

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA

ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE LA FRECUENCIA DEL ANTÍGENO
D DÉBIL Y SU RELACIÓN CON LOS ANTÍGENOS
ERITROCITARIOS DEL SISTEMA RH “C Y E”, EN DONANTES
VOLUNTARIOS DE SANGRE DEL HEMOCENTRO DE LA CRUZ
ROJA ECUATORIANA, 2011-2014

GALLEGOS BARRERA CATHERINE ESTEFANÍA

DIRECTORA: Máster Rosa Chiriboga Ponce.

QUITO, 2016

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, GALLEGOS BARRERA CATHERINE ESTEFANÍA, C.I. 1714483334; autora del trabajo de graduación titulado: ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE LA FRECUENCIA DEL ANTÍGENO D DÉBIL Y SU RELACIÓN CON LOS ANTÍGENOS ERITROCITARIOS DEL SISTEMA RH "C Y E", EN DONANTES VOLUNTARIOS DE SANGRE DEL HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA ECUATORIANA, 2011-2014, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



GALLEGOS BARRERA CATHERINE ESTEFANÍA, C.I. 1714483334

DEDICATORIA

Dedico este gran logro a Dios por permitirme superar todos los obstáculos que se me han presentado a lo largo de mi carrera universitaria, dándome salud, sabiduría y fortaleza para seguir por el camino adecuado.

A mi familia quien supo confiar en mí, mis padres Leonor y Jorge, ya que por ellos estoy donde estoy, ya que son las personas que han sabido guiarme y apoyarme en todo momento, quienes me han brindado toda la ayuda económica para lograr cumplir este objetivo.

A mi hermano Jorge por ser uno de los motores que me impulsaron a terminar mi carrera de una manera satisfactoria.

A mi novio Alejandro quien ha sido un amigo incondicional que ha sabido apoyarme en todo momento y en cada decisión, quien con su amor me ha mostrado un mundo diferente.

A mi directora de tesis Rosita quien ha sido una gran maestra, la cual confió en mí y me dio la oportunidad de realizar este trabajo.

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme permitido culminar una etapa más de mi vida llena de bendiciones, por permitirme ampliar más mis conocimientos ya que estos serán una base fundamental en el día a día de mi trabajo, y encontrar en el camino a muchas personas, entre ellos a mis maestros quienes me han impartido el conocimiento necesario para poder afrontar los futuros retos que se me presenten en mi vida laboral.

A mis padres inmensas gracias por haberme dado la educación y apoyarme en cada decisión tomada, y sobre todo por darme el ejemplo de lucha, persistencia y responsabilidad.

A mi hermano por soportarme con mucha paciencia en todo momento, por darme su apoyo moral en momentos difíciles y sobre todo por estar conmigo siempre.

A mi novio Alejandro quien ha sido la persona que me enseñó de una manera distinta el ámbito del laboratorio clínico, quien ha sido también uno de mis maestros en la parte práctica de mi carrera y quien día a día estuvo pendiente brindándome apoyo, amor y amistad incondicional sin importar nada. TE AMO.

A mi directora de tesis Master Rosita Chiriboga por brindarme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos en base a su capacidad y saber científico, de igual forma por haberme tenido paciencia y guiarme durante todo el desarrollo de este trabajo, gracias por haber confiado en mí y en mi potencial.

A mis compañeras Daya, Soffy, Cathe, Danny y Jenny por hacer de esta trayectoria una experiencia única, llena de risas, aventuras, locuras. Gracias por su amistad.

Al Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, a sus autoridades Dr. Marco Herdoíza y Dra. Mónica Pesantez por haberme dado la apertura para poder realizar este trabajo, a Emily Guanotuña quien me enseñó el manejo de la base de datos de dicha institución.

RESUMEN

ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE LA FRECUENCIA DEL ANTÍGENO D DÉBIL Y SU RELACIÓN CON LOS ANTÍGENOS ERITROCITARIOS DEL SISTEMA RH "C Y E", EN DONANTES VOLUNTARIOS DE SANGRE DEL HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA ECUATORIANA, 2011-2014.

Introducción: La identificación de individuos portadores del antígeno D débil es indispensable a nivel de los bancos de sangre y laboratorios clínicos que realizan tipificaciones sanguíneas, por la probabilidad que presentan estas personas de ser sensibilizados y producir un aloanticuerpo anti-D. Adicionalmente, al convertirse en donantes voluntarios de sangre deben ser considerados como Rh D (positivos) y al ser receptores como Rh (D) negativos. **Materiales y Métodos:** se trata de un estudio retrospectivo, descriptivo de cuatro años 2011-2014 en el que se realizó un análisis de los registros físicos y digitales de los donantes de sangre eliminándose aquellos registros que presentaron ausencia o incoherencia de uno o más datos requeridos en la investigación. Para los análisis de los datos se aplicó una estadística descriptiva y para la relación de las variables se utilizó el análisis estadístico del chi-cuadrado. **Resultados:** Se estableció una prevalencia de donantes Rh (d) negativos del 2,0% y Rh (D) débil del 2,28%. El análisis de resultados estableció que el fenotipo Rh (D) débil está relacionado mayoritariamente con el fenotipo C-c+E+e+; fenotípicamente se identificó que el tipo (D) débil más común en Ecuador es el 1 y 3 y la existencia de aloinmunización anti-D. **Conclusiones y Recomendaciones:** Del estudio realizado se determina la existencia de individuos aloinmunizados por antígenos del sistema Rh indicativo de que tuvieron contacto previo con sangre incompatible. Por lo que se recomienda el establecimiento de algoritmos de tipificación para pacientes, donantes, mujeres en edad fértil y en estado de gravidez, así como la identificación inequívoca del antígeno D y sus variantes.

ABSTRACT

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THE FREQUENCY OF THE WEAK D ANTIGEN AND ITS RELATION WITH ERITHROCYTE ANTIGENS OF THE RH SYSTEM "C AND E", ON VOLUNTARY BLOOD DONORS AT THE ECUADORIAN RED CROSS BLOOD CENTER, 2011-2014.

Introduction: The identification of individuals carrying the weak D antigen is indispensable at blood banks and clinical laboratories that perform blood typing, because of the probability that these persons can be sensitized and produce an anti-D alloantibody. In addition, once they become voluntary blood donors, they should be considered as Rh D (positive) and as receptors as Rh (D) negative. **Materials and Methods:** It is a descriptive, retrospective study of four years 2011-2014 where the physical and digital records of blood donors were analyzed, leaving aside those records that presented absence or inconsistencies with one or more data required for the investigation. For data analysis, a descriptive statistic analysis was applied, and for the relationship between variables, the chi square test was used. **Results:** A prevalence of Rh (D) negative donors was established of 2,0%, and weak Rh (D) of 2,28%. Data analysis established that weak Rh (D) phenotype is mostly correlated with the C-c+E+e+ phenotype; phenotypically, the weak (D) type most common in Ecuador is identified as the 1 and 3 and the existence of the anti-D alloimmunization. **Conclusions and Recommendations:** Out of this study, it was determined the existence of individuals alloimmunized by antigens of the Rh system, indicating that they have had previous contact with incompatible blood. It is recommended the establishment of classification algorithms for patients, donors, women of childbearing age and pregnant, as well as the unequivocal identification of the D antigen and its variations.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	9
1.1 JUSTIFICACIÓN	9
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.3 OBJETIVOS	13
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
1.3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	13
1.3.3 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO	13
CAPÍTULO II.....	14
2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	14
2.1.1 ANTECEDENTES	14
2.1.2 Sistema Rh y su nomenclatura	15
2.1.3 Tipos de antígenos del Sistema Rh	16
2.1.4 Bases genéticas y estructurales del sistema Rh	17
2.1.5 Características del antígeno D negativo	18
2.1.6 Características del antígeno D débil	18
2.1.7 Tipos de Antígeno D débil.....	19
2.1.8 Expresión del antígeno D débil y su relación con los antígenos C y E	20
2.1.9 Antígeno D débil y su respuesta inmune.....	21
2.1.10 Método de detección de antígenos y aloanticuerpos del sistema Rh	22
2.1.11 Anticuerpos del sistema Rh	27
2.1.12 Enfermedad Hemolítica del Feto y del Recién Nacido asociada al antígeno D Débil.....	27
2.1.13 MARCO CONCEPTUAL.....	28
CAPÍTULO III.....	30
3.1 MARCO METODOLÓGICO	30
3.1.1 Tipo de Estudio:	30

