. El estudio fue de tipo experimental. En la investigación se desarrollaron las tres técnicas; aglutininas en frío, aglutininas en frío optimizada y absorción elución determinándose el grupo sanguíneo A, B y factor Rh en manchas de tela poli algodón, se evaluaron las pruebas diagnósticas mediante las tres técnicas. La técnica aglutininas en frío tuvo una sensibilidad de 84% y 92% para el grupo sanguíneo A y B un valor predictivo negativo de 86% y 93% respectivamente; para el factor Rh un 80% (grupo A) y un 88% (grupo B) de sensibilidad; con un valor predictivo positivo de 100% para ambos y un valor predictivo negativo de 83% (grupo A) y 89% (grupo B). Las técnicas aglutininas en frío optimizada y absorción elución con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de un 100% en la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh. Se concluyó que la técnica aglutininas en frío optimizada facilita la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh en manchas sanguíneas secas.

**Palabras clave:** Optimizar, aglutininas en frío, absorción-elución, antígeno, anticuerpo, manchas sanguíneas, albúmina bovina.



## I. INTRODUCCIÓN

El hallazgo de sangre en manchas obtenidas en las escenas de las investigaciones forenses juega un papel fundamental en la resolución de los casos criminales. Además de la identificación de sangre proveniente de un ser humano se puede tipificar el grupo sanguíneo al que pertenece y posteriormente realizar análisis de ADN.<sup>1</sup>

Existen diferentes métodos para la aplicación de un estudio forense estos varían según especificidad, sensibilidad y costo. La detección sanguínea de muestras forenses requiere en principio de un diagnóstico de orientación para determinar presencia o ausencia de sangre en manchas secas de sangre y en muestras forenses, que suelen ser con frecuencia el principal indicio obtenido en la escena de crimen.<sup>2</sup>

En nuestro medio la biología forense en uno de sus campos como la inmunología forense se encamina a aplicar y desarrollar ensayos de laboratorio para fortalecer el esclarecimiento de casos forenses, por esta razón se hace imprescindible disponer de métodos de búsqueda más sensibles, capaces de detectar mínimos indicios de presencia de sangre en los diferentes sitios, objetos y vestimenta de la escena de crimen. En tal sentido se optimizó la técnica aglutininas en frío para la determinación de grupo sanguíneo A, B y factor Rh en manchas sanguíneas secas, por lo que se plantearon los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Optimizar la técnica aglutininas en frío para la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh en manchas sanguíneas secas.

### **Objetivos específicos**

- Desarrollar la técnica aglutininas en frío y su optimización.
- Comparar los resultados de la técnica aglutininas en frío y la optimización de esta técnica con la técnica estándar absorción-elusión.



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

El estudio de los aspectos físicos, químicos y serológicos de las manchas de sangre pueden llevar a conseguir demostrar uno o más de los siguientes aspectos: La participación de personas y objetos en una acción criminal: aproxima a la forma en que se llevó a cabo un determinado suceso; identificar un cuerpo desconocido; determinar, por análisis toxicológico, la causa de una muerte ; finalmente, en otros, saber si se trata de una muerte por homicidio, suicidio, accidente o por causas naturales.<sup>1</sup>

En la sección de Antropología Biológica de la Universidad de Medicina Experimental de Buenos Aires, identificaron Grupos Sanguíneos en restos momificados de una población Prehispánica determinando el grupo sanguíneo ABO, usando- la técnica de la aglutinación mixta que inhibe la aglutinación y elución, probando la presencia del antígeno A en la población precolombina.<sup>2</sup>

La Dirección Central de la policía Judicial de Colombia realizó la validación de las técnicas presuntivas como confirmativas en grupo sanguíneo ABO en diferentes soportes y condiciones con fines forenses, en la cual en las pruebas presuntivas no se ven afectadas por el soporte o condiciones ambientales y con respecto a las pruebas de sensibilidad las muestras son más afectadas obteniendo resultados parcialmente satisfactorios.<sup>3</sup>

Para el análisis de manchas de sangre, enfocadas en el área de criminología, la caracterización de las mismas se basa en la determinación del tipo sanguíneo, donde los científicos forenses determinan primero si tienen una adecuada calidad de la sangre. Para su preservación las muestras se pueden dejar secar a temperatura ambiente y evitando su exposición al sol, hasta tiempos determinados. La buena recolección y preservación de muestras de manchas de sangre es importante, para una mejor caracterización.<sup>4</sup>

Los factores físicos y químicos influyen en la determinación del grupo sanguíneo "A", "B" y "O" en telas de poli algodón con manchas sanguíneas de interés forense, en función a las variables en el transcurso de las 8 semanas de trabajo procesadas por la técnica de Absorción - Elución.<sup>5</sup>

## **2.2. Biología Forense**

La ciencia forense comprende una amplia diversidad de disciplinas científicas que trabajan de manera especializada para asistir al proceso de justicia mediante la evaluación de la evidencia aplicando la ciencia de la ingeniería el arte y la medicina en especial en laboratorio, sobre todo en la resolución de aspectos relacionados con la ley. La ciencia forense involucra el reconocimiento, identificación, individualización y evaluación del medio de prueba material o evidencia física empleando métodos científicos. Dentro del cual incluye todas las áreas dedicadas al análisis de la evidencia, traza o soporte de transferencia como el suelo, vidrio, fibra, cabello, sangre y fluidos biológicos se refiere al análisis comparativo de restos de materiales en diferentes áreas en caso de la biología forense mediante el análisis de fluidos, tejidos y estructuras biológicas con el fin de determinar el origen de un resto en un escenario del suceso particular.<sup>6</sup>

## **2.3. Serología Forense**

Las pruebas de sangre como determinación de sangre, tipo sanguíneo, características de la sangre y la examinación de la mancha de sangre, para la preparación del testimonio o de presentaciones en el ensayo son las funciones principales de la serología forense, que también analiza el semen, saliva, otros fluidos corporales y se puede o no se puede implicar con la secuenciación del ADN.<sup>7</sup>

## **2.4. Mancha**

Por mancha se entiende toda modificación de color, toda suciedad, toda adición de una materia extraña, visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre instrumentos, o sobre un objeto cualquiera del cuerpo humano, determinada por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de la intervención o participación de una persona en un hecho delictivo.<sup>8</sup>

### **2.4.1. Mancha de sangre humana**

Las manchas de sangre son el vestigio más importante y frecuente en crímenes violentos, una vez halladas deberían ser cuidadosamente analizadas, bajo todos

los aspectos, los que en la práctica generalmente se centran en el estudio de la intimidad del laboratorio forense, pero muchas veces tiene mayor interés el estudio de la apariencia y distribución de la sangre, por la abundancia de la información que puede suministrar a la investigación criminal.<sup>9</sup>

## **2.5. Sangre**

Es un tejido líquido, rojo, viscoso, coagulable en el cual la sustancia intercelular circula por el corazón, las venas, arterias y capilares. Químicamente es un sistema heterogéneo, constituido por una fase líquida (plasma) que tiene en suspensión eritrocitos, leucocitos, plaquetas, etc. Transporta oxígeno a los tejidos y anhídrido carbónico hasta los pulmones, también sustancias nutritivas absorbidas por los intestinos, sustancias protectoras, anticuerpos, hormonas y colabora en el mantenimiento y regulación de la temperatura corporal, la presión osmótica, arterial y el equilibrio acuoso Ácido - Base.<sup>10</sup>

Aproximadamente para una persona saludable, el ocho al nueve por ciento de su peso total es sangre. Para una persona de 70 kg el volumen de sangre sería aproximadamente de 4 a 5 L.

- De 5 a 6 litros de sangre para varones.
- De 4 a 5 litros de sangre para las mujeres.

El plasma es un fluido amarillento que lleva a los eritrocitos suspendidos, los leucocitos y las plaquetas. Está compuesto de agua (92 %), proteínas (7%) y otros como las sales, desechos y hormonas, entre otros.<sup>10</sup>

El plasma constituye aproximadamente 55% de la sangre. El resto 45%, está formado por las células sanguíneas o paquete globular. Porque el plasma es más ligero que las células sanguíneas y plaquetas, pueden separarse fácilmente. El plasma no se separa de las células sanguíneas en condiciones normales, se pueden separar con la ayuda de anticoagulantes realizando una constante agitación y es así que se ve que está constituido por.<sup>10</sup>

**1. Solutos inorgánicos o electrolitos.** Constituyen 0.9% de los solutos básicamente los que se localizan en el líquido extracelular. Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup>, P<sub>04</sub>, HC<sub>03</sub>, C<sub>02</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, etc.

**2. Solutos orgánicos.** Glucosa, aminoácidos, enzimas, hormonas, vitaminas y liposolubles, ácidos grasos, productos de desechos como la urea, ácido úrico, tinina, bilirrubina, etc.; y proteínas plásticas, las cuales constituyen los solutos plasmáticos.

Existen tres grupos de proteínas plasmáticas cuyos tamaños y estructuras son muy variables.

- **Albúmina**, que constituye el 59.2% del total de proteínas.
- **Globulinas**, que contienen el 40.5% del total de proteínas.
- **Fibrinógeno**, que es aproximadamente el 0.3% del contenido proteico plasmático.

La sangre es una solución donde se encuentran solutos y células y que desarrolla funciones como las siguientes:

**a. Transporte.** Transporta múltiples sustancias disueltas y unidas químicamente a diferentes componentes. Según el compuesto transportado la función puede ser denominada:

- Respiratoria
- Nutritiva
- Excretora

**b. Homeostática.** El control de parámetros tan importantes como el pH, la temperatura, el control del volumen hídrico o de los electrolitos corporales se realiza a través de la sangre.

**c. Comunicación y defensa.** El transporte de mediadores informativos se lleva a cabo mediante la sangre. Lo mismo que la protección del organismo cuenta con algunas células y proteínas de la sangre que participan en los procesos de defensas orgánicas contra invasión de gérmenes patógenos o para eliminación de cuerpos extraños.

## **2.6. Aspecto bioquímico del grupo ABO**

Los glóbulos rojos de las personas del grupo O carecen de antígenos A y B, pero poseen antígenos H, la sustancia precursora de los A y B. Las cadenas de carbohidratos que llevan antígenos ABH pueden ser ligados a moléculas transportadoras de proteínas (glicoproteína), esfingolípidos (glicoesfingolípidos) o lípidos (glucolípidos).

