



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

**ANTICUERPOS SENSIBILIZANTES EN LA INCOMPATIBILIDAD
ABO MATERNO – FETAL A TRAVES DEL TEST DE COOMBS
DIRECTO Y ELUCION CON REACTIVO COMERCIAL EN UN
HOSPITAL GENERAL DE HUANCAYO – 2019**

**SENSITIZING ANTIBODIES IN ABO MATERNAL
INCOMPATIBILITY - FETAL THROUGH DIRECT COOMBS TEST
AND ELUTION WITH COMMERCIAL REAGENT IN A GENERAL
HOSPITAL OF HUANCAYO – 2019**

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN HEMOTERAPIA Y
BANCO DE SANGRE**

AUTOR

Ogany Cyntia Olivera Vilcapoma

ASESOR

Juan José Montañez Mejía

LIMA - PERÚ

2022

Fecha de Aprobación: 8 de Febrero del 2022

Calificación: Aprobado

ASESOR DE TRABAJO ACADÉMICO

Licenciado Juan José Montañez Mejía

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0001-9893-8467

DEDICATORIA

El presente proyecto de grado va dedicado a Dios quien me guía por el buen camino, dándome fuerzas para salir adelante y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. A mi padre por su comprensión y consejos. A mis hermanas Kresset y Gabriela, por brindarme su tiempo y un hombro para descansar.

Al Lic. T.M. Juan Cortez Alejandro, más que un licenciado, un gran amigo, quien, con sus conocimientos y su trayectoria, ha guiado mis estudios con éxito.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a los docentes de la Escuela Profesional de Tecnología Médica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de la especialización en Hemoterapia y Banco de Sangre.

Al Lic. T.M. Edvin Santiago Trujillo, quien con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional. Al Dr. Julio Troncoso Mena, jefe del servicio de Hemoterapia y Banco de Sangre del Hospital Nacional Ramiro Priale Priale – Essalud, por contar con su valioso apoyo en este proyecto de investigación.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este proyecto será autofinanciado por el investigador.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

El presente trabajo académico por presentar es original, se han seguido los lineamientos respectivos para respetar la ética en investigación y que el mismo será utilizado para obtener un Título de Segunda Especialidad.

Tabla de contenidos

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	1
III. OBJETIVOS	3
3.1. Objetivo general	3
3.2. Objetivos específicos.....	3
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	4
4.1. Diseño del estudio	4
4.2. Población y lugar de estudio.....	4
4.2.1. Criterios de inclusión.....	4
4.2.2. Criterios de exclusión.....	4
4.3. Muestra y muestreo	4
4.4. Operacionalización de variables.....	5
4.5. Procedimientos y técnicas	6
4.6. Aspectos éticos	8
4.7. Análisis de datos.....	8
V. PRESUPUESTO	9
VI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	10
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

I. RESUMEN

La ocurrencia de enfermedad hemolítica por incompatibilidad ABO materno fetal es un problema de salud con variada frecuencia de reporte. La incompatibilidad puede ser detectada por múltiples pruebas de laboratorio. No obstante, no todas las pruebas tienen la misma capacidad de detección. Por ejemplo, un porcentaje mínimo de casos es positivo para la prueba de antiglobulina directa, mientras que un gran porcentaje tiene resultados negativos para la misma prueba. Es posible encontrar pequeñas cantidades de IgG unidas a la membrana de los eritrocitos del recién nacido y al realizar la técnica de elución con reactivo comercial, los casos previamente identificados como negativos podrían tener un resultado positivo. Por tanto, es necesario valorar el uso complementario de ambas pruebas con el objetivo de correctamente caracterizar los casos de incompatibilidad. **Objetivo:** Determinar la frecuencia de anticuerpos sensibilizantes detectados por el test de Coombs directo y elución con reactivo comercial en casos de incompatibilidad ABO materno – fetal en un hospital general de Huancayo durante el 2019. **Material y método:** Estudio de tipo observacional, descriptivo de corte transversal. Se incluirá todos los registros de recién nacidos con incompatibilidad ABO materno fetal (grupo sanguíneo del recién nacido es A, B, AB y el grupo sanguíneo de la madre O). Se recolectará información de las diversas pruebas ejecutadas y luego se caracterizará la ocurrencia y características de los casos de incompatibilidad. Las variables categóricas serán descritas utilizando frecuencias absolutas y relativas. El análisis de concordancia se realizará a través del índice de Kappa, y todo proceso será realizado en Stata v15.