3.1.2	Muestreo, tamaño muestral y selección de unidad de muestra:.....	30
b)	Tamaño de Muestra:.....	30
3.1.3	Análisis Estadístico:.....	31
3.2	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	31
3.2.1	Variable dependiente:.....	31
3.2.2	Variable independiente:	31
3.3	PROCEDIMIENTO	33
CAPÍTULO IV		35
4.1	RESULTADOS	35
5	DISCUSIÓN	46
6	CONCLUSIONES	50
7	RECOMENDACIONES	51
8	BIBLIOGRAFÍA	52
9	ANEXO	59

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1 Uso de la nomenclatura para el Sistema Rh	16
Tabla N°4.1 Prevalencia de donantes de sangre tipificados como Rh D negativo.....	37
Tabla N°4.2 Prevalencia de donantes de sangre tipificados como Rh D débil	37
Tabla N°4.3 Pruebas de chi-cuadrado: Género vs Variantes del antígeno D	38
Tabla N°4.4 Distribución de donantes de sangre Rh D negativo de acuerdo a la procedencia	39
Tabla N°4.5 Distribución de donantes de sangre Rh D débil de acuerdo a la procedencia	40
Tabla N°4.6 Pruebas de chi-cuadrado: Presencia D débil vs antígenos C/E.....	42
Tabla N°4.7 Tipos de antígenos D débil de acuerdo a la clasificación serológica de los fenotipos del sistema Rh.....	44
Tabla N°4.8 Presencia de aloinmunización en donantes tipificados como RhD negativos y D débil	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N°1 Modelo de las proteínas Rh en la membrana del eritrocito	17
Gráfico N°2: Depleción del gen RHD	18
Gráfico N°3: Características de la presencia del antígeno D.....	19
Gráfico N°4.1 Total de donantes de sangre por año de captación	35
Gráfico N°4.2 Total de donantes de sangre tipificados como Rh D negativos de acuerdo al género	36
Gráfico N°4.3 Distribución porcentual del antígeno D negativo de acuerdo al género.....	38
Gráfico N°4.4 Distribución porcentual del antígeno D débil de acuerdo al género.....	38
Gráfico N°4.5 Distribución porcentual del antígeno D negativo de acuerdo al grupo etario	41
Gráfico N°4.6 Distribución porcentual del antígeno D débil de acuerdo al grupo etario....	41
Gráfico N°4.7 Frecuencia del fenotipo Rh D-CDE con el antígeno D débil.....	42
Gráfico N°4.8 Frecuencia de los antígenos CE/ce con el antígeno D débil	43
Gráfico N°4.9 Porcentaje de aloinmunización por los antígenos del sistema RH-CDE.....	45

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Base de datos electrónica.....	59
Anexo 2: Documentos Físicos	60
Anexo 3: Base de datos electrónica e-Delphyn del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana y hoja electrónica creada para la recolección de datos.	61

LISTA DE SIGLAS

AABB: Asociación Americana de bancos de sangre

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANTI: anticuerpos

DAR: Receptor de membrana

EHRN: Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido

IgG: Inmunoglobulina de la clase G

IgM: Inmunoglobulina de la clase M

OPS: Organización Panamericana de la Salud

LISS: Solución de baja fuerza iónica

RH: Rhesus

RHCE: gen que determina a los antígenos CE

RHD: gen del sistema Rh que determina al antígeno D

INTRODUCCIÓN

En los Bancos de Sangre, Hemocentros y Servicios de Medicina Transfusional se realizan tipificaciones relacionadas con el factor Rh, sin embargo en la mayoría de estos establecimientos no se realiza la detección de variantes del antígeno D debido a muchas causas, uno de ellas es la falta de estandarización de algoritmos que faciliten la identificación de antígenos D débil.

La falta de esta identificación trae como consecuencia la sensibilización y aloinmunización por el antígeno D. Estudios han demostrado que el uso de profilaxis en mujeres embarazadas se ha convertido en una práctica con debilidades por la presencia de otras variantes de este antígeno, como el D parcial y D débil, por lo que actualmente ya no es una garantía para evitar una enfermedad hemolítica del feto o del recién nacido (Kacker y otros, 2015), adicionalmente existe una importante aloinmunización de antígenos C y E. Estos datos demuestran la necesidad de establecer la prevalencia de las variantes del antígeno D en nuestra población para establecer el stock de hemoderivados requeridos en los bancos de sangre.

Es reconocido que en el campo de la medicina transfusional la correcta determinación de los fenotipos del sistema Rh es de vital importancia para los receptores de hemoderivados y mujeres en edad fértil, esta acción permite evitar inmunizaciones que acarrear graves consecuencias (Ouchari y otros, 2013). Considerando que el antígeno D es el de mayor relevancia clínica en transfusiones y acciones obstétricas es el que debe ser identificado de manera inequívoca, los estudios moleculares han permitido identificar una docena de variantes alélicas en el gen RHD las cuales pertenecen a características de cada población, grupo étnico, así en la población caucásica se ha reportado que 0,2 - 1,0% de individuos exhiben el antígeno D débil (Xhetani y otros, 2014)

Uno de los objetivos de esta investigación fue establecer la prevalencia de donantes que presentan un antígeno D débil, determinándose una prevalencia del 2%, distribuido tanto en el género femenino como masculino, así como también se encuentra en 17 provincias ecuatorianas, dato de gran importancia para las acciones de cambio que pueden efectuarse en los bancos de sangre, Hemocentros, y servicios de medicina transfusional de estas localidades.

Otro aspecto estudiado fue la relación existente entre el antígeno D y la expresión en el fenotipo de los antígenos C, c, E y e; autores como Buelvas y otros mencionan que la presencia del antígeno C está asociada con la expresión débil del antígeno D y forma el D débil 1 y 3; mientras que el antígeno E está directamente asociado con el antígeno D débil de tipo 2, esta relación puede ser utilizada para alertar la presencia del grupo sanguíneo D débil (Geoff, 2013). En la población de donantes estudiada de acuerdo al fenotipo, se encontró que el tipo D débil más común es el 2 con un 40%, mientras que el tipo 1 y 3 tuvo una frecuencia del 37,3%. Un hallazgo importante fue la existencia de doble inmunización por antígenos del sistema Rh en donantes tipificados como Rh (d) negativos, es decir que estas personas tuvieron contacto con eritrocitos de fenotipo diferente al suyo, este aspecto es importante porque proporciona indicios de que no se está realizando una identificación correcta del antígeno D antes de una transfusión o durante un embarazo.

En el estudio realizado por Benalcázar y Chiriboga en el 2012 se menciona que la correcta tipificación del factor Rh es uno de los principales procesos que se debe llevar a cabo en los laboratorios y bancos de sangre por las consecuencias que pueden ocurrir, así para determinar si una persona es Rh (D) positiva o negativa depende de la presencia o ausencia del antígeno D y del reactivo utilizado y el algoritmo establecido (Benalcázar & Chiriboga, 2013). Dentro de las recomendaciones establecidas en este estudio se encuentra la elección de un algoritmo de detección tanto en donantes, pacientes y mujeres embarazadas o en edad fértil.

Muñiz y Gargiulo recomiendan que la determinación del factor Rh en donantes y recién nacidos debe ser realizados con un reactivo policlonal IgG o IgM salino o IgG químicamente modificado (Muñiz & Gargiulo, 2009) para pacientes y mujeres en estado de gravidez se requiere el uso de reactivos monoclonales que reaccionen con antígeno D débil de tal manera que no pase desapercibido y sea reconocido como Rh (d) negativo, de ser necesario se deberá utilizar dos casas comerciales para la determinación.