La especificidad del grupo sanguíneo se debe a los glúcidos unidos a estos lípidos. Casi todos los individuos poseen la llamada sustancia H unida a los lípidos de membrana. Esta sustancia procede de un precursor formado por Galactosa y N-acetilglucosamina. Cuando a este precursor se le añade por acción de una enzima cuyo gen llamado FUT1 se encuentra en el cromosoma 9; la fucosa, entonces se obtiene la sustancia H. Cuando por acción de otro alelo, el I<sup>A</sup> también situado en el cromosoma 9, se añade a esta sustancia H el monosacárido N-acetilgalactosamina, la membrana de los glóbulos rojos tendrá el antígeno A y el fenotipo de esta persona será A. Si en el cromosoma 9 se

encuentra el alelo  $I^B$ , entonces se añadirá a la sustancia H el monosacárido galactosa y el fenotipo de esta persona será B. Si en el cromosoma 9 se encuentra el alelo  $i$ , entonces no actuará ninguna enzima añadiendo monosacáridos a la sustancia H y el fenotipo será O. Cuando una persona posee los alelos  $I^A$  y el  $I^B$ , entonces su fenotipo será AB.<sup>11</sup>

### 2.7. Factor Rh

Término que se aplica a cualquiera de las más de treinta sustancias que reciben el nombre de aglutinógenos y que se encuentran en la superficie de los eritrocitos sanguíneos. Son diferentes de los principales tipos de grupo sanguíneo, pero se desconoce su composición. Los factores Rh se descubrieron en la sangre del mono Rhesus en 1937, está determinado por 6 antígenos diferentes (proteínas de la membrana de los glóbulos rojos) estos antígenos se han denominado C, D, E, c, d, e De ellos, el más importante es el antígeno D y es el que se tiene en cuenta para la determinación del Rh. Si una persona tiene el antígeno D en la membrana de sus eritrocitos, será Rh+ y si no lo tiene será Rh- A diferencia del grupo ABO, las personas Rh-, no tienen anticuerpos contra el antígeno D de manera natural; es decir, que solo lo sintetizarán cuando sean expuestas al antígeno D.<sup>12</sup>

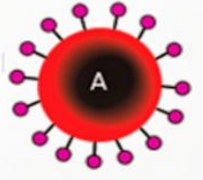
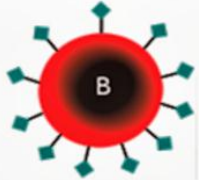
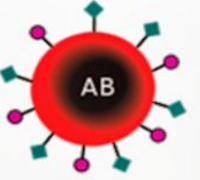

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Glóbulo rojo				
Antígeno	A	B	A y B	Ninguno
Anticuerpo	Anti B	Anti A	Ninguno	Los dos

Figura 1: Grupo ABO

### 2.8. Factores que afectan la aglutinación eritrocitaria

La aglutinación es una reacción química reversible que se desarrolla en dos etapas:

## **A. Primera etapa: sensibilización**

Antes de la unión, los antígenos y anticuerpos deben encontrarse y crear un nexo especial apropiado. La posibilidad de asociación puede incrementarse por agitación, centrifugación o variación de la concentración relativa de anticuerpos y antígenos.<sup>13</sup>

La sensibilización requiere el establecimiento de puentes químicos no covalentes entre los antígenos y anticuerpos. Las fuerzas de unión suelen ser débiles (en comparación con los puentes covalentes intermoleculares) y solo actúan a muy corta distancia. La combinación antígeno - anticuerpo es reversible y los puentes o uniones se crean y rompen de manera constante hasta alcanzar el equilibrio.<sup>13</sup>

**A.1. Uniones químicas.** Diferentes tipos de uniones químicas son responsables de la fijación de anticuerpos a antígenos, como los puentes de hidrógeno, las uniones hidrófobas, las uniones electrostáticas o iónicas y las fuerzas de van der Waals. Estos tipos de uniones químicas son relevantes en la inmunohematología, porque los diferentes tipos de uniones tienen diferentes características termodinámicas; pueden ser exotérmicas o endotérmicas. A su vez, las características termodinámicas pueden afectar los fenómenos serológicos que se observan en las pruebas. Por ejemplo, los antígenos de tipo carbohidratos suelen formar puentes de hidrógeno exotérmicos con los sitios de combinación de los anticuerpos resultando en puentes que son más fuertes a temperaturas bajas. En contraste, los puentes hidrófilos que se forman con antígenos proteicos son endotérmicos y son más fuertes a temperaturas más altas.<sup>13</sup>

**A.2. Constante de equilibrio (afinidad  $K_0$ ) de los anticuerpos.** Está determinada por las tasas relativas de asociación y disociación. La  $K_0$  varía de acuerdo a cada reacción de antígeno – anticuerpo. Esta constante refleja el grado de asociación y unión mutua del antígeno y el anticuerpo (valor de ajuste) y la velocidad de la reacción. Cuánto más alto es el valor de  $K_0$  mayor es la asociación o “ajuste”. Cuando el valor de  $K_0$  es grande, la reacción es más rápida y la disociación es más difícil; estos anticuerpos podrían tener mayor relevancia clínica. Cuando  $K$  es reducida, la detección puede requerir una tasa de anticuerpos más elevada con respecto a la de antígenos.<sup>13</sup>

**A.3. Temperatura.** La mayoría de los anticuerpos de grupo sanguíneo reacciona en rangos térmicos restringidos. La temperatura óptima antígeno- anticuerpo se vincula más con el tipo de reacción y la naturaleza química de los antígenos, que

con la clase de anticuerpos. Estos anticuerpos se dividen en dos grandes categorías: los reactivos en frío (por ejemplo, 4 -25 °C) y los reactivos en caliente (por ejemplo, 30- 37°C). Los antígenos de tipo carbohidratos suelen relacionarse con anticuerpos “reactivos en frío” y los proteicos con anticuerpos “reactivos en caliente”.<sup>13</sup>

**A.4. pH.** Las modificaciones de pH pueden afectar las uniones electrostáticas. Se desconoce el pH óptimo de la mayoría de los anticuerpos de grupo sanguíneo significativos, pero se supone que se aproxima al rango fisiológico. Ciertos anticuerpos ocasionales, en particular algunos anti M, reaccionan más a pH ácido. En la mayoría de las pruebas de rutina debe emplearse un pH de alrededor de 7. La solución salina almacenada tiene un pH de 5–6. La solución salina amortiguada es una alternativa y puede ser útil especialmente para los estudios en fase sólida.<sup>13</sup>

**A.5. Tiempo de incubación.** El intervalo necesario para alcanzar el equilibrio depende del anticuerpo de grupo sanguíneo del que se trate. Las variables significativas incluyen requerimientos térmicos, clase de inunohemoglobina e interacciones específicas entre la configuración antigénica y el sitio Fab de los anticuerpos el agregado de agentes potenciadores al sistema puede abreviar el intervalo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio.<sup>13</sup>

En los sistemas salinos que utilizan suero antiglobulínico para demostrar la fijación del anticuerpo, la incubación a 37 °C durante 30- 60 minutos permite detectar la mayoría de los anticuerpos significativos. En el caso de algunos anticuerpos débilmente reactivos, la asociación podría no alcanzar el equilibrio en 30 minutos y la prolongación de la incubación podría incrementar la sensibilidad de la prueba. Las extensiones más allá inconvenientes, excepto la demora en la obtención de los resultados.<sup>13</sup>

**A.6. Potencia iónica.** En la solución salina normal, las uniones Na y Cl se agrupan y neutralizan en parte las cargas opuestas de las moléculas de antígenos y anticuerpos. Este fenómeno impide su asociación. No obstante, si se disminuye la potencia iónica del medio, el efecto protector se debilita y la atracción electrostática aumenta. La reducción de la concentración salina del sistema suero- células acrecienta la tasa de aproximación de los antígenos y anticuerpos y podría incrementar la cantidad de anticuerpos unidos.<sup>13</sup>

**A.7. Proporción antígeno anticuerpo.** El exceso de antígenos en relación con los anticuerpos podría resultar en una captación óptima de los anticuerpos. En

las muestras de inhibición o adsorción, esta circunstancia es útil. Sin embargo, en la mayoría de los estudios eritrocitarios el exceso de antígenos reduce el número de moléculas de anticuerpo unidas por glóbulo rojo, limitando su capacidad de aglutinación. Por lo tanto, en la mayoría de los procedimientos de rutina es preferible contar con anticuerpos en exceso.<sup>13</sup>

### **B. Segunda etapa: aglutinación**

Una vez que los anticuerpos se han unido a los antígenos de la superficie eritrocitaria, las células sensibilizadas se conforman en una red o malla. Este hecho permite visualizar la reacción. El tamaño y las propiedades físicas de las moléculas de anticuerpo, la concentración de los sitios antigénicos en cada célula y la distancia entre las células, afectan la aglutinación.<sup>13</sup>

Los puentes establecidos entre los anticuerpos ligados a los sitios antigénicos de glóbulos rojos adyacentes suelen resultar de la colisión al azar de las células sensibilizadas. En condiciones isotónicas, los glóbulos rojos no pueden aproximarse a menos de 50 – 100 Å.<sup>13</sup>

### **2.9. Albúmina Bovina**

La albúmina bovina, es un reactivo complementario a las técnicas inmunohematológicas diversas para potenciar la reacción entre anticuerpos de clase IgG y sus antígenos correspondientes. La albúmina actúa disminuyendo el potencial zeta y aumentando la constante dieléctrica del medio, con lo cual la fuerza de repulsión entre hematíes se reduce facilitando su aglutinación.<sup>14</sup>

### **2.10. Fundamento de la técnica Aglutininas en frío**

Esta técnica consiste en confrontar porciones de las manchas a analizar con suero anti-A y anti-B respectivamente, durante la cual se producirá la formación del complejo antígeno- anticuerpo.<sup>15</sup>

Para efectuar el ensayo se requiere una poli cubeta de vidrio transparente, con 4 hileras de excavaciones, siendo lo ideal que cada hilera conste de un mínimo de 12 pocillos. En la primera excavación de cada hilera se coloca una alícuota de material a analizar. En un par se colocan las gotas de suero anti-A y en el otro suero de anti B, se dejan macerar las muestras durante 24 horas. El reactivo utilizado aporta anticuerpos que reaccionan con el antígeno correspondiente según el diagrama antigénico de la sangre analizada, durante esta formación los anticuerpos reaccionantes se adhieren firmemente a los antígenos respectivos de modo que los anticuerpos sobrantes están en menor concentración que la original, por ausencia de antígenos en la muestra. Finalmente, mediante el

agregado de la gota de suspensión de glóbulos rojos lavados A y B respectivamente se podrá establecer el título o concentración remanente en cada hilera observando cual es la dilución máxima en la que no se produce aglutinación, es decir acúmulo de glóbulos rojos.<sup>15</sup>

En los blancos no hay reacción de modo que en esas hileras la concentración original no está alterada y por lo tanto allí se observará el mayor título. Por el contrario, si hubiera interacción antígeno-anticuerpo, el consumo de anticuerpos que sucedería en dicha reacción, generará una disminución del título respectivo de anticuerpos A, B o ambos, según sea el caso. Se establece como disminución significativa un mínimo de dos niveles, una disminución del título blanco con respecto a la muestra, está indicando la presencia de los antígenos correspondientes.<sup>15</sup>

### **2.11. Fundamento de la técnica Absorción –Elución**

La reacción antígeno-anticuerpo en la membrana del glóbulo rojo es reversible; es decir, el anticuerpo se asocia o cambia con su antígeno para formar complejos antígeno-anticuerpo, pero también se disocian para alcanzar su equilibrio; entendiéndose por tal, el punto en el cual la cantidad de complejos formados es igual al número de moléculas antígeno-anticuerpo disociados.<sup>16</sup>

Se ha establecido que la reacción entre el antígeno y el anticuerpo obedece a la Ley de acción de masas. Siendo la constante de asociación (k) en el equilibrio. En base a esto, el método Absorción-elución reconoce los antígenos, también llamados aglutinógenos de la membrana de los eritrocitos a través de las aglutininas o anticuerpos presentes en los antisueros específicos para cada grupo sanguíneo dentro del sistema ABO; es decir A, B, AB y O respectivamente.<sup>16</sup>

El fenómeno de absorción es la remoción de un anticuerpo en un suero mediante su fijación en un antígeno presente en la membrana de los eritrocitos de la muestra de sangre humana.<sup>16</sup>