Palabras clave: incompatibilidad ABO, anticuerpos, Coombs Directo, Elución

ABSTRACT

The occurrence of hemolytic disease due to maternal-fetal ABO incompatibility is a health problem with varying frequency of reports. The incompatibility can be detected by multiple laboratory tests. However, not all tests have the same detection capacity. For example, a small percentage of cases are positive for the direct antiglobulin test, while a large percentage have negative results for the same test. It is possible to find small amounts of IgG bound to the membrane of the erythrocytes of the newborn and when performing the elution technique with a commercial reagent, the cases previously identified as negative could have a positive result. Therefore, it is necessary to assess the complementary use of both tests in order to correctly characterize cases of incompatibility. **Objective:** To determine the frequency of sensitizing antibodies detected by the direct Coombs test and elution with a commercial reagent in cases of maternal-fetal ABO incompatibility in a general hospital in Huancayo during 2019. **Material and method:** Observational, descriptive study. cross. All records of newborns with maternal-fetal ABO incompatibility (newborn's blood group is A, B, AB and mother's blood group O) will be included. Information will be collected from the various tests carried out and then the occurrence and characteristics of the incompatibility cases will be characterized. Categorical variables will be described using absolute and relative frequencies. The concordance analysis will be carried out through the Kappa index, and the entire process will be carried out in Stata v15.

Key words: ABO incompatibility, antibodies, Direct Coombs, Elution

II. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la incompatibilidad ABO materno-fetal se presenta en un 15% de los embarazos, en los cuales el grupo sanguíneo del recién nacido es A, B, o AB y el grupo sanguíneo de la madre es O. Por tanto, la detección de incompatibilidad mediante herramientas de laboratorio es de suma importancia (1,2).

Feng y colaboradores (3) realizaron la comparación de dos técnicas; elución de Lui y elución por calor, encontrando que la técnica de Lui es superior, porque eluyó de manera eficiente los anticuerpos ABO. Además, indicó que la técnica de Lui es más práctica, posee mayor flexibilidad en el procedimiento y puede ser ampliamente utilizada en los laboratorios de rutina y diagnóstico. Por tanto, los investigadores sugirieron su uso para eluir los anticuerpos ABO, especialmente en la enfermedad hemolítica del recién nacido (3).

Estudios realizados en la región sugieren que la enfermedad hemolítica es un problema frecuente, y que los métodos de Coombs y elución son útiles para detectar casos desde un enfoque laboratorial. Un estudio realizado en Brasil evidenció que, de 3212 casos asociados a enfermedad hemolítica, 154 (4.8%) casos fueron de madres con Coombs positivos, 1453 (45.2%) recién nacidos fueron Coombs positivos, y 1605 (49.3%) tuvieron elución positiva (4). Un estudio realizado en Venezuela sugirió que de 23 casos de incompatibilidad ABO, 9 presentaron autoaglutinación positiva, 5 fueron positivos a Coombs directo positivo, y 20 positivos a eluido, existiendo casos con positividad a más de una prueba (5).

En 1999 en el banco de Teixits – Tarragona, se analizó la enfermedad hemolítica ABO y la comparación de dos técnicas; prueba de antiglobulina directa (PAD) y elución (2). La incompatibilidad ABO, utilizando muestras de sangre de cordón umbilical, se detectó en 12 casos por la prueba de antiglobulina directa (PAD), y otros 26 casos por elución del método ácido con el reactivo comercial Elu- Kit. Los autores sugieren que, la enfermedad hemolítica es un problema no frecuente, pero que, de alta relevancia para la salud pública, por lo cual la presencia de anticuerpos debe ser frecuentemente tamizada (2).