Es importante en la medicina transfusional el manejo de las discrepancias en una tipificación del antígeno D especialmente por el uso de varios reactivos de variada sensibilidad y especificidad; es absolutamente necesario evitar que se sigan produciendo aloinmunizaciones innecesarias en donantes de sangre, es por esto que este estudio aporta una invaluable información para tomar acciones en la técnica y algoritmo elegido para proporcionar sangre compatible a quien requiere de sangre como una medida terapéutica.

CAPÍTULO I

1.1 JUSTIFICACIÓN

El sistema Rh es uno de los sistemas sanguíneos con gran importancia clínica por su alto polimorfismo compuesto por más de 50 antígenos, de los cuales 5 tienen importancia clínica, entre ellos el antígeno D, reconocido por ser el principal causante de las reacciones postransfusionales graves, enfermedad hemolítica del recién nacido y anemia hemolítica autoinmune. (Kappler y otros, 2014).

El antígeno D presenta dos variantes: el D parcial y el D débil o anteriormente conocido como Du, esta variante se caracteriza por presentar un número reducido de antígenos en la membrana del eritrocito, esto puede deberse a una mutación puntual de los alelos RHD/RHCE o a una supresión de su expresión fenotípica ocasionada por los haplotipos C en posición trans, heredada junto con el fenotipo Rh D. (Pham y otros, 2013)

Por esta razón la determinación de las variantes del sistema Rh, tienen la finalidad de prevenir una incompatibilidad transfusional, permitiendo una mejor elección de los concentrados eritrocitarios, evitando así una aloinmunización (Al-Joudi y otros, 2011); se ha determinado que la primera exposición a antígenos eritrocitarios incompatibles genera la inmunización del paciente con la consiguiente producción de aloanticuerpos, dando lugar al fenómeno denominado evanescencia, es decir la desaparición de estos anticuerpos mientras no exista otra estimulación. Sin embargo esta sensibilización permanecerá en la memoria inmunológica del paciente, por lo tanto al recibir nuevamente una transfusión sanguínea incompatible causará una respuesta inmediata provocando una reacción hemolítica aguda o tardía.(Al-Joudi y otros, 2011) .

Por esta razón, es necesario establecer la frecuencia de las variantes del antígeno D, especialmente en los centros de producción de hemoderivados como el Hemocentro de Cruz Roja Ecuatoriana; esto permitirá alertar a todo el Sistema Nacional de Bancos de Sangre sobre si se ha mantenido o aumentado la proporción de fenotipos D, especialmente del antígeno D débil durante los años 2011-2014, esto facilitará establecer un stock de productos para las personas con fenotipo D débil, además se podrá determinar si la presencia del antígeno D débil se encuentra relacionando con la expresión de los antígenos C y/o E; ya que la presencia de estos dos antígenos suprimen fenotípicamente la expresión del Rh D, teniendo como consecuencia una clasificación errónea mediante la tipificación de donantes y receptores, lo que aumentaría los casos de

aloimmunización. Con estos datos se corroborará la importancia de la tipificación de los fenotipos del Rh, aspecto que no es considerado en laboratorios privados del país.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La aloinmunización es uno de los problemas más frecuentes durante la transfusión sanguínea, siendo un factor de riesgo en pacientes que requieren recibir sangre como parte de su terapia. (Branch, 2012)

En el caso de personas que presentan un fenotipo Rh D débil la probabilidad de que ocurra una reacción transfusional es alta, ocasionando una anemia hemolítica. En mujeres embarazadas con fenotipo D débil y fetos Rh D positivos existe una alta probabilidad de que con su primer embarazo se genere una sensibilización, de tal manera que en un segundo embarazo ocurra una respuesta inmune agresiva que pueda provocar un aborto o desarrollar una Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido, esto se debe a que los eritrocitos de la madre al no tener todos los antígenos en su membrana por ser Rh D débil reconoce como extraño a los eritrocitos del feto que es Rh D positivo y posee todos los antígenos de membrana, lo que genera anticuerpos que son capaces de atravesar placenta y lo que provoca la destrucción de los hematíes del feto. (Orlando y otros, 2015).

Dentro de los aloanticuerpos considerados de relevancia clínica están los del sistema Rh, (Muñis Díaz, 2013), uno de ellos es la variante D débil cuya característica es presentar un número reducido de antígenos D, son cualitativamente normales pero presentan mutaciones intracelulares o transmembranales de haplotipo Rh D, por lo que presenta una alteración cuantitativa. (Wang y otros, 2010) (Pham y otros, 2013).

Esta variante es importante a nivel de Bancos de Sangre, debido a que un individuo que presente un fenotipo Rh D débil, debe ser considerado como Rh D positivo al ser donante de sangre, mientras que al convertirse en receptor debe ser considerado como Rh D negativo y de esta manera evitar problemas hemolíticos posteriores y/o aloinmunización. (Buelvas, Muñiz-Díaz y León, 2014)

Estudios han determinado que la prevalencia del fenotipo D débil es del 0,2 al 1% en personas caucásicas; esta prevalencia varía según la raza y el mestizaje generado por las migraciones. (Orlando y otros, 2015) (Sandler y otros, 2014)

En Ecuador no se ha determinado la prevalencia de personas portadoras del fenotipo D débil ni su variación a lo largo del tiempo, aspecto importante para que un Hemocentro defina las necesidades transfusionales de la población y las previsiones necesarias que le permitan evitar aloinmunizaciones innecesarias. Otro aspecto a considerar es la

relación que existe entre el antígeno D débil y los antígeno C y E, pues la presencia de estos fenotipos minimiza o enmascara la expresión fenotípica del antígeno D, por lo que no es detectado por la prueba convencional del anti-D, y son tipificados erróneamente como Rh D negativos (Orlando y otros, 2015). Todo esto se debe a la falta de información respecto a la frecuencia de las diferentes variantes del antígeno D, y su relación con los antígenos C y E.

Pregunta del Problema ¿Cuál es la frecuencia del antígeno D débil y su relación con la presencia de los antígenos C y E en donantes voluntarios de sangre que acuden al Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en Quito?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia del antígeno D débil y su relación con los antígenos eritrocitarios del sistema Rh “C y E”, en donantes voluntarios de sangre del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana durante los años 2011-2014.

1.3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Establecer la frecuencia del antígeno Rh D negativo en donantes de sangre del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana durante los años 2011-2014.
- Determinar la prevalencia del antígeno D débil en donantes de sangre que acuden al Hemocentro de Cruz Roja durante los años 2011-2014
- Relacionar la presencia del antígeno D negativo y D débil con la edad, género, y procedencia de los donantes de sangre del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana que acudieron durante el período 2011-2014.
- Relacionar la presencia del antígeno D débil con la expresión fenotípica de los antígenos C y E en donantes de sangre del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana que acudieron durante el período 2011-2014.
- Determinar los posibles tipos del antígeno D débil de acuerdo a los fenotipos CDE/cde en los donantes de sangre del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana que acudieron durante el período 2011-2014
- Determinar la existencia de aloanticuerpos en donantes del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana tipificados como D débil durante el período 2011-2014.

1.3.3 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Una de las principales limitaciones del estudio constituye el no encontrar los datos relevantes del donante requeridos en la investigación, así como no encontrar datos de donantes tipificados como Rh D débil.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1.1 ANTECEDENTES

La identificación de individuos portadores de variantes del antígeno D es una de las obligaciones que asumen los Bancos de sangre y Hemocentro del país, o un laboratorio privado dedicado a realizar tipificaciones sanguíneas; el uso de reactivos adecuados y algoritmos establecidos permite realizar una tipificación correcta de donantes y/o pacientes portadores del antígeno D débil (AABB, 2012) (Benalcázar y Chiriboga, 2013)

Así un paciente identificado como D débil o parcial, va a presentar una mayor probabilidad de generar un anti-D, esto debido a que este antígeno posee una alteración, por lo que su identificación previa es crucial para evitar una aloinmunización con graves consecuencias, una de estas constituye reacciones postransfusionales graves que pueden ocasionar hasta la muerte del receptor. (De Oliveira Cruz y otros, 2011) (Pham, Roussel y otros, 2013)