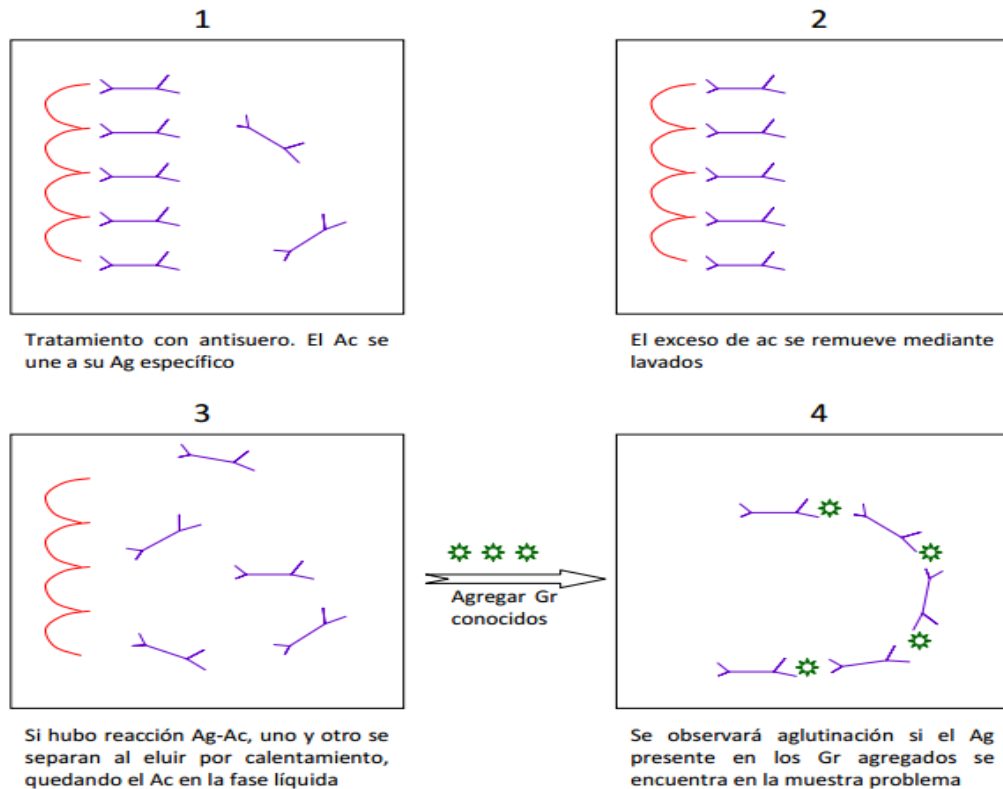
En una mancha de sangre humana seca, se encuentra todos los componentes de la sangre, pero totalmente deshidratado, haciendo la investigación dentro del sistema ABO, el grupo sanguíneo puede caracterizarse por sus aglutininas o por sus aglutinógenos. Haciendo constar que las aglutininas resisten mucho menos a la desecación y agentes exteriores por lo que su investigación da muchas veces resultados negativos aun tratándose de sangre que las poseen.<sup>16</sup>

Los aglutinógenos del sistema ABO tienen una naturaleza química conocida, son termoestables, se destruyen a más de 75°C, resisten la desecación y resultan destruidos por ácidos o bases lo cual indica que son más resistentes a condiciones adversas en que se encuentran las muestras. La formación del complejo Ag-Ac es una reacción que necesita de cierto tiempo para que se produzca, por lo cual es necesario un periodo de incubación, que es el lapso requerido para una cantidad equivalente de anticuerpo se una a su respectivo antígeno y con la fuerza iónica del medio de reacción, esto mide la avidéz del antisuero.<sup>16</sup>

Los estudios sobre el calor de las reacciones serológicas demuestran una considerable fuerza de intercambio de energía, lo que significa una combinación más firme entre el antígeno y su respectivo anticuerpo.<sup>16</sup>

Al terminar la maceración los anticuerpos específicos a los antígenos de la mancha, ya no se encuentran libres en el suero, ellos están ligados a los antígenos y forman el complejo conformando un enrejado tridimensional por atracción de cargas. Los aglutinógenos son bloqueados o inhibidos por las aglutininas del suero, ambos están absorbidos por la fibra o soporte que contiene la mancha, los que no forman complejo se encuentran libres y son parte del exceso que se deben eliminar todo en los lavados. Luego se procede a lavar en forma sucesiva girando la muestra o agitando con una bagueta en forma constante hasta eliminar todo tipo de exceso de anticuerpos o de antígenos que no haya reaccionado.<sup>16</sup>

El anticuerpo fijado puede separarse de los glóbulos rojos muy pronto si son dejadas en suspensión, las muestras una vez iniciado el procedimiento no debe detener. Para eliminar las globulinas no fijadas al glóbulo rojo, es importante que después de cada lavado la solución salina sea decantada totalmente.<sup>16</sup>



**Figura 2:** Fundamento de la técnica de absorción- elución.<sup>16</sup>

## 2.12. Optimización

Se puede definir como optimización al proceso de seleccionar, a partir de un conjunto de alternativas posibles, aquella que mejor satisfaga el o los objetivos propuestos. Se dice que se ha optimizado algo (una actividad, un método, un proceso, un sistema, etc.) cuando se han efectuado modificaciones en la fórmula usual de proceder y se han obtenido resultados que están por encima de lo regular o lo esperado. En este sentido, optimizar es realizar una mejor gestión de nuestros recursos en función del objetivo que perseguimos.<sup>17</sup>

### a. Precisión

La precisión describe la reproducibilidad de los resultados; es decir, la concordancia entre los valores numéricos de dos o más medidas replicadas o medidas que se han realizado exactamente de la misma forma. En general, la precisión de un método analítico se obtiene fácilmente mediante la simple repetición de la medida.<sup>18</sup>

### b. Repetibilidad

Es la precisión que estudia la variabilidad del método obtenido bajo las mismas condiciones de operación en intervalos corto de tiempo, por un mismo analista, en la misma muestra homogénea en un mismo laboratorio y en el mismo equipo.<sup>18</sup>

### **c. Reproducibilidad**

Es la precisión que estudia la proximidad existente entre los resultados provenientes de diversas mediciones en las cuales se han variado algunas condiciones de operación y en diferentes laboratorios.<sup>18</sup>

### **d. Exactitud**

La exactitud describe si el resultado experimental es el correcto o expresa la proximidad de este al valor verdadero o de referencia estrictamente hablando, el único tipo de medida que puede ser completamente exacto es aquel que consiste en el recuento de objetos. Todos los demás tipos de medidas contienen errores y aportan solo una aproximación de valor verdadero.<sup>18</sup>

### **e. Sensibilidad**

La sensibilidad de un método es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito. Dos factores limitan la sensibilidad; la pendiente de la curva de calibrado y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida. Entre dos métodos que tengan igual precisión será más sensible aquel cuya curva de calibrado tenga mayor pendiente.<sup>19</sup>

### **f. Especificidad**

La especificidad está definida como la habilidad que tiene el método para medir de forma inequívoca los analitos de interés en presencia de otros componentes que pudiesen estar presentes en la muestra.<sup>19</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de estudio**

El trabajo de investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho a una altitud de 2760 msnm con una temperatura promedio de 16,5°C y una humedad relativa promedio de 46 %.

#### **3.2. Población, muestra y sistema de muestreo**

##### **3.2.1. Población**

La investigación tuvo como población a todas las personas que pertenezcan al grupo sanguíneo A y B, en la ciudad de Ayacucho.

##### **3.2.2. Muestra**

Se consideró a 50 personas pertenecientes al grupo sanguíneo A y B; de los cuales 25 fueron del grupo sanguíneo "A" y los otros 25 fueron del grupo sanguíneo "B".

##### **3.2.3. Sistema de la muestra**

El sistema de muestreo fue del tipo discrecional, se trabajó con personas voluntarias.

##### **3.2.4. Características de la muestra**

Las muestras de sangre obtenidas para el trabajo de investigación, fueron de personas mayores de 18 años, entre varones y mujeres de la ciudad de Ayacucho.

#### **3.3. Etapa pre-analítica**

##### **3.3.1. Desinfección del área de trabajo**

Se desinfectó la mesa de trabajo con alcohol de 96° y con lejía, antes y después de cada ensayo.

### **3.3.2. Control de calidad**

El reactivo antisuero monoclonal Biotec anti-A, anti-B y anti-D se enfrentó con sangre conocida del grupo sanguíneo “A”, “B” y factor Rh positivo mediante la prueba en láminas.

### **3.3.3. Toma de muestra**

- Se verificó que los elementos por utilizar estén listos y que el paciente se sienta cómodo.
- Se colocó la ligadura cuatro dedos por encima del codo o a 10 cm por encima de éste y se pidió al donante que abra y cierre la mano varias veces, para favorecer la dilatación de las venas.
- Una vez escogida la vena, se desinfectó con una torunda de algodón embebida en alcohol al 70%.
- Se colocó la aguja sobre la vena y se perforó la piel haciendo avanzar la aguja entre 0,5 cm y 1 cm en el tejido subcutáneo, se insertó el tubo al vacío por la parte posterior y se extrajo 6 mL de sangre.
- Se retiró la aguja tirando del extremo doblado.
- Se colocó una torunda de algodón seco sobre la parte donde se encuentra oculta la aguja. Se sacó la aguja con un movimiento rápido y se depositó en un recipiente de metal con un desinfectante.
- Se pidió al donador que presione firmemente el algodón durante 3 minutos, con el brazo extendido.

### **3.3.4. Realización de las manchas**

- Obtenida la muestra de sangre se realizó el manchado en la tela poli algodón de 10x10 cm de color blanco con ayuda de una pipeta Pasteur, para lo cual se agregaron varias gotas de sangre en la tela.
- Posteriormente se dejaron secar los soportes de manchas de sangre en sombra, por un periodo de 72 horas.

## **3.4. Etapa analítica**

### **3.4.1. Técnica de adsorción- elución**

Esta técnica se llevó a cabo siguiendo el descrito por la Policía Nacional del Perú en 2007.<sup>20</sup>

- En una lámina excavada (marcada como A, B y Rh) se puso la tela de 3x3 mm que contiene la mancha de sangre del grupo sanguíneo A, B y Rh en cada excavación marcada, posteriormente se agregó una gota del antisuero anti “A”, anti “B” y anti D, tratando de que la muestra absorba todo lo posible del reactivo.

- Los soportes (tela) con manchas sanguíneas se dejó macerar en la lámina excavada por 24 horas a una temperatura de 22 a 23°C.
- Luego los soportes (tela) se colocaron en tubos rotulados como A, B y Rh respectivamente.
- Se lavaron los soportes (tela) en los tubos con solución salina fisiológica con ayuda de una bagueta de manera suave por tres veces.
- Terminado los tres lavados, se extrajo todo el líquido posible dejando solo la fibra de la tela en el fondo de los tubos.
- Luego se adicionó a cada tubo dos gotas de solución salina fisiológica.
- Los tubos que contienen los soportes (tela) se colocó en baño María a 56 °C durante 10 minutos.
- Pasado los 10 minutos se retiró los soportes (tela) de los tubos cuidadosamente con ayuda de un aplicador diferente, manteniendo únicamente la gota de suero fisiológico en cada tubo.
- Se agregó a cada tubo una gota de glóbulos rojos lavados del grupo sanguíneo “A”, “B” como correspondan.
- Se centrifugó a 3500 rpm por 3 minutos.
- Luego se observó el botón hemático en la base de cada tubo, y se agitó suavemente haciendo golpeteos con el dedo pulgar por 10 segundos.
- Se observó la presencia o ausencia de aglutinación y se comprobó con los patrones respectivos de cada grupo.
- Se realizó la lectura.