A pesar de la gran variabilidad de ocurrencia, en el año 2000 se reportó un caso interesante que demandó una investigación muy detallada. Una mujer caucásica, sin anticuerpos eritrocitarios irregulares, y con grupo sanguíneo A₂ fue madre. El recién nacido, del grupo sanguíneo A₂B tuvo una prueba directa de antiglobulina negativa. A las 36 horas de

edad, se realizó una transfusión de intercambio debido a un alto nivel de bilirrubina sérica. La madre tenía títulos altos de anticuerpos anti-B de tipo IgG y la elución indicaba la presencia de anticuerpos anti-B en los eritrocitos del niño (6). No obstante, es claro que este tipo de complicaciones no es parte de lo habitual, por lo cual, los autores sugieren que se desarrolle una estrategia que permita correctamente tamizar a los recién nacidos.

Por el año 2009 en Madrid, se realizó un estudio sobre el test de coombs directo en recién nacidos. De un total de 1033 recién nacidos, 54 (5.2%) tuvieron un resultado positivo para Coombs directo. De los 54, 22 (40.7%) fueron positivos a anti-A materno, 10 (18.5%) a anti-B materno, 17 (31.5%) casos a anti-D materno, y 5 (9.3%) positivos a incompatibilidad ABO con recuperación de un anti-D en el eluido (7). En el 2010 en Barcelona, se estudiaron 4460 muestras de sangre de cordón de recién nacido detectándose un total de 194 (4.2%) casos positivos prueba directa de antiglobulina, de los cuales 101 (52.1%) casos fueron casos positivos por elución para incompatibilidad ABO (8).

Recientemente, en el 2018, en el banco de Central de sangre del Centro Médico Nacional La Raza se realizó un estudio de casos (9). Una muestra sanguínea de un recién nacido de 16 días de vida, con reacción secundaria a incompatibilidad a grupo sanguíneo fue investigado detalladamente. Los resultados del recién nacido mostraron grupo sanguíneo O Rh positivo, y antiglobulina directa negativa, mientras que la madre fue del grupo sanguíneo A Rh positivo, y antiglobulina directa negativa. Luego de una serie de experimentos y evaluación prospectiva, se logró determinar la incompatibilidad del recién nacido mediante la técnica de eluato con reactivo Elu-Kit (9). Los autores sugieren que la investigación, en caso de inconsistencias, siempre debe ser prospectiva y utilizando múltiples métodos que permitan caracterizar con precisión la posible incompatibilidad.

El mecanismo por el cual se produce la incompatibilidad está mediado por la interacción que existe entre el antígeno eritrocitario y los anticuerpos circulantes (10, 11). Por tanto, es posible poder reconocer esta interacción utilizando métodos serológicos. Los anticuerpos sanguíneos que interactúan en la incompatibilidad son del tipo G, M, o ambos, aun así, los del tipo A también juegan un rol importante dada su capacidad de fijar complemento por algunos anticuerpos (12).

A la fecha, la incidencia de incompatibilidad es heterogénea en diversas partes del mundo. No obstante, existe una clara necesidad de caracterizar la ocurrencia de

incompatibilidad, así como también, mediante diversas técnicas de laboratorio, generar evidencia para poder entender de mejor forma los mecanismos involucrados en la enfermedad hemolítica (13-15). Por otro lado, es importante realizar una evaluación de la utilidad de las diversas técnicas y estrategias de laboratorio para demostrar y validar su utilidad en la práctica laboratorial (13, 15). En base a los antecedentes descritos, el propósito de esta investigación es evaluar la prueba de Coombs Directo y la técnica de elución con reactivo comercial en la investigación de anticuerpos en casos de incompatibilidad ABO materno - fetal. Los resultados generados por este estudio permitirán trazar una línea base y plantear una estrategia diagnóstica integrada por dos pruebas de laboratorio que permitan lograr mayor fidelidad en los resultados. Por lo anteriormente mencionado se plantea la siguiente pregunta de investigación.