Wang en el año 2010, reportó discrepancias en la determinación de las variantes de D. En este estudio se encontró 11 casos discrepantes, confirmándose 10 de estos como Rh D débil, obteniendo una prevalencia del 2,2%. Este estudio llegó a la conclusión que la detección del factor Rh no es sencillo, por lo que se requiere un estudio de la prevalencia y su relación con antígenos C y E. (Wang y otros, 2010). En Albania determinaron la prevalencia de las variantes de D, en donde encontraron que el 10,86% y alrededor del 0,14% presentaba un Rh D negativo confirmado y un Rh D débil, respectivamente. (Xhetani y otros, 2014) Mediante este estudio se determinó que esta población presenta una prevalencia baja de pacientes Rh D negativo y Rh D débil, esto permitió poner en alerta al sistema de sangre para prever sus reservas de sangre en caso de emergencia. Mientras que un estudio realizado en el año 2014, encontró que la frecuencia del antígeno D débil en la población es del 3,2%, y que el 16,1% de estas muestras tenían una reacción positiva para en antígeno C y/o E, presentando una incidencia de 2,7 – 3% de pacientes tipificados Rh D negativo con gen D positivo. (Orlando y otros, 2015)

Por otro lado Hussein en el 2013 indicó que 33 de 52 pacientes con talasemia, es decir el 63,5% generaron aloinmunización al ser transfundidos con sangre Rh D negativo sin confirmar, presentándose una prevalencia del 0,2 al 5,23% de variantes de D, en

muestras tipificadas como Rh D negativas. Por tal motivo el estudio de la prevalencia en poblaciones mixtas por migraciones y mestizaje es importante. (Hussein & Teruya, 2013)

De acuerdo a la serología obtenida en el estudio Pham y otros en el 2013, de los 748 individuos el 61,3% presentaba una variante de D de los cuales el 5,1% de pacientes tenían el antígeno D débil. (Pham y otros, 2013). El estudio realizado en una población indígena, identificó 60 muestras con discrepancias en la tipificación, de los cuales el 93,3% de estos presentaron variantes del antígeno D, el 12% presentó el antígeno D débil y el 97% del total de muestras discrepantes presentaron el antígeno C, de acuerdo a investigaciones se le ha identificado como antígeno cuya expresión fenotípica bloquea la del antígeno D. (Kulkarni y otros, 2013)

Mientras que en un estudio realizado en Brasil en el 2011 por el mestizaje que presenta su población se encontró 116 muestras con una prevalencia del 54,2% del antígeno D débil, del cual 79 muestras presentaron el antígeno C, y 75 muestras presentaron el antígeno E y solo 12 muestras presentaron el fenotipo Dce. En este estudio también mencionan que hubo discrepancias al clasificar erróneamente como D parcial a muestras que eran D débil, esto se debe a la capacidad de reacción de las variantes de D y su interacción con los antígenos C y/o E. (Credidio y otros, 2011)

En el estudio realizado en Túnez en el año 2013 se encontró que de 223 pacientes tipificados como Rh D negativo el 1,8% de estos presentaron un antígeno D débil por presencia del antígeno C mientras que el 97,755% presentó una supresión del antígeno D. En el estudio se relacionó que el antígeno D débil de tipo 4 se muestra con mayor frecuencia cuando el antígeno C está presente. Por tanto se llegó a la conclusión que los pacientes tipificados como Rh D negativos fueron tipificados erróneamente obteniendo falsos positivos debido a la supresión del antígeno D por la presencia del antígeno C en posición trans. (Ouchari y otros, 2013)

2.1.2 Sistema Rh y su nomenclatura

El sistema Rh fue identificado por Levine y Stetson en 1939, actualmente se conoce como un sistema de importancia clínica por su gran complejidad al poseer más de 50 antígenos en la membrana del eritrocito, dentro de estos antígenos se encuentran el D, C y E siendo estos altamente inmunogénicos; debido a que los aloanticuerpos estimulados por estos antígenos son responsables de más del 99% de reacciones postransfusional (AABB, 2012). A lo largo de los años se han utilizado varias nomenclaturas pero las más usadas son la de Fisher cuando se utiliza la escritura ordinaria y la de Weiner en el

lenguaje oral, en el cual los haplotipos son identificados con las letras R y r, en donde la R se usa para aquellos que producen antígenos D y la r para los que no lo producen. En esta nomenclatura se coloca subíndices y superíndices para distinguir las diferentes combinaciones con los antígenos C, c, E, e. Tabla N°1

Tabla N°1 Uso de la nomenclatura para el Sistema Rh

Nomenclatura de Fisher	Nomenclatura de Weiner
D	Rh ₀
C	Rh ₁
E	Rh ₂
c	rh'
e	rh''
Ce	Rh1/rh''
CE	Rhz

Autor: Muñiz Díaz

Fuente: Manual de Medicina transfusional, módulo 3.

2.1.3 Tipos de antígenos del Sistema Rh

Los antígenos del sistema Rh son codificados en el cromosoma 1 por los genes RHD y RHCE, los que presentan una igualdad del 97% y una alta cercanía; por lo que las variantes del antígeno D probablemente son debidas a una supresión o mutación en dichos genes. De acuerdo a los patrones de herencia denominados “ligamiento total” se hereda como una unidad o haplotipo los genes RHD y RHCE, sin embargo existen circunstancias en la que estos genes codifican y producen proteínas diferentes, esto ocurre debido al “efecto de posición”, este efecto cambia la expresión de un antígeno, si el alelo está en posición “cis”=atracción, o cuando los alelos se localizan en diferentes cromosomas o posición “trans” repulsión. (Buelvas, Muñiz-Díaz y León, 2014)

La presencia del fenotipo D débil puede deberse a herencia o a la atenuación del antígeno D por la presencia del antígeno C o E en posición trans con respecto al D. (Moussa y otros, 2014) (AABB, 2012). En contraste, cuando se hereda el haplotipo dce o dcE en posición “cis” la expresión D es normal.

2.1.4 Bases genéticas y estructurales del sistema Rh

En el cromosoma 1 existen dos genes homólogos del brazo corto (1p34.3-1p36.1) que codifican a los polipéptidos no glicosilados encargados de la expresión de los antígenos del Rh, el primero es el gen RHD el cual determina la presencia de la proteína de membrana que expresa el antígeno D en los glóbulos rojos y el segundo es el gen RHCE el cual determina la presencia de los antígenos C, c, E y e. (Flegel, 2011) Los productos de los genes RHD y RHCE son proteínas de 417 aminoácidos, los cuales atraviesan la membrana del eritrocito 12 veces y solo exhiben en el exterior una vuelta (loop) corta de ramas de aminoácidos. Los polipéptidos son ácidos grasos, los cuales no poseen carbohidratos a diferencia de la mayoría de proteínas de los grupos sanguíneos. (Flegel, 2011) Grafico N° 1

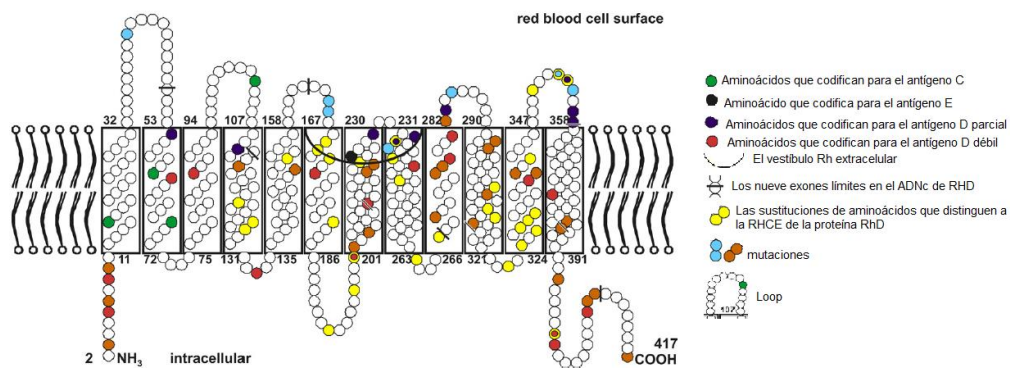


Gráfico N°1 Modelo de las proteínas Rh en la membrana del eritrocito

Autor: Flegel

Fuente: Molecular genetics and clinical applications for RH

El polipéptido D posee 32 y 35 aminoácidos, los cuales son reconocidos como extraños en personas Rh D negativo. Los antígenos C y c difieren en solo cuatro aminoácidos en las posiciones 16, 60, 68, 103 de los cuales puede variar en la serina o prolina, mientras que la presencia de alanina o prolina en la posición 226 es la única característica que distingue la presencia de los antígenos E de los e. (Flegel, 2011)

Por otro lado la expresión del antígeno D débil se debe a una mutación en sentido erróneo en el gen RHD, por sustituciones de aminoácidos de tipo D débil que se encuentran en los segmentos de las proteínas intracelulares y transmembranales y agrupados en cuatro regiones de la proteína Rh. (Flegel, 2011).