#### **3.4.2. Técnica de aglutininas en frío**

Esta técnica se llevó a cabo siguiendo el descrito por Bustos M en 2010.<sup>15</sup>

- En una lámina excavada (marcada como A, B y Rh) se puso la tela de 10x10 mm que contiene la mancha de sangre del grupo sanguíneo A, B y Rh en cada excavación marcada, posteriormente se agregó una gota del antisuero anti “A”, anti “B” y anti D, tratando de que la muestra absorba todo lo posible del reactivo.
- Los soportes (tela) con manchas sanguíneas se dejó macerar en la lámina excavada por 24 horas a una temperatura de 22 a 23°C.
- Luego los soportes (tela) se colocaron en tubos rotulados como A, B y Rh respectivamente.
- Terminado los lavados, se extrajo todo el líquido posible dejando solo la fibra de la tela en el fondo de los tubos.

- Luego se adicionó a cada tubo dos gotas de solución salina fisiológica.
- Se agitó suavemente los tubos que contienen los soportes (tela) y se incubó en una estufa a 37°C por 15 minutos exactamente.
- Pasado el tiempo, se retiró los soportes (tela) de los tubos cuidadosamente con ayuda de un aplicador diferente, manteniendo únicamente la gota de suero fisiológico en cada tubo.
- Se agregó a cada tubo una gota de albúmina bovina al 22%.
- Se agitó los tubos suave y firmemente.
- Luego se incubó los tubos en una estufa a 37°C por 4 minutos.
- Se sacó los tubos de la estufa y se agregó a cada tubo una gota de suspensión de glóbulos rojos lavados al 2% del grupo sanguíneo A en cada uno de los tubos del grupo sanguíneo A; una gota de suspensión de glóbulos rojos lavados al 2% del grupo sanguíneo B en cada uno de los tubos del grupo sanguíneo B.
- Se agitó e incubó los tubos nuevamente en la estufa a 37°C por 15 minutos.
- Se sacó de la estufa los tubos y se centrifugó a 3500 rpm por 3 minutos.
- Se observó la presencia de un botón de glóbulos rojos en la base de cada tubo, y se agitó suavemente haciendo golpeteos con el dedo pulgar por 10 segundos.
- Se realizó la lectura.

#### **3.4.3. Técnica de aglutininas en frío optimizada**

- En una lámina excavada (marcada como A, B y Rh) se puso la tela de 10x10 mm que contiene la mancha de sangre del grupo sanguíneo A, B y Rh en cada excavación marcada, posteriormente se agregó una gota del antisuero anti "A", anti "B" y anti "D", tratando de que la muestra absorba todo lo posible del reactivo.
- Los soportes (tela) con manchas sanguíneas se dejó macerar en la lámina excavada por 24 horas a una temperatura de 22 a 23°C.
- Luego los soportes (tela) se colocaron en tubos rotulados como A, B y Rh respectivamente.
- Se lavaron los soportes (tela) en los tubos con solución salina fisiológica con ayuda de una bagueta de manera suave por 5 veces y 8 veces para el factor Rh.
- Terminado los lavados, se extrajo todo el líquido posible dejando solo la fibra de la tela en el fondo de los tubos.

- Luego se adicionó a cada tubo dos gotas de solución salina fisiológica.
- Se agitó suavemente los tubos que contienen los soportes (tela) y se incubó en una estufa a 37°C por 15 minutos exactamente.
- Pasado el tiempo, se retiró los soportes (tela) de los tubos cuidadosamente con ayuda de un aplicador diferente, manteniendo únicamente la gota de suero fisiológico en cada tubo.
- Se agregó a cada tubo una gota de albúmina bovina al 22%.
- Se agitó los tubos suave y firmemente.
- Luego se incubó los tubos en una estufa a 37°C por 4 minutos.
- Se sacó los tubos de la estufa y se agregó a cada tubo una gota de suspensión de glóbulos rojos lavados al 2% del grupo sanguíneo A en cada uno de los tubos del grupo sanguíneo A; una gota de suspensión de glóbulos rojos lavados al 2% del grupo sanguíneo B en cada uno de los tubos del grupo sanguíneo B.
- Se agitó e incubó los tubos nuevamente en la estufa a 37°C por 15 minutos.
- Se sacó de la estufa los tubos y se centrifugó a 3500 rpm por 3 minutos.
- Se observó la presencia de un botón de glóbulos rojos en la base de cada tubo, y se agitó suavemente haciendo golpeteos con el dedo pulgar por 10 segundos.
- Se realizó la lectura.

### **3.5. Etapa post analítica**

#### **3.5.1. Interpretación de resultados**

##### **a. Técnica de adsorción elución**

- Si ocurrió aglutinación en el tubo “A”, pero no hubiese aglutinación en el tubo “B”, entonces la muestra pertenece al grupo sanguíneo “A”.
- Si no ocurrió aglutinación en el tubo “A”, pero si hubiese aglutinación en el tubo “B”, entonces la muestra pertenece al grupo sanguíneo “B”.
- Si ocurrió aglutinación en ambos tubos “A” y “B”, entonces la muestra pertenece al grupo sanguíneo “AB”.
- Si no ocurrió aglutinación en ambos tubos “A” y “B”, entonces la muestra pertenece al grupo sanguíneo “O”.
- Si ocurrió aglutinación en el tubo Rh, indica que la muestra es Rh positivo, si no ocurrió aglutinación es Rh negativo.

### **b. Técnica de aglutininas en frío y aglutininas en frío optimizada**

- Si no ocurrió aglutinación en el tubo “A”, pero si hubiese aglutinación en el tubo “B”, entonces la muestra pertenece al grupo sanguíneo “A”.
- Si ocurrió aglutinación en el tubo “A”, pero no hubiese aglutinación en el tubo “B”, entonces la muestra pertenece al grupo sanguíneo “B”.
- Si no ocurrió aglutinación en ambos tubos “A” y “B”, entonces la muestra pertenece al grupo sanguíneo “AB”.
- Si ocurrió aglutinación en ambos tubos “A” y B”, entonces la muestra pertenece al grupo sanguíneo “O”.
- Si no ocurrió aglutinación en el tubo Rh, indica que la muestra es Rh positivo, si ocurrió aglutinación es Rh negativo.

### **3.5.2. Determinación de validez diagnóstico**

Los parámetros que se evaluaron en la técnica son: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, precisión, repetibilidad, reproducibilidad y exactitud.

#### **• Precisión**

Para la determinación de la precisión se realizó en función de:

**Repetibilidad:** se evaluó por medio de 3 réplicas de cada estándar.

**Reproducibilidad:** se evaluó por triplicado.

- **Sensibilidad**                       $\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100 \%$

VP: verdadero positivo

FN: falso negativo

- **Especificidad**                       $\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$

VN: verdadero negativo

FP: falso positivo

- **Valor predictivo positivo**       $VPP = \frac{VP}{VP+FP} \times 100 \%$

VP: verdadero positivo

FP: falso positivo

- **Valor predictivo negativo**       $VPN = \frac{VN}{FN+VN} \times 100 \%$

VPN: valor predictivo negativo

VN: verdadero negativo

FN: falso negativo

#### **Exactitud**

Para calcular la exactitud se prepararon por triplicado las tres técnicas.

### **3.6. Diseño metodológico**

#### **3.6.1. Tipo de investigación**

Experimental

#### **3.6.2. Análisis de datos**

La recolección de datos se realizó por tablas de registro de resultados obtenidos al final de cada prueba experimental, empleando tablas dinámicas de Excel clasificado en subtítulos que se reporta como positivo o negativo de la prueba; se determinó el grado de concordancia utilizándose el estadístico Kappa; además, se determinó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada una de la técnicas y así poder comparar los resultados obtenidos.



#### **IV. RESULTADOS**



**Tabla 1.** Determinación de los grupos sanguíneos A, B y factor Rh mediante la técnica aglutininas en frío. Ayacucho 2016.

<b>Técnica aglutininas en frío</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Grupo sanguíneo</b>			<b>Factor Rh</b>	
	<b>A</b>	<b>B</b>		<b>A</b>	<b>B</b>
1	- - -	- - -		- - -	- - -
2	+ + +	- - -		- - -	+ + +
3	- - -	- - -		- - -	- - -
4	- - -	- - -		- - -	- - -
5	- - -	- - -		+ + +	- - -
6	- - -	+ + +		- - -	- - -
7	- - -	- - -		- - -	- - -
8	+ + +	- - -		- - -	- - -
9	- - -	- - -		+ + +	- - -
10	- - -	- - -		- - -	- - -
11	- - -	- - -		- - -	- - -
12	- - -	- - -		+ + +	- - -
13	- - -	- - -		- - -	- - -
14	+ + +	- - -		- - -	+ + +
15	- - -	- - -		- - -	- - -
16	- - -	- - -		- - -	- - -
17	- - -	- - -		+ + +	- - -
18	- - -	- - -		- - -	- - -
19	- - -	- - -		- - -	- - -
20	+ + +	- - -		- - -	- - -
21	- - -	- - -		- - -	- - -
22	- - -	+ + +		+ + +	- - -
23	- - -	- - -		- - -	- - -
24	- - -	- - -		- - -	+ + +
25	- - -	- - -		- - -	- - -

**Leyenda:**

- (-) : No aglutinación; corresponde al antisuero enfrentado, pertenece al grupo sanguíneo A y B.
- (+): Aglutinación; no corresponde al antisuero enfrentado, no pertenece al grupo sanguíneo A y B.
- (-) : No aglutinación; la muestra es Rh positivo.
- (+): Aglutinación; la muestra es Rh negativo.

**Tabla 2.** Determinación de los grupos sanguíneos A, B y factor Rh mediante la técnica aglutininas en frío optimizada. Ayacucho 2016.

<b>Técnica aglutininas en frío optimizada</b>				
<b>Muestra</b>	<b>Grupo sanguíneo</b>		<b>Factor Rh</b>	
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>1</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>2</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>3</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>4</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>5</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>6</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>7</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>8</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>9</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>10</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>11</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>12</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>13</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>14</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>15</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>16</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>17</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>18</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>19</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>20</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>21</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>22</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>23</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>24</b>	- - -	- - -	- - -	- - -
<b>25</b>	- - -	- - -	- - -	- - -

**Leyenda:**

- (-) : No aglutinación; corresponde al antisuero enfrentado, pertenece al grupo sanguíneo A y B.
- (+) : Aglutinación; no corresponde al antisuero enfrentado, no pertenece al grupo sanguíneo A y B.
- (-) : No aglutinación; la muestra es Rh positivo.
- (+) : Aglutinación; la muestra es Rh negativo.

**Tabla 3.** Determinación de los grupos sanguíneos A y B mediante la técnica aglutininas en frío optimizada, aglutininas en frío y absorción elución. Ayacucho 2016.