¿Cuál es la frecuencia de anticuerpos sensibilizantes detectados por el test de Coombs directo y elución con reactivo comercial en casos de incompatibilidad ABO materno – fetal en un hospital general de Huancayo durante el 2019?

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Determinar la frecuencia de anticuerpos sensibilizantes detectados por el test de Coombs directo y elución con reactivo comercial en casos de incompatibilidad ABO materno – fetal en un hospital general de Huancayo durante el 2019.

3.2. Objetivos específicos

- Describir la frecuencia de anticuerpos sensibilizantes detectados por el test de Coombs directo y elución con reactivo comercial en casos de incompatibilidad ABO materno – fetal de acuerdo al sexo del recién nacido
- Determinar la frecuencia de reactividad del Test de Coombs Directo y elución con reactivo comercial.
- Describir el anticuerpo ABO más frecuente asociado a sensibilización eritrocitaria.
- Determinar la concordancia de resultados del Test de Coombs Directo y elución con reactivo comercial.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

El estudio es de tipo observacional, descriptivo, y de corte transversal.

4.2. Población y lugar de estudio

Dado que el estudio está planteado para incluir a todos los resultados de casos de incompatibilidad durante el 2019, la población está definida por ese universo. Por tanto, se incluirá en este estudio a todos los registros de recién nacido con incompatibilidad ABO materno fetal (grupo sanguíneo del recién nacido es A, B, AB y el grupo sanguíneo de la madre O), procedente del área de Neonatología, de un hospital general de Huancayo.

4.2.1. Criterios de inclusión

- Registro de un recién nacido con incompatibilidad ABO materno fetal, cuyo grupo sanguíneo del recién nacido sea A, B, o AB, y el grupo sanguíneo de la madre sea O
- Registro de un recién nacido con enfermedad hemolítica asociada a una causa diferente a incompatibilidad y con pruebas diagnósticas que sustenten ausencia de incompatibilidad por grupo mayor

4.2.2. Criterios de exclusión

- Registro de un recién nacido con hiperbilirrubinemia de causa no asociada a enfermedad hemolítica por incompatibilidad
- Registro de un recién nacido con historial séptico

4.3. Muestra y muestreo

Dado que el estudio propone enrolar a todos los registros de recién nacidos con incompatibilidad ABO materno fetal, no se desarrolla un cálculo de tamaño de muestra. De esta forma, el estudio a desarrollar no estará limitado por un tamaño mínimo de sujetos para responder a la pregunta de investigación. Además, dado que se incluirá al universo de casos, el estudio tendrá una máxima representatividad a nivel poblacional.

4.4. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Tipo de variable, y escala de medición
Sexo del recién nacido	Característica biológica definida por su condición física	Característica definida de acuerdo al registro del recién nacido	Varón, Mujer	Categórica, dicotómica, nominal
Anticuerpos sensibilizantes por Test de Coombs Directo	Molécula unida al antígeno eritrocitario de clase IgG adherido a los glóbulos rojos.	Nos permitirá saber la frecuencia de anticuerpos sensibilizados a través del Test de Coombs Directo.	Positivo, Negativo	Categórica, dicotómica, nominal
Anticuerpos sensibilizantes por Elución con reactivo comercial	Molécula unida al antígeno eritrocitario que es eluida o separada por un reactivo comercial.	Nos permitirá saber la ocurrencia de reactividad de anticuerpos sensibilizados con reactivo comercial.	Positivo, Negativo	Categórica, dicotómica, nominal
Tipo de anticuerpo	Tipo de molécula definida por su estructura	Tipo de anticuerpo de acuerdo a los resultados de las pruebas de laboratorio	Anticuerpo contra A1, B, u O	Categórica, politómica, nominal