2.1.5 Características del antígeno D negativo

El haplotipo negativo D se debe a una deleción homocigota del gen 10 RHD y con la presencia de la caja Rhesus híbrida (Gráfico N° 2.), aunque algunas personas poseen un alelo RHD no funcional debido a una duplicación de 37 pares de bases en el intrón 3-exón 4 límite, lo que provoca un desplazamiento del marco y la terminación prematura del codón, o a una mutación sin sentido en el exón 6. (Flegel, 2011)

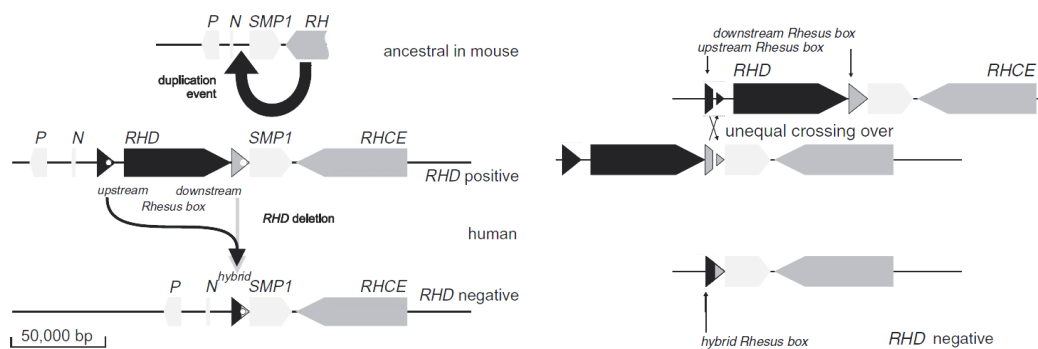


Gráfico N°2: Depleción del gen RHD

Autor: Flegel

Fuente: *Molecular genetics and clinical applications for RH*

Las personas con fenotipo Rh D negativo no presentan anticuerpos naturales contra el antígeno D, por lo que al exponerse por primera vez a células Rh D positivo ya sea por una transfusión sanguínea o por dar a luz a un bebé Rh D positivo, desarrollan anticuerpos anti-D, los cuales no presentan efectos adversos en el primer contacto. Cuando una persona Rh D negativo vuelve a exponerse a células Rh D positivo, la persona presenta respuestas inmunes que pueden causar hemólisis severas y puede llegar a darse un aborto. (Kim y otros, 2015).

2.1.6 Características del antígeno D débil

Estudios moleculares del antígeno D débil han permitido determinar su gran heterogeneidad y con ello una amplia variedad de fenotipos D de expresión débil. (Buelvas, Muñoz-Díaz y León, 2014) La presencia de estos fenotipos ha ocasionado una imposibilidad de establecer un protocolo de detección serológica en los Bancos de Sangre que facilite la identificación de todas las variedades de este antígeno.

Hasta la actualidad se han identificado 70 alelos distintos del antígeno D, siendo el D débil 1, el más frecuente y el DEL conocido anteriormente como “Del” debido a la extrema debilidad del antígeno D, es poco frecuente en poblaciones latinas, sin embargo en las poblaciones asiáticas su frecuencia es del 30%. (Buelvas, Muñiz-Díaz y León, 2014) Para la nomenclatura de los fenotipos D débil se utilizaron números arábigos, así los denominados “fenotipos 1 a 4” representan el 94% de todos los identificados en la población europea; sin embargo estos tipos se dividen también en subtipos así el 4,2 conocido como DAR es común en la raza negra africana (Muñis Díaz, 2010)

El aporte de estudios moleculares también han permitido determinar que entre los antígenos D débil y D parcial existe más similitudes que diferencias; por muchos años se ha mantenido la creencia que únicamente los D parciales estimulaban una aloinmunización, publicaciones actuales relacionan casos de individuos con fenotipos D débil como portadores de anti-D. También se ha confirmado que tanto los D parciales como D débil son el resultados de mutaciones puntuales y no solo de recombinaciones, la diferencia radica en si son cualitativas o cuantitativas (Muñis Díaz, 2010) Gráfico N° 3.

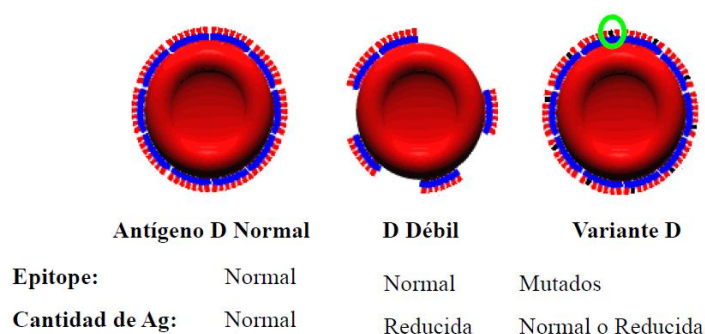


Gráfico N°3: Características de la presencia del antígeno D

Autor: Luciana Lameira

Fuente: Reunión de expertos en Inmunohematología

2.1.7 Tipos de Antígeno D débil

Una de las estrategias utilizadas en los laboratorios que realizan tipificaciones sanguíneas es la fenotipificación del sistema Rh, es decir determinar la presencia de antígenos C, E, c y e, conjuntamente con el uso de reactivos monoclonales (Muñis Díaz, 2010)

Esta determinación puede predecir la presencia de antígenos D débil o D parciales. Así: los D débil de tipo 1 y 3 se asocian al fenotipo CDe (r1); el cDE (R2) lo asocian con el fenotipo D débil 2 y 5. Y por último el fenotipo cDe (Ro) con el tipo 4.1 y 4.2 conocido como (DAR). Esta tipificación serológica es una ayuda para orientar la clasificación de un antígeno D débil, sin embargo el siguiente paso es la confirmación alélica mediante metodología molecular. (Muñis Díaz, 2010).

2.1.8 Expresión del antígeno D débil y su relación con los antígenos C y E

El antígeno D es reconocido como el más inmunógeno, seguido por los c y E, por lo que en la actualidad en algunos países se ha incluido la detección de todos los antígenos del sistema Rh (D, C, c, E y e), con el único propósito de obtener sangre totalmente compatible (Buelvas, Muñiz-Díaz y León, 2014)

La fenotipificación del sistema Rh permitió establecer la diferencia existente entre poblaciones y grupos étnicos, así por ejemplo en la población europea se identificó el fenotipo DCe/ce, mientras que en las africanas es el DCE/ce, en Ecuador también se estableció que el fenotipo más común es DCe/ce, seguido del CDE/ce. (Sojo & Chiriboga, 2013) La determinación de los antígenos C y E tiene importancia en la presencia del antígeno D débil, pues se ha identificado que la expresión del antígeno D es menor en presencia de C; esto se determinó al utilizar Citometría de flujo donde se concluyó que la expresión de este antígeno decrece ante la expresión de C, c, E y e; de la siguiente manera: R2R2 (DcE/DcE) > R1R2 (DCe/DcE) > R1R1(DCe/DCe) > R2r(DcE/ce) > R1r(DCe/ce). (Muñis Díaz, 2010)

Los antígenos D débiles se caracterizan por una débil reacción con los reactivos monoclonales por lo que deben ser llevados a la prueba de Coombs para potenciar la reacción y de esa manera clasificarlo como D positivo. Los alelos D débil tipo 1 y 3 están asociados a la expresión del antígeno C, en cambio el alelo débil tipo 2 está asociado a la expresión del antígeno E. (AABB, 2012) También se ha encontrado fenotipos D débil en presencia de un alelo RH normal, es decir sin ninguna mutación, esto se debe a un efecto de posición del Ce, en individuos con fenotipo R0r' (ce/Ce); R2r' (cE/Ce) y R1r' (Ce/Ce). Por lo tanto, es importante que los Bancos de Sangre identifiquen a los antígenos C, c, E y e tanto en individuos con fenotipo Rh D negativo y positivo. (Geoff, 2013)

Geoff en el 2013 menciona que se ha identificado el fenotipo DEL, el que es erróneamente considerado como negativo al ser tipificado por metodologías rutinarias debido a la expresión mínima del antígeno en la superficie del eritrocito, este fenómeno está relacionado con la expresión concomitante del antígeno C y E, es decir suele ser detectado en personas tipificadas como r'r (Ce/ce) o r'r' (cE/ce); este fenotipo es frecuente en poblaciones asiáticas, siendo raro en las poblaciones caucásicas. (Geoff, 2013).