Muestra	Grupo sanguíneo					
	Técnica aglutininas en frío Optimizada		Técnica aglutininas en frío		Técnica absorción elución	
	A	B	A	B	A	B
1	-	-	-	-	+	+
2	-	-	+	-	+	+
3	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	+	+
5	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	+	+
8	-	-	+	-	+	+
9	-	-	-	-	+	+
10	-	-	-	-	+	+
11	-	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	+	+
13	-	-	-	-	+	+
14	-	-	+	-	+	+
15	-	-	-	-	+	+
16	-	-	-	-	+	+
17	-	-	-	-	+	+
18	-	-	-	-	+	+
19	-	-	-	-	+	+
20	-	-	+	-	+	+
21	-	-	-	-	+	+
22	-	-	-	+	+	+
23	-	-	-	-	+	+
24	-	-	-	-	+	+
25	-	-	-	-	+	+

**Leyenda:**

(-) : No aglutinación; corresponde al antisuero enfrentado, pertenece al grupo sanguíneo A y B para la técnica aglutininas en frío y aglutininas en frío optimizada.

(+) : Aglutinación; si corresponde al antisuero enfrentado, pertenece al grupo sanguíneo A y B para la técnica absorción elución.

**Tabla 4.** Determinación del factor Rh de los grupos sanguíneos A y B mediante la técnica aglutininas en frío optimizada, aglutininas en frío y absorción elución. Ayacucho 2016.

Muestra	Factor Rh					
	Técnica aglutininas en frío Optimizada		Técnica aglutininas en frío		Técnica absorción elución	
	A	B	A	B	A	B
1	-	-	-	-	+	+
2	-		-	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	+	+
5	-	-	+	-	+	+
6	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	+	+
9	-	-	+	-	+	+
10	-	-	-	-	+	+
11	-	-	-	-	+	+
12	-	-	+	-	+	+
13	-	-	-	-	+	+
14	-	-	-	+	+	+
15	-	-	-	-	+	+
16	-	-	-	-	+	+
17	-	-	-	-	+	+
18	-	-	-	-	+	+
19	-	-	-	-	+	+
20	-	-	-	-	+	+
21	-	-	-	-	+	+
22	-	-	+	-	+	+
23	-	-	-	-	+	+
24	-	-	-	+	+	+
25	-	-	-	-	+	+

**Leyenda:**

(-) : No aglutinación; la muestra es Rh positivo para la técnica aglutininas en frío y aglutininas en frío optimizada.

(+) : Aglutinación; la muestra es Rh positivo para la técnica absorción elución.

## V. DISCUSIÓN

En la tabla 1, se muestra los resultados de la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh mediante la técnica aglutininas en frío con sus respectivas repeticiones; donde, de las 50 muestras analizadas de un total de 25 muestras del grupo sanguíneo "A", 21 muestras no aglutinan, lo que significa que mediante esta técnica las 21 muestras corresponden al grupo sanguíneo "A" y las 4 restantes que aglutinan no corresponden al grupo sanguíneo "A"; mientras que de las 25 muestras del grupo sanguíneo "B", 23 muestras no llegaron a aglutinar, significa que mediante esta técnica las 23 muestras corresponden al grupo sanguíneo "B" y las 2 restantes que aglutinan no corresponden al grupo sanguíneo "B". Para el factor Rh de las 50 muestras, 42 muestras no aglutinaron; por tanto, las muestras fueron Rh positivo y los 8 corresponden al factor Rh negativo.

Como está establecido que la reacción entre el antígeno y el anticuerpo obedece a la ley de acción de masa, buscando una asociación que se encuentra en equilibrio, de acuerdo a la tesis de Modificación del Método Absorción - Elución para la detección del grupo sanguíneo en manchas secas<sup>16</sup>, el uso de la albúmina bovina al 22% que potencia la reacción entre el anticuerpo IgG y sus antígenos correspondientes, con lo cual la fuerza de repulsión entre hematíes se reduce facilitando su aglutinación, además después del agregado de los eritrocitos conocidos no se llega a observar la presencia de aglutinación porque hay una mayor proporción de anticuerpos; por tanto, no se consiguió una respuesta a los respectivos grupos sanguíneos en un 100%.

En la tabla 2, se observa los resultados de la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh mediante la técnica aglutininas en frío optimizada con sus respectivas repeticiones; donde, las 50 muestras analizadas no aglutinaron; por tanto, corresponden al antisuero enfrentado; lo mismo ocurre para el factor Rh

las 50 muestras no llegaron a aglutinar por tanto las muestras fueron Rh positivas.

Como es sabido, dentro del sistema Rh existen unos anticuerpos bloqueantes o aglutininas incompletas que se unen a los hematíes correspondientes, bloqueándolos sin aglutinarlos, pero basta añadir una cantidad de antiglobulina para producir la aglutinación<sup>10</sup>. Su aplicación al diagnóstico médico legal de la especificidad de las manchas es el siguiente: hematíes O Rh+ (D+), sensibilizados por anticuerpos bloqueantes, se aglutinan cuando se les adiciona suero antiglobulina o suero de Coombs. Si este anticuerpo se pone previamente en contacto con una proteína humana agotará su capacidad de reacción y al adicionarlo al sistema de hematíes ya no será capaz de aglutinarlos. El diagnóstico es positivo en lo que respecta a la especie humana cuando la reacción es negativa, es decir, la no aglutinación indicaría que la capacidad de aglutinar del suero de Coombs, quedó absorbida por las globulinas de la mancha, y por tanto, estas son humanas. Lo que nos permite explicar que el lavado de las telas después de macerar es muy importante y más para la determinación del factor Rh, porque se requiere mayor cantidad de muestra; por lo cual se hace necesario más lavados de los soportes ya que permite eliminar los anticuerpos libres al lavar con solución salina fisiológica y después del agregado de los eritrocitos conocidos no se llega a observar la presencia de aglutinación porque hay una mayor proporción de anticuerpos; además permite que se visualice mejor los resultados obtenidos.

En la tabla 3, se muestra los resultados de la determinación del grupo sanguíneo A y B utilizando las tres técnicas de las cuales 44 resultaron positivas con la técnica aglutininas en frío, 50 positivas con la técnica aglutininas en frío optimizada y 50 positivas con la técnica absorción elución de un total de 25 muestras del grupo sanguíneo A y 25 muestras del grupo sanguíneo B.

Según el análisis estadístico Kappa, el nivel de significancia va entre 0 a 1 y la fuerza de concordancia varía dependiendo del valor de K (pobre, débil, moderada, buena y muy buena). El valor de concordancia entre la técnica aglutininas en frío y la técnica aglutininas en frío optimizada; así mismo entre la técnica de aglutininas en frío y la técnica de absorción elución, el valor de  $K=0,824$ , por tanto el grado de concordancia es buena; mientras que para la técnica de aglutininas en frío optimizada y la técnica de absorción elución el valor de  $K=1,000$  por tanto el grado de concordancia es muy buena.

En la tabla 4, se muestra los resultados de la determinación del factor Rh del grupo sanguíneo A y B utilizando las tres técnicas; de las cuales 45 resultaron positivas con la técnica aglutininas en frío, 50 positivas con la técnica aglutininas en frío optimizada y la técnica absorción elución, de un total de 25 muestras del grupo sanguíneo A y 25 muestras del grupo sanguíneo B.

Según el análisis estadístico Kappa el nivel de significancia entre la técnica aglutininas en frío y la técnica aglutininas en frío optimizada; así mismo el nivel de significancia entre la técnica aglutininas en frío y la técnica de absorción elución el valor de  $K=0,824$  por tanto el grado de concordancia es buena. Mientras que para la técnica de aglutininas en frío optimizada y la técnica de absorción elución el valor de  $K=1,000$  por tanto el grado de concordancia es muy buena.

De acuerdo a los resultados expuestos, se puede afirmar que la técnica aglutininas en frío optimizada facilita la determinación del grupo sanguíneo A, B y del factor Rh que tiene mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica al igual que la técnica absorción elución, que es la técnica que consideramos como Gold estándar.



## VI. CONCLUSIONES

1. Se optimizó la técnica aglutininas en frío para la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh en manchas sanguíneas secas, que dio como resultado una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 100%.
2. Se desarrolló y optimizó la técnica aglutininas en frío, observándose que el lavado de las telas después de la maceración (antígeno-anticuerpo) en la técnica aglutininas en frío optimizada, facilitó visualizar mejor los resultados en la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh con un 100% de sensibilidad y especificidad.
3. Se comparó los resultados de la técnica aglutininas en frío y la optimización de esta con la técnica estándar absorción elución concluyendo que la técnica aglutininas en frío optimizada y absorción elución son óptimas para la determinación del grupo sanguíneo A, B y Rh, ya que se obtuvo valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del 100%; además se demostró la excelente repetibilidad que manejan estas pruebas; por tanto, la optimización de la técnica aglutininas en frío facilita la determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh.



## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Tener cuidado al momento del lavado de las telas (soportes), ya que, si no se lava cuidadosamente, al momento de verter el exceso de solución salina fisiológica se puede eliminar el soporte.
2. Evaluar en otros tipos de telas y/o soportes la técnica aglutininas en frío optimizada.
3. Analizar muestras de sangre de personas que presentan algún tipo de anomalía en la hemoglobina.
4. En todo momento tener presente la bioseguridad como barreras de protección (guardapolvo, guantes, mascarilla), en la manipulación de las muestras sanguíneas ya que son potencialmente peligrosas.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cacarico R. Evaluación de métodos de extracción de ADN humano a partir de muestras de sangre fresca, sangre seca e hisopeado bucal para la determinación de paternidad biológica por método de PCR-STR. Tesis doctoral, España; 2003.
2. Salaverry M, Dejean C, "Grupos Sanguíneos en Restos Momificados de una población Prehispánica Las Pirguas", Antropología Biológica. Edit. La Plata; Buenos Aires, Argentina. 1999.
3. Castillo M, "Determinación de Grupo Sanguíneo ABO en Mancha seca. Instituto Nacional de Ciencias Forenses". Medicina Legal. Edit. Mary Luz Morales; Bogotá, Colombia. 2008.
4. López S, Tecnología del ADN en el procesado de muestras forenses. Sevilla. España; 2010.
5. Melendez C, Factores físicos y químicos que influyen en la determinación de grupo sanguíneo ABO en manchas sanguíneas de interés forense. Ayacucho, 2013, Tesis para obtener el título profesional de biólogo en la especialidad de microbiología, Ayacucho, Perú, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Área académica de Ciencias Biológicas; 2015.
6. Gaensslen R, Lee C. Forensic Science An Introduction to Criminalistics de Forest. P.R. McGraw. New York; 2010: p.632-643.
7. Serology Forensic. Recuperado el 21 de Jul. 2006: disponible en: <http://faculty.ncwc.edu.edu/toconnor/425/425lect13.htm>.
8. Gisbert C. Medicina Legal y toxicología. Ediciones científicas y técnicas S.A. Reimpresión de la cuarta edición de 1991.
9. Vargas D. Biología Forense. Fluidos del cuerpo humano. Manual de Criminalística. 1ª Edic. Editorial Señal Editora; 2000.
10. Hemán W, "Hematología, Fundamento de Medicina". 6º Edición Medellín - Colombia, Editorial Marín Vieco. 2004.
11. Rae M, Denomme G, Grossman B y col. Manual técnico AABB MSQA. MT edit. 15ª Edic; 2007: p.284-290.
12. Salmon Ch, Cartron J, Rouger P. Less groupes sanguins chez l'homme. Edit.Masson; 1991.
13. Bautista S. Factores que intervienen en la reacción antígeno anticuerpo. Edit. Medigraphig. México; 2005.
14. Costa J. Linear Chemical S.L.2ª planta. Montgat. Barcelona España; 2010. Website [www.liner.es](http://www.liner.es).
15. Bustos M. Curso Química Forense. Módulo II. Centro de investigación criminalística – Cicrim [Curso en internet]. Argentina; 2010:p1-4 Disponible:[http://av.cicrim.com.ar/courses/QUIMICA/document/Curso\\_Quimica\\_Forense\\_Modulo\\_II\\_parte\\_2.pdf](http://av.cicrim.com.ar/courses/QUIMICA/document/Curso_Quimica_Forense_Modulo_II_parte_2.pdf).
16. Rojas V, "Modificación del Método Adsorción - Elución para la detección del grupo sanguíneo en manchas secas", Tesis licenciatura en Biología, Lima, Perú, Universidad Ricardo Palma, Área académica de Ciencias Biológicas; 1991.
17. Reklaitis G, Ravindran A. Engineering Optimization: Methods and Applications. New York; 2009.
18. Aguirre O. Validación de métodos analíticos. La asociación española de farmacéuticos de la industria (AEFI). España; 2010.
19. Castro M, Gascón S. Pujol M. Validación de Métodos Analíticos. A.E.F.I. Seccion Catalana. Madrid; 2010.
20. Policía Nacional del Perú, "Manual de procedimientos de criminalística". Ed. Universo S.A, Lima, Perú. 2007.