4.5. Procedimientos y técnicas

Test de Coombs Directo – Prueba en tubo (16)

Investigación serológica: Un test de Coombs Directo positivo es útil en las siguientes estrategias de investigación; estudiar a los eritrocitos que dan un TCD positivo con reactivos anti- IgG para caracterizar el tipo de proteínas que recubren a los eritrocitos, y para estudiar un eluido de los eritrocitos con TCD positivo para definir si tiene anticuerpos dirigidos contra los eritrocitos.

Procedimiento:

1. Colocar una gota de glóbulos rojos en un tubo de ensayo luego agregar solución salina fisiológica (SSF) al 0.9%. Luego, proceder con un paso de centrifugación por espacio de 2 minutos a 3500 revoluciones por minuto (rpm), y luego decantar completamente el sobrenadante y repetir el mismo proceso de lavado 3 veces.
2. Posteriormente realizar una suspensión de glóbulos rojos al 5%. En un tubo añadir una gota del reactivo de antiglobulina humana y una gota de la suspensión, mezclar y centrifugar por 15 segundos a 3500 rpm, o por 1 minuto a 1000 rpm
3. Mover suavemente el tubo desprendiendo el botón, observando si hay presencia de aglutinación o no.

Elución con reactivo comercial - Elukit (17)

Principio: Los glóbulos rojos adheridos al anticuerpo deben ser lavados para eliminar rasgos de proteína empleando una solución de lavado especial que mantendrá la unión del anticuerpo establecido. Este proceso está dado por el uso de tres soluciones; solución de lavado para lavar los glóbulos rojos libres de anticuerpo, solución de elución para separar el anticuerpo fijado de los glóbulos rojos, y solución tamponada que neutraliza el proceso de elución.

Procedimiento:

1. Poner en un tubo de ensayo una gota de la suspensión de glóbulos rojos lavada, agregar 5 a 10 gotas de solución salina fisiológica (SSF), centrifugar por 30 segundos a 3400 rpm, eliminar el completo el sobrenadante de salina.

2. Colocar 2 gotas de eluido, mezclar e incubar en un baño maría por espacio de 10 minutos a 37°C, seguidamente añadir 5 a 10 gotas de solución de lavado, centrifugar a 30 segundos por 3400 rpm, decantar la solución.
3. Adicionar 1-2 gotas de antiglobulina humana y centrifugar 15 segundos a 3400 rpm, o por 1 minuto a 1000 rpm. Someter a una agitación y examinar la presencia de aglutinación.

Células conocidas (A₁, B y O) – Panel ABO (18)

Principio: Cuando los eritrocitos se congelan, forman cristales de hielo extracelulares que atraen el agua del entorno. Aumenta la osmolaridad provocando la salida de agua de los eritrocitos, y a medida que las membranas se alteran, el anticuerpo se disocia recuperando anticuerpos ABO.

Muestra

1. Concentrados de glóbulos rojos lavados entre cuatro y seis veces con grandes volúmenes de solución salina.
2. Sobrenadante salino del último lavado de los glóbulos rojos en estudio.

Procedimiento

1. En un tubo mezclar 0,5 ml de eritrocitos con tres gotas de solución salina, tapar el tubo y rotarlo para recubrir las paredes con las células, Colocar el tubo en posición horizontal en el congelador durante 10 minutos de 6°C a 70°C.
2. Retirar el tubo del congelador y calentar con agua corriente caliente, centrifugar durante 2 minutos a 900-1000 rpm.
3. Transferir el sobrenadante (eluato) a un tubo limpio y evaluar en paralelo con el sobrenadante del último lavado con células conocidas (A₁, B), las células de grupo O son para control, analizar a temperatura ambiente a 37 °C y finalizar en prueba Antiglobulina humana (AGH).