2.1.9 Antígeno D débil y su respuesta inmune

La aloinmunización causada por anti-D se debe a que este antígeno presenta una alta inmunogenicidad por la presencia de 10.000 a 30.000 sitios D por cada hematíe, mientras que los pacientes que poseen un antígeno D débil poseen menos de mil hasta 30 sitios D por cada hematíe. Es por tal motivo que un paciente Rh D negativo que sea transfundido con sangre D débil puede generar un anti-D y por consiguiente una reacción transfusional. (Körmöczi & Mayr, 2014)

El antígeno D débil es de tipo IgG y de naturaleza caliente por lo que las reacciones transfusionales ocurren a la temperatura corporal, estas pueden ocurrir ya sea en el momento de la transfusión o después de recibir un concentrado eritrocitario es por esto que se dividen en inmediatas o tardías. (Körmöczi & Mayr, 2014) Los signos y síntomas que puede presentar un paciente no son específicos depende de la respuesta inmune que se genere, presentando diferentes reacciones como fiebre, sudoración, vómitos, ictericia, dolor lumbar, prurito, rubor, cianosis, taquicardia, taquipnea, diátesis hemorrágica e incluso situaciones de shock. (Bravo Lindoro, 2014).

2.1.9.1 Hipersensibilidad tipo II causada por el antígeno D débil.

Cuando antígenos extraños ingresan al torrente sanguíneo y reaccionan con los antígenos de los glóbulos rojos propios del paciente se producen anticuerpos como consecuencia de una respuesta inmune provocando daño celular y generando la liberación de enzimas líticas como proteasas y radicales libres (AABB, 2014).

El complejo antígeno-anticuerpo formado activa el complemento el cual está mediado por los linfocitos NK y la liberación de sustancias vasodilatadoras como la histamina, con la activación del complemento se generan depósitos de las fracciones C3b y C3bi en la membrana celular y las células fagocíticas que poseen receptores para los fragmentos,

favoreciendo así la unión a la célula diana y su posterior lisis.(Abbas, Lichtman y Pillai, 2014)

Las principales causas de este tipo de hipersensibilidad son las reacciones postransfusionales o la eritroblastosis fetal causados por los sistemas sanguíneos en especial del sistema Rh (Abbas, Lichtman y Pillai, 2014).

Los eritrocitos comienzan a ser destruidos en grandes cantidades por macrófagos seguidamente se activan los linfocitos B con producción de anticuerpos, esto provoca una destrucción masiva de glóbulos rojos tanto extraños como propios, provocando que la hemoglobina sea liberada en el torrente sanguíneo, la ictericia aparece cuando existe una hemolisis entre 300-500 ml de sangre dentro de las 24 horas, aumentando la bilirrubina no conjugada, lo que provoca un descenso de esta en el plasma, mientras que la hemoglobina restante es eliminado por los riñones generando un daño tubular. (AABB, 2012)

2.1.10 Método de detección de antígenos y aloanticuerpos del sistema Rh

En la actualidad las muestras de donantes que llegan a los Bancos de Sangre son tipificadas con reactivos IgG o IgM salino o IgG químicamente modificado, mientras que las muestras provenientes de los pacientes que necesitan una transfusión sanguínea son tipificadas con reactivos anti-D monoclonales que permitan una detección de primera instancia y no en fase antiglobulínica. (Benalcázar & Chiriboga, 2013)

Las muestras ya sea de pacientes o de donantes que presentan aglutinación frente al reactivo utilizado en el Banco de Sangre son consideradas como Rh D positivo mientras que, las muestras de pacientes o donantes en la cual no presentan aglutinación frente al reactivo utilizado son tipificadas como Rh D negativo. (AABB, 2012)

Posterior a esto las muestras tipificadas en primera instancia como Rh D negativo se les realizan la prueba de antiglobulina huma (AHG) y de acuerdo a los resultados obtenidos es decir si aglutina o no, son clasificadas como Rh D débil o Rh D negativo respectivamente. (Makroo y otros, 2010). A pesar de esta clasificación y para evitar posibles aloinmunizaciones pacientes que sean Rh D débil son considerados como Rh D negativos; mientras que los donantes que posean este tipo de variante son considerados como Rh D positivos, para evitar aloinmunización y reacciones postransfusionales (AABB, 2012)

Sin embargo en estudios realizados se ha determinado que existen varios tipos de antígeno D débil, los cuales reaccionan de manera diferente con los reactivos utilizados; por lo que se puede observar discrepancias en las determinaciones serológicas, siendo este el motivo por lo que estas técnicas no son lo suficientemente útiles al momento de identificar este tipo de antígenos. (Wang, Lane y Quillen, 2010). La recomendación dada por la AABB menciona que la técnica para la clasificación correcta de pacientes Rh D débil es por la técnica molecular. (AABB, 2012) Actualmente en el país la técnica molecular sigue siendo inalcanzable para los Bancos de Sangre por lo que se recomienda que la tipificación de aquellos pacientes Rh D débil sea realizada por lo menos con dos reactivos diferentes, para evitar así una respuesta inmune en aquellos pacientes que necesitan terapia transfusional. (AABB, 2012) (Kabiri y otros, 2014).

2.1.10.1 Aglutinación en tubo, reacción antígeno-anticuerpo *in vitro*

La determinación del antígeno D, C, c, E, e se basa en la presencia o ausencia del antígeno en la membrana del eritrocito, evidenciada por una reacción de aglutinación, por lo que para su identificación se utilizan reactivos anti-D, anti-C, anti-c, anti-E y anti-e. (AABB, 2012) (Arbeláez García, 2009)

La aglutinación se trata de la fijación de los anticuerpos a los antígenos presentes en la membrana del eritrocito, cuando estos están fijados forman un red que permite la unión de las células, evidenciando la reacción. (AABB, 2012) (Arbeláez García, 2009)

Pero este tipo de determinaciones va a depender de varios factores, entre estos se encuentra la fuerza iónica en el cual en una reacción *in vitro* los eritrocitos permanecen distantes entre sí, por la carga eléctrica negativa que posee su membrana, la fuerza que permite que los eritrocitos permanezcan separados se conoce como potencial zeta; esta distancia es mínima pero evita que moléculas pequeñas de IgG se adhieran a las células y que se produzca la aglutinación, lo que no ocurre con las moléculas de IgM que al ser más grandes pueden unir los eritrocitos, provocando la aglutinación. Para reducir el potencial zeta y aumentar la velocidad de reacción se utiliza una solución de baja fuerza iónica (LISS). (AABB, 2012) (Arbeláez García, 2009)

Otro factor es la temperatura ya que podemos observar anticuerpos fríos generalmente de tipo IgM que reaccionan a temperaturas entre los 4 – 25 °C; por otro lado podemos observar anticuerpos calientes generalmente de tipo IgG que reaccionan óptimamente a temperatura de 37 °C, por lo que la incubación es otro factor determinante ya que en

tiempos cortos no se unan adecuadamente los anticuerpos, mientras que en tiempos prolongados se podría disociar la unión antígeno-anticuerpo. (AABB, 2012) (Arbeláez García, 2009)

El pH también influye en las reacciones de aglutinación ya que el pH óptimo para las reacciones es de 6,5 a 7,5, si tenemos pH muy alcalinos o muy básicos estas reacciones se inhiben. La cantidad de anticuerpos y antígenos es de gran importancia, ya que si tenemos mayor cantidad de anticuerpos la reacción es más fuerte, así como una cantidad excesiva de antígenos podría enmascarar la presencia de anticuerpos débiles, por lo que se recomienda que la suspensión de glóbulos rojos sea entre en 2 – 5%. (AABB, 2012) (Arbeláez García, 2009)

La centrifugación, lectura e interpretación son los factores con mayor importancia ya que se debe dar un resultado preciso; para lavar células se debe colocar 15 minutos en la centrifuga y si se va a leer el resultado solo debemos colocar 15 segundos, posterior a esto se debe observar el botón de glóbulos rojos en el fondo del tubo, mover suavemente el tubo con la finalidad de desprender el botón y ver si aglutino o no. (AABB, 2012) (Arbeláez García, 2009).