## **ANEXOS**



## Anexo 1

Estimación del grado de concordancia en la determinación del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío y aglutininas en frío optimizada, utilizando el estadístico Kappa.

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Técnica aglutininas en frío *						
Técnica aglutininas en frío optimizado	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%

### Técnica aglutininas en frío\*Técnica aglutininas en frío optimizado tabulación cruzada

Recuento		Técnica aglutininas en frío optimizado		
		A	B	Total
Técnica aglutininas en frío	Grupo sanguíneo A	21	0	21
	Grupo sanguíneo B	0	23	23
	IN	4	2	6
<b>Total</b>		<b>25</b>	<b>25</b>	<b>50</b>

### Medidas simétricas

		Error estándar			
		Valor	asintótico <sup>a</sup>	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
MEdida de acuerdo	Kappa	0,724	0,077	6,487	0,000
N de casos válidos		50			

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

## Anexo 2

Estimación del grado de concordancia en la determinación del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío y absorción elución, utilizando el estadístico Kappa.

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Técnica aglutininas en frío *	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
Técnica de absorción elución						

### Técnica aglutininas en frío\*Técnica de absorción elución tabulación cruzada

Recuento

		Técnica de absorción elución		
		A	B	Total
Técnica aglutininas en frío	Grupo sanguíneo A	21	0	21
	Grupo sanguíneo B	0	23	23
	IN	4	2	6
Total		25	25	50

### Medidas simétricas

		Valor	Error estándar		
			asintótico <sup>a</sup>	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo	Kappa	0,724	0,077	6,487	0,000
N de casos válidos		50			

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

### Anexo 3

Estimación del grado de concordancia en la determinación del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío optimizada y absorción elución, utilizando el estadístico Kappa.

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Técnica aglutininas en frío optimizado *	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
Técnica de absorción elución						

#### Técnica aglutininas en frío optimizado\*Técnica de absorción elución tabulación cruzada

Recuento		Técnica de absorción elución		
		A	B	Total
Técnica aglutininas en frío optimizado	Grupo sanguíneo A	25	0	25
	Grupo sanguíneo B	0	25	25
Total		25	25	50

#### Medidas simétricas

		Error estándar			
		Valor	asintótico <sup>a</sup>	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
MEdida de acuerdo	Kappa	1,000	0,000	7,071	0,000
N de casos válidos		50			

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

## Anexo 4

Estimación del grado de concordancia en la determinación del factor Rh del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío y aglutininas en frío optimizada, utilizando el estadístico Kappa.

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Técnica aglutininas en frío *						
Técnica aglutininas en frío optimizado	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%

### Técnica aglutininas en frío\*Técnica aglutininas en frío optimizado tabulación cruzada

Recuento

		Técnica aglutininas en frío optimizado		
		A	B	Total
Técnica aglutininas en frío	Factor Rh + "A"	20	0	20
	Factor Rh + "B"	0	22	22
	IN	5	3	8
Total		25	25	50

### Medidas simétricas

		Valor	Error estándar		Aprox. Sig.
			asintótico <sup>a</sup>	Aprox. S <sup>b</sup>	
Medida de acuerdo	Kappa	0,824	0,077	6,487	0,000
N de casos válidos		50			

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

## Anexo 5

Estimación del grado de concordancia en la determinación del factor Rh del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío y absorción elución, utilizando el estadístico Kappa.

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Técnica aglutininas en frío *	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
Técnica de absorción elución						

### Técnica aglutininas en frío\*Técnica de absorción elución tabulación cruzada

Recuento		Técnica de absorción elución		
		A	B	Total
Técnica aglutininas en frío	Factor Rh+ "A"	20	0	20
	Factor Rh+ "B"	0	22	22
	IN	5	3	8
<b>Total</b>		<b>25</b>	<b>25</b>	<b>50</b>

### Medidas simétricas

		Error estándar			
		Valor	asintótico <sup>a</sup>	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo	Kappa	0,824	0,077	6,487	0,000
N de casos válidos		50			

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

## Anexo 6

Estimación del grado de concordancia en la determinación del factor Rh del grupo sanguíneo A y B mediante la técnica aglutininas en frío optimizada y absorción elución, utilizando el estadístico Kappa.

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
2005 Técnica aglutininas en frío optimizado *	50	100,0%	0	0,0%	50	100,0%
Técnica de adsorción elución						

### Técnica aglutininas en frío optimizado \* Técnica de absorción elución tabulación cruzada

Recuento

		Técnica de absorción elución		
		A	B	Total
Técnica aglutininas en frío optimizado	Factor Rh+ "A"	25	0	25
	Factor Rh+ "B"	0	25	25
Total		25	25	50

### Medidas simétricas

		Error estándar			
		Valor	asintótico <sup>a</sup>	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo	Kappa	1,000	0,000	7,071	0,000
N de casos válidos		50			

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

## Anexo 7

(a) Toma de muestra de la sangre, (b) tela poli algodón de color blanco, (c) muestras de sangre del grupo sanguíneo A y B, (d) manchado por goteo en la tela de poli algodón.



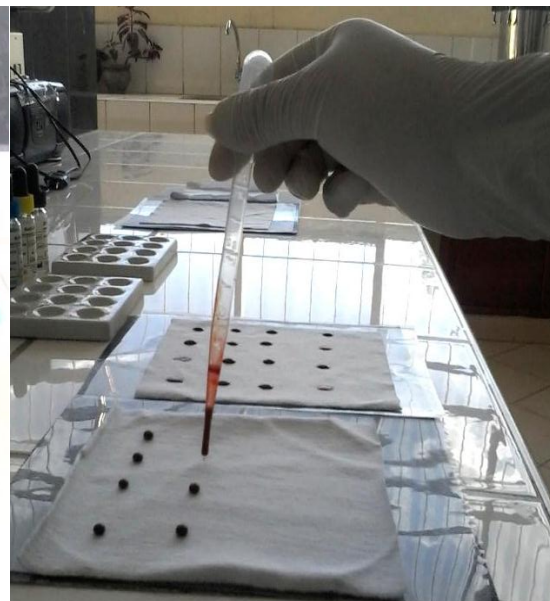
(a)



(b)



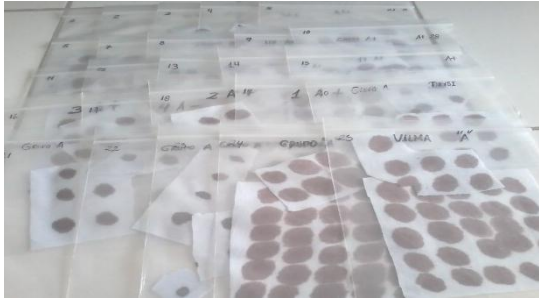
(c)



(d)

## Anexo 8

Figura 2. (a) Telas manchadas con sangre del grupo sanguíneo A, secado a temperatura por 72 horas, (b) telas manchadas con sangre del grupo sanguíneo B, secado a temperatura por 72 horas, (c) etiquetado en sobres de plástico con cierre hermético.



(a)

(b)



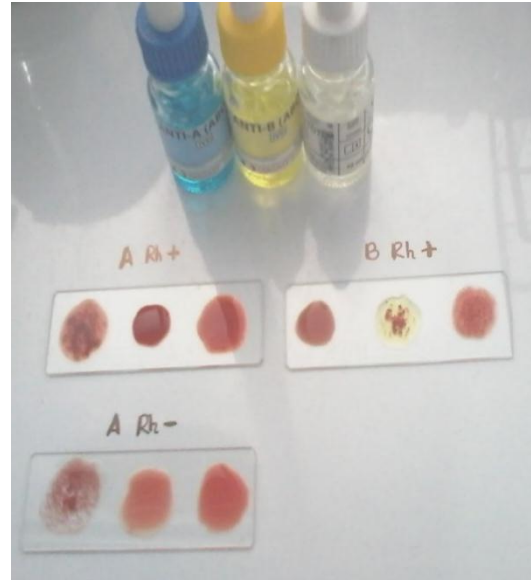
(c)

## Anexo 9

(a) Reactivos utilizados en la investigación; Antisueros monoclonales Biotech y albúmina bovina, (b) control de calidad de los Antisueros monoclonales, (c) recorte de las telas manchadas 10 x 10 mm, (d) maceramiento de las manchas por 24 horas en las placas excavadas.



(a)



(b)



(c)



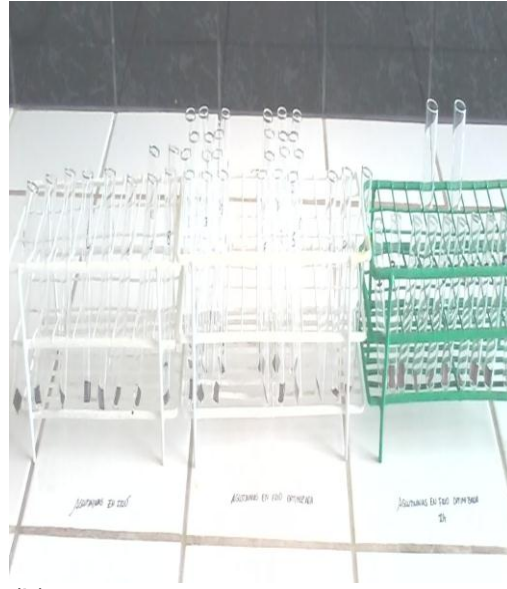
(d)

## Anexo 10

Figura 4. (a) Maceramiento por 24 horas en placa excavada, (b) tubos con las telas maceradas (c) lavado de las telas con solución salina fisiológica al 0,85% de manera suave por 5 veces y 8 veces para el factor Rh (d) formación del botón de hematíes luego de la centrifugación.