Interpretación

- Negativo: El eluato no reaccionará con las células A y/o B.
- Positivo: El eluato puede reaccionar con las células conocidas A y/o B.
- Inválido: Cuando las células de grupo O reaccionan con el eluato.

4.6. Aspectos éticos

El presente estudio de investigación respetará la vida humana y todos los principios de privacidad y directivas de la Dirección Universitaria de Investigación Ciencia y Tecnología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. No se revelará la identidad del recién nacido y de la madre y se preverá la parte de la bioseguridad. El proyecto en primaria instancia será registrado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, y luego será enviado a evaluación al Comité Institucional de Ética. Asimismo, el proyecto será sometido al centro de salud para la respectiva evaluación técnica-científica, y ética.

Dado que este estudio propone trabajar con registros del laboratorio o del hospital, no será necesario recolectar consentimientos informados ni otros relacionados a los procedimientos puesto que, todo procedimiento será realizado por la institución y no por el grupo de investigación. Asimismo, es importante aclarar que lo propuesto en este estudio no contrapone los procedimientos de rutina, ni propone alterarlos con el propósito de responder a los objetivos planteados. Por el contrario, evaluará y servirá de guía para valorar el trabajo realizado en la institución.

4.7. Análisis de datos

La información recolectada será digitalizada y se realizará un control de calidad al 20% de las transcripciones para valorar la calidad del registro. Luego, las variables serán resumidas utilizando frecuencias absolutas y relativas, así como frecuencias acumuladas según corresponda. Se elaborará gráficos que permitan el mejor resumen de las variables categóricas. Asimismo, se elaborarán tablas resumen de forma global y estratificadas por sexo para responder a los objetivos secundarios propuestos en este estudio. Finalmente, dado que se propone enrolar a toda la población, se estimarán frecuencias con intervalos de confianza al 95%. Se realizará una prueba de Kappa para evaluar el acuerdo de ambas pruebas, y el estimado será acompañado de un intervalo de confianza al 95%. Todo el análisis será realizado en el software estadístico de Stata v15.

V. PRESUPUESTO

Este proyecto será autofinanciado por el investigador

PRESUPUESTO				
TIPO	DESCRIPCION	CANTIDAD	HONORARIOS	TOTAL
RECURSOS HUMANOS	Investigador principal	1	ad honore	0
	Asesor metodológico	1	ad honore	0
	Asesor temático	1	S/.2,000.00	S/.2,000.00
	Digitador base de datos	1	S/.1,000.00	S/.1,000.00
	DESCRIPCION	CANTIDAD	COSTO	TOTAL
UTILES DE ESCRITORIO	Útiles de Escritorio	6	S/.3.30	S/.20.00
	Fotocopias	275	S/.0.20	S/.55.00
	Separatas	6	S/.2.00	S/.12.00
MATERIALES DE LABORATORIO	Tubos de Citrato	200	S/.50.00	S/.100.00
	Jeringas	200	S/.0.30	S/.60.00
	Tubos pírex	250	S/.8.50	S/.30.00
	Guantes	1 caja	S/.9.00	S/.9.00
	Reactivo de antiglobulina	1	S/.600.00	S/.600.00
	Reactivo comercial de Elukit	12 kits	S/.200.00	S/.2,400.00
	Pipetas pasteur	200	S/.2.90	S/.70.00
	Puntas	200	S/.15.00	S/.30.00
SERVICIOS	Movilidad	0	S/.400.00	S/.40.00
	Imprevistos	0	S/.35.00	S/.35.00
TOTAL				S/.6,461.00

VI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA - Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Revisión bibliografía y planteamiento del proyecto	X	X															
Elaboración del Proyecto de Investigación		X															
Evaluación, registro y aprobación del proyecto en la Facultad			X														
Evaluación, registro y aprobación del proyecto en el comité de ética				X													
Evaluación, registro y aprobación del proyecto en el centro de salud				X													
Ejecución del Proyecto					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análisis de datos																X	
Informe Final del Proyecto																	X