2.1.10.2 Microaglutinación o técnica en gel

El fundamento de la técnica en gel es la exclusión de los elementos sanguíneos en una matriz inmunológica inerte, en el período de centrifugación los glóbulos rojos que no son sensibilizados forman un sedimento o botón en el fondo del microtubo, mientras que los glóbulos rojos sensibilizados se distribuyen por el microtubo dependiendo de la fuerza de reacción, es así que los glóbulos rojos pueden encontrarse en la parte superior del microtubo o estar disperso en el mismo. (Golffed, 2014)

Las tarjetas de gel pueden ser de gel neutro que posee NaCl, gel específico que posee una mezcla de gel y un antisuero específico o gel de antiglobulina humana. Una de las ventajas de la técnica en gel es que necesita volúmenes pequeños es decir 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos y 25 µl de suero o plasma. (Golffed, 2014)

Este tipo de determinaciones depende mucho de mantener el orden al dispensar los reactantes y sobre todo la forma de pipetear. Es así que para dispensar la suspensión de glóbulos se debe colocar a la pipeta en ángulo de 45° y apuntando hacia la pared del microtubo se colocan los 50 µl, mientras que para dispensar el suero o plasma se debe

colocar la pipeta en posición vertical y se colocará los 25 µl. De la misma forma es importante respetar los tiempos y temperaturas de incubación, así como los tiempos y velocidad de centrifugación ya que si se alteran estas condiciones podríamos generar falsos resultados. (Golffed, 2014)

Uno de los factores determinantes en esta técnica es la lectura de las tarjetas que puede ser subjetiva, ya que depende de la fuerza de reacción y del analista al diferenciar los diferentes resultados positivos, por lo que es necesario que el personal que trabaje en el área de inmunohematología sea capacitado. (Golffed, 2014)

2.1.10.3 Detección de antígenos del sistema Rh por métodos de biología molecular.

Las pruebas moleculares se basan en un proceso enzimático en donde se replican fracciones específicas de ADN mediante ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y extensión; esto nos permite caracterizar las bases genéticas de los grupos sanguíneos así como desarrollar herramientas para el diagnóstico clínico aplicado en inmunohematología y en medicina transfusional mediante la identificación de la varianza genética exacta en relación de la homocigosidad y a la heterocigosidad de una persona, con la finalidad de garantizar la tipificación exacta de donantes y pacientes que las técnicas serológicas habituales no podrían realizarlas. (Flegel, 2011) (Martínez-Álvarez y otros, 2007) Gracias a las técnicas moleculares se ha logrado:

- Conocer las bases moleculares del haplotipo RhD negativo común y sus polimorfismos asociados con los antígenos Rh comunes, logrando así prever el riesgo de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido.
- Conocer las bases moleculares de la expresión del epítipo del antígeno D en el polipéptido RHCE.
- Determinar las diferencias moleculares entre los alelos D, D débiles, parciales y DEL. (Flegel, 2011)

El enfoque de la terminación de los antígenos Rh mediante técnicas moleculares es la prevención de la incompatibilidad de los grupos sanguíneos con la finalidad de evitar aloinmunizaciones y reacciones transfusionales.

En el estudio realizado por Kappler y sus colaboradores en el año 2014 se utiliza un kit para la identificación de las variantes del Rh llamado RHCE and RHD BeadChip™ de la casa comercial BioArray, este kit utiliza tecnología eMAP el cual le permite estudiar las

variaciones en la expresión del Rh en pacientes multitransfundidos, la identificación de polimorfismos del Rh clínicamente significativos que son indetectables por las técnicas serológicas, investigación en tipificaciones de reacción débil, anticuerpos inesperados, y sobre todo en las variaciones de reacción producidas por los reactivos, determinación detallada de las variantes del Rh en mujeres embarazadas, y la realización de pruebas selectivas sobre donantes/paciente. (BioArray Solutions, 2011) (Kappler-Gratias y otros, 2014) En este estudio se analizaron 280 muestras de donantes con una expresión “normal” de RhD siendo tipificados como RhD positivo; las pruebas serológicas se realizaron con dos reactivos monoclonales, IgG e IgM para el antígeno D y un reactivo IgM para los antígenos C, c, E, e; estas muestras fueron analizadas molecularmente permitiendo conocer que el 11% presentaba una variante del antígeno D, este tipo de inconsistencias en las tipificaciones puede deberse a que las técnicas serológicas comunes no permiten detectar la expresión débil de los antígenos RHD y RHCE; por lo que los investigadores concluyeron que las técnicas moleculares para el análisis de RHD y RHCE son las que permiten la identificación de los fenotipos raros del Rh, que en técnicas serológicas pasarían inadvertidos.

Mientras que St-Louis y colaboradores analizaron 26 muestras las cuales presentaron una reacción débil del antígeno D, se determinó el fenotipo D mediante la técnica en tubo por triplicado en donde se utilizaron diferentes reactivos anti-D, un reactivo gamma IgM + IgG, un reactivo novaclone DBL IgM + IgG y un reactivo bioclono IgM + IgG policlonal, se rastreó anticuerpos D mediante la técnica IAT en tarjeta en gel; para el análisis molecular se utilizaron cebadores específicos para cada parámetro. En la técnica en tubo se presentaron variaciones en la reacción con los diferentes reactivos, presentando en la mayoría de las muestras una reacción de 1+ a 2+ con los reactivos gamma y novaclone, mientras que en una sola muestra presentó una reacción de 3+. En el análisis molecular las 26 muestras presentaron polimorfismo, de las cuales 65,4% muestras dieron positivo para el antígeno D débil tipo 42, 19,2% dieron positivo para el antígeno D débil tipo 1, el 3,8% dieron positivo para el antígeno D débil de tipo 2, el 3,8% dieron positivo para el antígeno D débil de tipo 45 y el 7,7% dieron positivo para DNBS. (St-Louis y otros, 2011) Las técnicas moleculares nos permiten tener una mejor visión de todas las mutaciones, o supresiones que nos permiten prevenir aloinmunizaciones por una transfusión no compatible.

2.1.11 Anticuerpos del sistema Rh

Los anticuerpos del sistema Rh son proteínas plasmáticas del tipo IgG, que se generan debido a la respuesta inmune, ya sea por una transfusión incompatible o por el embarazo, esto se debe a que el sistema Rh es el que presenta mayor inmunidad. (Kabiri y otros, 2014)

Cuando un paciente carece en sus eritrocitos de todas las partes del mosaico del antígeno D y se exponen a eritrocitos con el antígeno D completo, se producen aloanticuerpos anti-D que están dirigidos a uno o más de los epítomos que faltan en el eritrocito. (Kabiri y otros, 2014).

2.1.12 Enfermedad Hemolítica del Feto y del Recién Nacido asociada al antígeno D Débil.

La enfermedad hemolítica del recién nacido se debe a una incompatibilidad sanguínea materno fetal; esto se produce cuando la madre no posee en sus eritrocitos uno o más antígenos de los que posee la membrana del eritrocito de feto, generando una respuesta inmune que en un primer embarazo existe la sensibilización la madre y en un segundo embarazo la madre produce anticuerpos de tipo IgG que pueden atravesar placenta, estos anticuerpos reaccionan con los antígenos de la membrana de los eritrocitos del feto formando un complejo antígeno – anticuerpo, provocando la hemólisis. Los principales causantes de esta inmunización son los sistemas ABO y Rh, siendo este último el de mayor importancia clínica; ya que posee los antígenos D y sus variantes, los antígenos C, c, E y e; siendo el primero de mayor frecuencia. (Bennardello y otros, 2015).