(a)



(b)



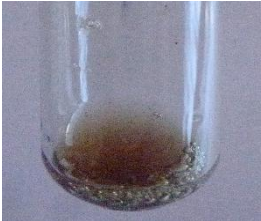
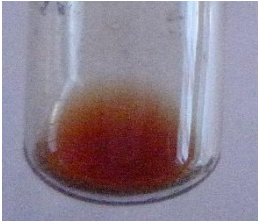
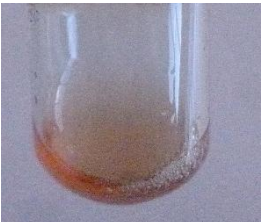
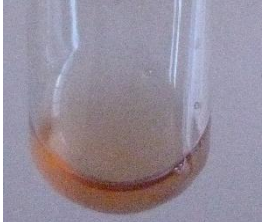






(c)



(d)

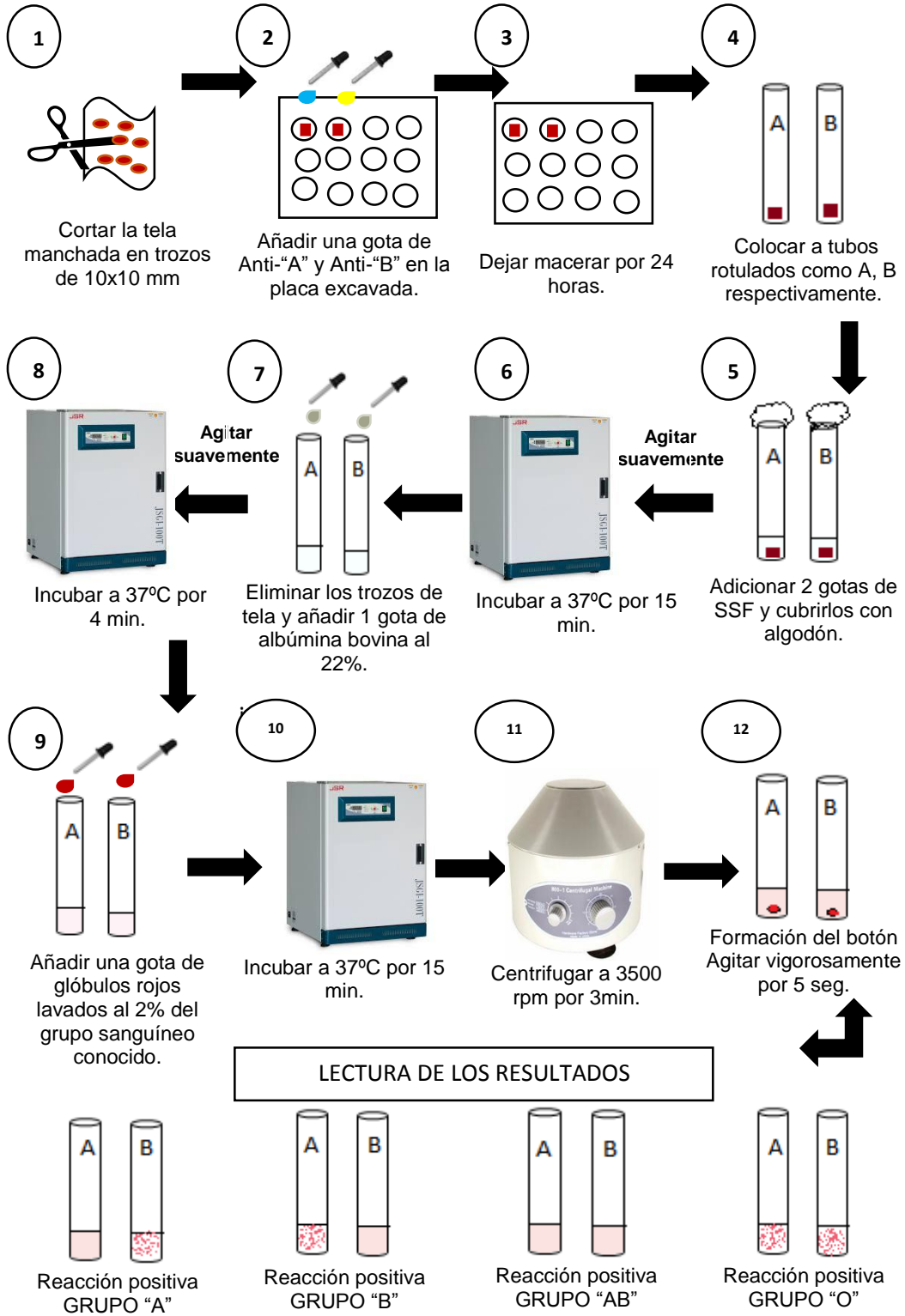
## Anexo 11

Observación de los resultados obtenidos

<b>Técnica aglutininas en frío</b>	
<b>Grupo "A"</b> 	<b>Grupo "B"</b> 
<b>Técnica aglutininas en frío optimizada</b>	
<b>Grupo "A"</b> 	<b>Grupo "B"</b> 
<b>Rh +</b> 	<b>Rh -</b> 
<b>Técnica absorción elución</b>	
<b>Grupo "A"</b> 	<b>Grupo "B"</b> 
<b>Rh +</b> 	<b>Rh -</b> 

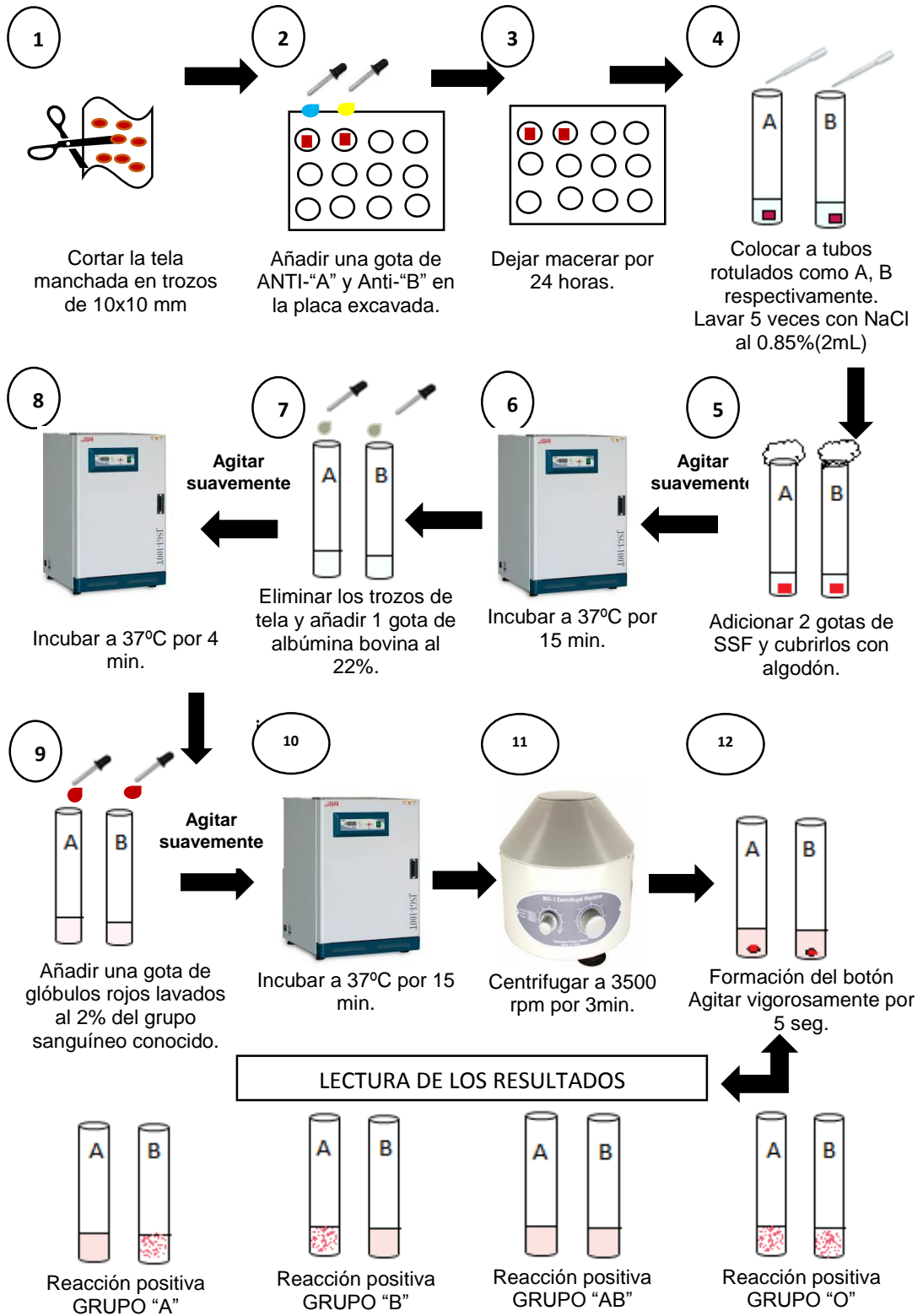
## Anexo 12

Protocolo del procedimiento de la técnica Aglutininas en frío.