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baptista G, Hernández M, Galindo D, Santamaria H, Rosenfeld M. Utilidad de la prueba directa de Coombs en el tamiz neonatal. Bol Med Hosp Infant Mex. 2009; 66: 1-9.
2. Cid V, Elies F. Estudio inmunohematológico de la enfermedad hemolítica ABO. Anales Españoles de Pediatría. 2000; 53: 249-252.
3. Feng CS, Kirkley KC, Eicher CA, de Jongh DS. The Lui elution technique. A simple and efficient method for eluting ABO antibodies. Transfusión. 1985 septiembre-octubre; 25 (5): 433-4.
4. Cianciarullo MA1, Ceccon ME, Vaz Fv. Prevalence of immunohematologic tests at birth and the incidence of hemolytic disease in the newborn. Rev Assoc Med Bras (1992). 2003 enero-marzo; 49 (1): 45-53.
5. Mijares M, Linares J, Romero E. Enfermedad hemolítica del recién nacido por isoimmunización por grupos sanguíneos. Rev. Soc. Med. Hosp. San Juan de Dios. 1997; 18(18): 49-57.

6. Kumlien G, Sarman I, Shanwell A. A case of neonatal ABO immunization which was difficult to diagnose. The mother with blood group A2 and the infant with negative direct antiglobulin test. *Lakartidningen*. 20 de septiembre de 2000; 97 (38): 4138-40.
7. Mora, R. Córdoba, G. Merino, MD. Exojo, P. Sánchez, M. Martínez, B. Crespo, J. García, L. Ercoreca. El test de Coombs directo en recién nacidos como screening de enfermedad hemolítica perinatal. Sesión de posters. 2009; 20: pág. 293.
8. M. Dolores. Prueba directa de antiglobulina positiva en recién nacidos: importancia de la correcta determinación de las causas que la producen. Sesión de posters. 2010; 21: pág. 233.
9. Mancilla C, Soto S. Estudio inmunohematológico a recién nacido tras reporte de reacción transfusional durante exanguinotransfusión. *Rev Mex Med Tran*. 2018; 11 (1): 1-32.
10. Arbeláez G. Fundamentos de genética e inmunología para bancos de sangre y medicina transfusional. *Medicina y Laboratorio*. 2009; 15:1-2.
11. Linares G. *Inmunohematología y Transfusión*. 1ed. Caracas: Cromotip; 1986.
12. S. Grispan. Grupos sanguíneos ABO y Rh. *Rev. Médica Hondur*. 1983; 51: pág. 105.
13. Geaghan SM. Diagnostic laboratory technologies for the fetus and neonate with isoimmunization. *Semin Perinatol*. 2011 Jun;35(3):148-54. doi: 10.1053/j.semperi.2011.02.009. PMID: 21641488.
14. Fasano RM. Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016 Feb;21(1):28-34. doi: 10.1016/j.siny.2015.10.006. Epub 2015 Nov 14. PMID: 26589360.
15. Hendrickson JE, Delaney M. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn: Modern Practice and Future Investigations. *Transfus Med Rev*. 2016 Oct;30(4):159-64. doi: 10.1016/j.tmr.2016.05.008. Epub 2016 May 26. PMID: 27397673.
16. Regina M. La prueba de antiglobulina directa positiva y hemólisis de causa inmunológica. *Manual Técnico*. 18ª.ed. Buenos Aires: American Association of Blood Banks; 2018.p. 497-529.
17. Instrucciones del Kit Gamma Elu-Kit II. USA; 2005. http://www.felsan.com.ar/productos/imagenes/incertoscificadosimmun/pdf_insert%20paneles/Gamma%20EluKit%20II.pdf
18. Métodos para investigar una prueba de antiglobulina directa positiva *Manual Técnico*. 18ª.ed. Buenos Aires: American Association of Blood Banks; 2018.p. 1012.