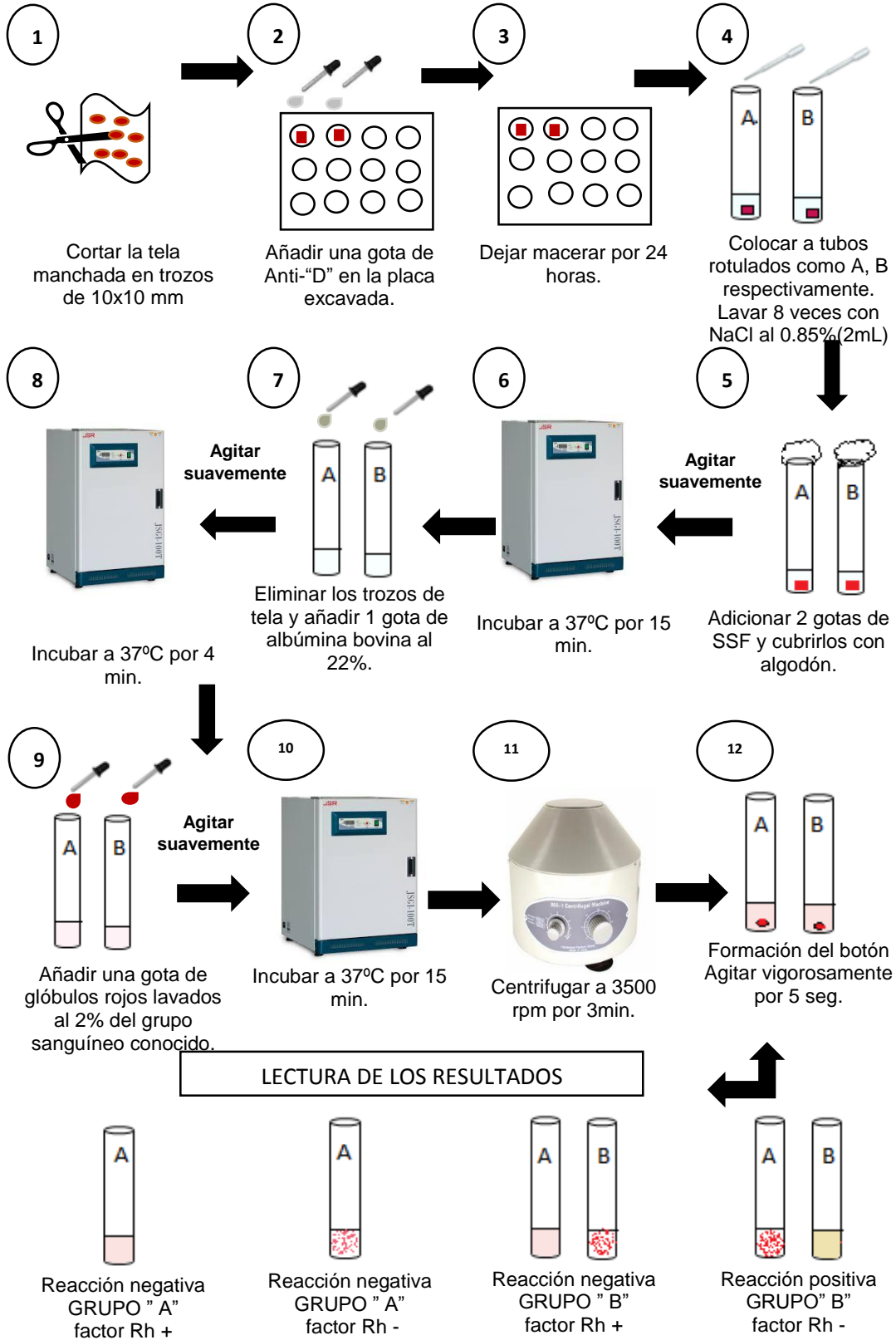
### Anexo 13

#### Protocolo del procedimiento de la técnica Aglutininas en frío optimizada



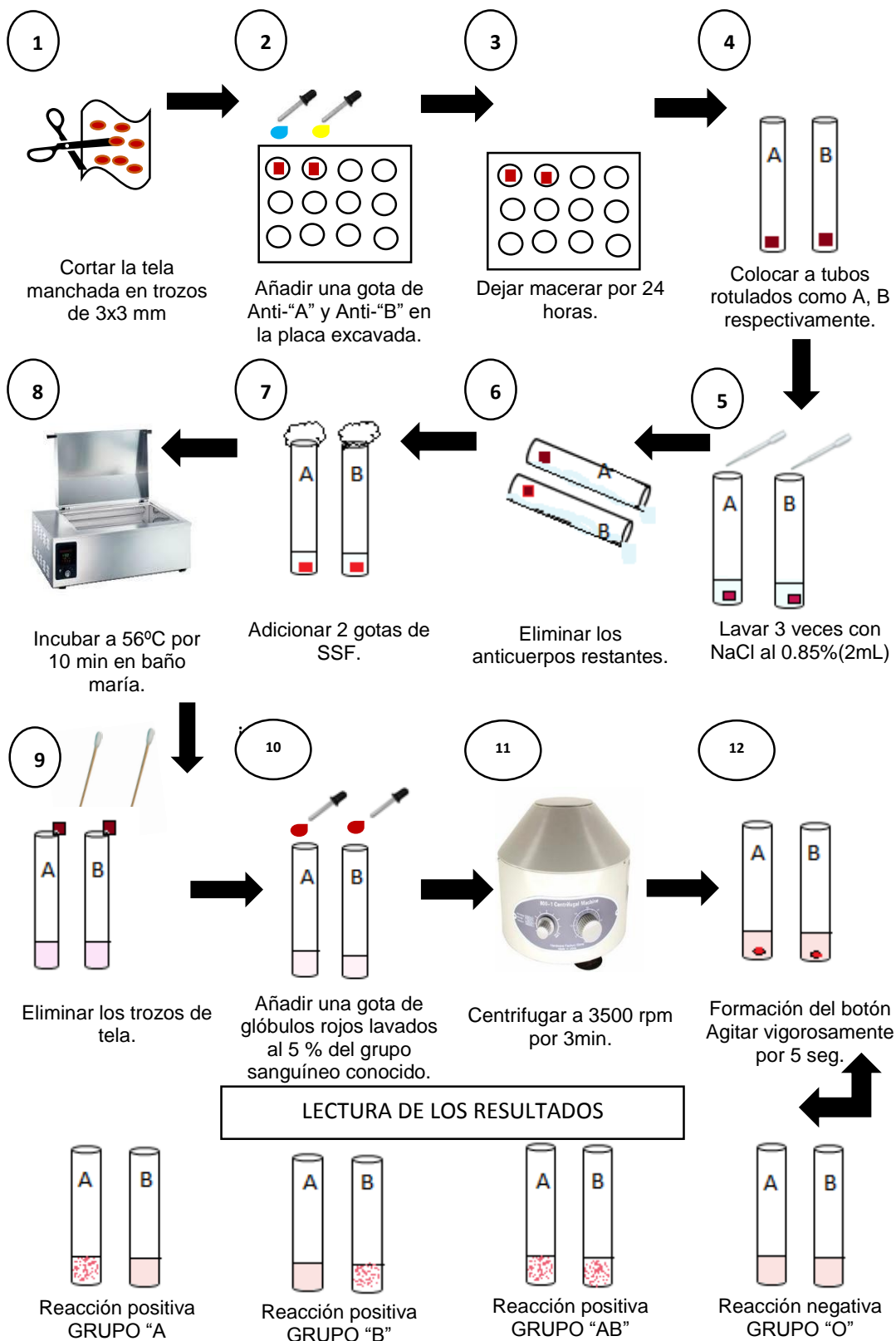
## Anexo 14

Protocolo del procedimiento de la técnica Aglutininas en frío optimizada para Rh.



## Anexo 15

### Protocolo del procedimiento de la técnica Absorción-elución



### Anexo 16

Validez y cálculo de pruebas diagnósticas: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica aglutininas en frío optimizada.

Resultado De La Prueba	Verdadero Diagnóstico	
	Enfermo	Sano
<b>Positivo</b>	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
<b>Negativo</b>	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

Técnica aglutininas en frío	Control positivo		Técnica aglutininas en frío	Control negativo	
	Grupo sanguíneo			Grupo sanguíneo	
	A	Factor Rh		B	Factor Rh
Verdaderos positivos	21	20	Falsos positivos	0	0
Falsos negativos	4	5	Verdaderos negativos	25	25
Total	<b>25</b>	<b>25</b>	Total	<b>25</b>	<b>25</b>

Técnica aglutininas en frío optimizada y absorción elución	Control positivo		Técnica aglutininas en frío optimizada y absorción elución	Control negativo	
	Grupo sanguíneo			Grupo sanguíneo	
	A	Factor Rh		B	Factor Rh
Verdaderos positivos	25	25	Falsos positivos	0	0
Falsos negativos	0	0	Verdaderos negativos	25	25
total	<b>25</b>	<b>25</b>	Total	<b>25</b>	<b>25</b>

### Anexo 17

Prueba diagnóstica: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo mediante la técnica aglutininas en frío optimizada, aglutininas en frío y absorción elución para el grupo sanguíneo A y B. Ayacucho 2016.

	<b>Técnica aglutininas en frío optimizada</b>		<b>Técnica aglutininas en frío</b>		<b>Técnica absorción elución</b>	
	<b>Grupo sanguíneo</b>		<b>Grupo sanguíneo</b>		<b>Grupo sanguíneo</b>	
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Sensibilidad</b>	100%	100%	84%	92%	100%	100%
<b>Especificidad</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Valor predictivo positivo</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Valor predictivo negativo</b>	100%	100%	86%	93%	100%	100%

### Anexo 18

Prueba diagnóstica: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo mediante la técnica aglutininas en frío optimizada, aglutininas en frío y adsorción elución para el factor Rh del grupo sanguíneo A y B. Ayacucho 2016.

	Técnica aglutininas en frío optimizada		Técnica aglutininas en frío		Técnica adsorción elución	
	Factor Rh		Factor Rh		Factor Rh	
	A	B	A	B	A	B
<b>Sensibilidad</b>	100%	100%	80%	88%	100%	100%
<b>Especificidad</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Valor predictivo positivo</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Valor predictivo negativo</b>	100%	100%	83%	89%	100%	100%

## Anexo 19

### Valoración del Índice Kappa

---

<b>Valoración del Índice Kappa</b>	
<b>Valor de k</b>	<b>Fuerza de la concordancia</b>
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

---

**Anexo 20**  
**Matriz de consistencia**

**TÍTULO:** Optimización de la técnica aglutininas en frío para la determinación del grupo sanguíneo A, B y Rh en manchas sanguíneas secas. Ayacucho – 2015  
**AUTOR:** Carla, ENCISO ORTIZ

TÍTULO	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	DISEÑO METODOLÓGICO
Optimización de la técnica aglutinina en frío para la determinación del grupo sanguíneo A, B y Rh en manchas sanguíneas secas. Ayacucho – 2015.	¿La optimización de la técnica aglutininas en frío facilitará la determinación del grupo sanguíneo A, B y Rh en manchas sanguíneas secas?	<p><b>Objetivos Generales</b> Optimizar la técnica aglutininas en frío para la determinación del grupo sanguíneo A, B y Rh en manchas sanguíneas secas.</p> <p><b>Objetivos Específicos</b> Desarrollar la técnica aglutininas en frío y su optimización. Comparar los resultados de la técnica aglutininas en frío y la optimización de esta técnica con la técnica estándar de absorción-elusión.</p>	<p><b>2.3.1. Biología Forense</b> La ciencia forense comprende una amplia diversidad de disciplinas científicas que trabajan de manera especializada para asistir al proceso de justicia mediante la evaluación de la evidencia aplicando la ciencia, de la ingeniería el arte y la medicina en especial en laboratorio, sobre todo en la resolución de aspectos relacionados con la ley. La ciencia forense involucra el reconocimiento, identificación individualización y evaluación del medio de prueba material o evidencia física empleando métodos científicos. Dentro del cual incluye todas las áreas dedicadas al análisis de la evidencia, traza o soporte de transferencia como el suelo, vidrio, fibra, cabello, sangre y fluidos biológicos se refiere al análisis comparativo de restos de materiales en diferentes áreas en caso de la biología forense mediante el análisis de fluidos, tejidos y estructuras biológicas con el fin de determinar el origen de un resto es un escenario del suceso particular <sup>4</sup>.</p>	La optimización de la técnica aglutininas en frío facilitará determinar el grupo sanguíneo A, B y Rh en manchas sanguíneas secas. Ayacucho - 2015.	<p><b>Variable independiente</b> Optimización de la técnica aglutininas en frío</p> <p><b>Indicadores</b> Precisión Exactitud Sensibilidad Especificidad</p> <p><b>Variable dependiente</b> La determinación del grupo sanguíneo A, B y factor Rh en manchas sanguíneas secas.</p> <p><b>Indicadores</b> Grupo sanguíneo A Grupo sanguíneo B Grupo sanguíneo AB Factor Rh</p>	<p><b>5.1. Tipo de investigación</b> Experimental- Analítico</p> <p><b>5.2. Definición de la población y muestra</b> <b>5.2.1. Población</b> La población son todas las personas que pertenezcan al grupo sanguíneo A, B en la ciudad de Ayacucho.</p> <p><b>5.2.2. Muestra</b> Se considerará a 50 personas pertenecientes al grupo sanguíneo A, B en la ciudad de Ayacucho.</p> <p><b>5.2.2.1. Recolección de muestras</b> Se pretende obtener un total de 50 muestras de sangre total; los cuales 25 procederán del grupo sanguíneo "A", 25 procederán del grupo sanguíneo "B", de las cuales se determinarán el grupo sanguíneo mediante la técnica aglutininas en frío ,la técnica absorción- elución y la técnica optimizada .</p> <p><b>5.3. Etapas del trabajo</b> <b>5.3.1. Etapa pre-analítica</b> <b>5.3.2. Etapa analítica</b> <b>5.3.3. Etapa post analítico</b> <b>Análisis estadístico</b> La recolección de datos se realizará por tablas de registro de resultados obtenidos al final de cada prueba experimental. El análisis estadístico se realizará empleando tablas dinámicas de Excel. Se determinará la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada una de la técnicas.</p>