2.1.13 MARCO CONCEPTUAL

Aloanticuerpos: Son anticuerpos producidos por la reacción inmune causada por la presencia de antígenos ajenos a los antígenos propios. (AABB, 2012)

Aloinmunización: Es una complicación esperada de la transfusión incompatible en la cual se producen anticuerpos contra antígenos diferentes a los propios; es frecuente en pacientes multitransfundidos. (Branch, 2012)

Anticuerpo: Es una inmunoglobulina producida durante una respuesta inmune contra un antígeno extraño. (AABB, 2012)

Concentrado eritrocitario: Se lo conoce también como paquete globular, es un concentrado de eritrocitos obtenido de la extracción del plasma de sangre total. (AABB, 2012)

Diátesis hemorrágica: Condición de una persona que sangra de manera anómala debido a un trastorno en la coagulación de la sangre. (Miller, 2010)

Fenotipo: Es la expresión de una característica física, biológica o fisiológica la cual ha sido heredada. (AABB, 2012)

Haplotipos: Alelos adyacentes que pueden encontrarse juntos en un segmento del cromosoma. (Goldman & Schafer, 2013)

Hemólisis extravascular: Destrucción de eritrocitos principalmente en el bazo. (Green, 2011)

Evanescencia: Capacidad de desaparecer (AABB, 2012)

Enfermedad hemolítica del recién nacido: reacción inmune producida por una incompatibilidad sanguínea entre madre e hijo causada por el factor Rh. (Geoff, 2013)

Inmunización: Protección adquirida por la administración de antígenos o anticuerpos específicos. (AABB, 2012)

Inmunogenicidad: Es la capacidad de un antígeno de provocar una respuesta inmune. (Herráez & Sánchez, 2012)

Mutaciones: alteración que se produce en la estructura o número de genes y que es transmitida a los descendientes. (AABB, 2012)

Reacción transfusional inmediata: Signo o síntoma que presenta un paciente dentro de las 24 horas a una transfusión sanguínea incompatible. (AABB, 2012)

Reacción transfusional tardía: Signo o síntoma que presenta un paciente posterior a las 24 horas de una transfusión sanguínea incompatible. (AABB, 2012)

Respuesta inmune: acción en la que el cuerpo reacciona y se defiende contra sustancias que son extrañas. (Guzmán, 2010)

Sensibilización: Es el estímulo que genera una respuesta inmune producido por un antígeno extraño. (AABB, 2012)

Supresión: Pérdida parcial o total de nucleótidos de una secuencia de ADN, alterando la composición del cromosoma. (Herráez y Sánchez, 2012)

CAPÍTULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 Tipo de Estudio:

Estudio descriptivo transversal; descriptivo porque se recolectaron datos de variables que buscan explorar algunas características de la muestra y de corte transversal debido a que se deseaba conocer todos los casos que presentan el antígeno D débil en un momento dado, es un estudio retrospectivo porque la información se obtuvo de un periodo anterior a la presente fecha, comprendida entre los años 2011 – 2014.

3.1.2 Muestreo, tamaño muestral y selección de unidad de muestra:

a) Tipo de muestro:

Muestreo aleatorio, revisión de datos de los reportes realizados desde el 2011 hasta el 2014 en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana.

b) Tamaño de Muestra:

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la fórmula de población finita.

$$n = \frac{N \times Z_{1-\alpha}^2 \times p \times q}{d^2 \times (N-1) + Z_{1-\alpha}^2 \times p \times q}$$

$$n = \frac{90000 \times 1.96^2 \times 0.5 \times 0.5}{0.05^2 \times (120000 - 1) + 1.96^2 \times 0.5 \times 0.5}$$

$$n = 1067$$

Dónde:

N: tamaño de la población

n: tamaño de la muestra

p: proporción esperada

q: 1-p

d: precisión del estudio 0,3%

$Z_{1-\alpha}^2$: nivel de confianza

Decisión: al no conocer la frecuencia exacta de la presencia del antígeno D débil se utilizó la fórmula finita para determinar el n muestral en la cual se asumió una proporción esperada del 0,5, con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 3% obteniendo un tamaño de muestra de 1067 registros por año. Sin embargo y considerando el sub-registro se tomó la decisión de revisar todos los registros obtenidos en cada año.

c) Criterios que sustentan la elección de población y muestra

- **Criterios de inclusión:** Se utilizaron los archivos que poseían todos los datos requeridos en la investigación.
- **Criterios de exclusión:** Los archivos incompletos no se utilizaron en la investigación.

3.1.3 Análisis Estadístico:

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó estadística descriptiva basándose en la aplicación del software informático SPSS Statistics versión 22.0, esto con la finalidad de presentar la frecuencia y la prevalencia de los antígenos D negativo y D débil, para la relación entre variables independientes se utilizó el análisis de Chi-cuadrado.

3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.2.1 Variable dependiente: Frecuencia del antígeno D débil.

3.2.2 Variable independiente: Edad, género, procedencia, antígenos C y E.

Operacionalización de Variables

Variable dependiente	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala	Tipo de variable	Técnica
Frecuencia del antígeno D débil.	Variante del antígeno D que presenta un número reducido de antígenos en la membrana del eritrocito. (AABB 2012)	Este antígeno se caracteriza por su reacción de aglutinación en la prueba de antiglobulina humana.	Presencia/ Ausencia	Frecuencia del antígeno D débil/Total de donantes	Nominal	Cualitativa	Análisis de resultados
Variables independientes	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala	Tipo de variable	Técnica
Edad	Tiempo de vida de una persona desde el momento en el que nació hasta el momento	Años cumplidos	Rangos de edad: 17-27años 28-38años 39- 49años 50-60 años	Porcentaje de donantes de 17-27 años. Porcentaje de donantes de 28-38 años Porcentaje de donante de 39-49 años Porcentaje de donantes de 50 a 60 años.	Razón	Cuantitativa	Formulario del donante
Género	Diferenciación de aspectos físicos entre un hombre y una mujer.	Femenino-Masculino	Hombre Mujer	Frecuencia de hombres / Total de donantes Frecuencia del antígeno D débil en hombres/ Total de donantes Frecuencia de mujeres / Total de donantes Frecuencia del antígeno D débil en mujeres/ Total de donantes	Nominal	Cualitativa	Formulario de donantes
Procedencia	Lugar natal o de vivienda de una persona por largo tiempo.	Lugar de origen del donante de sangre	Provincia	Porcentaje de donantes por provincias. Frecuencia del antígeno D débil en cada provincia Frecuencia del antígeno C y E por provincia	Nominal	Cualitativa	Formulario de donantes
Antígenos C	Uno de los antígenos del sistema Rh.	Presencia del antígeno C	Agglutinación	Porcentaje de muestras tipificadas como RhD débil con fenotipo Cde.	Nominal	Cualitativo	Registro de resultados
Antígeno E	Uno de los antígenos del sistema Rh	Presencia del antígenos E	Agglutinación	Porcentaje de muestras tipificadas como RhD débil con fenotipo cDE	Nominal	Cualitativo	Registro de resultados

3.3 PROCEDIMIENTO

Fase I: Autorizaciones

Se pidió la autorización para la realización de la investigación a las autoridades del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana.

Fase II: Validación de la información

La información se analizó de acuerdo al protocolo de validación de los registros de McGraw-Hill, que constituyó la verificación de los registros tanto en forma física como en digital, los cuales se evaluaron todos los registros proporcionados corroborando la existencia de todos los datos necesarios para la investigación, se analizaron los registros primarios y las bases de datos en el sistema del Hemocentro con la finalidad de encontrar incongruencias entre los datos obtenidos. Para lo cual se realizó:

- Clasificación de los registros primarios por mes y año.
- Verificación de los datos en el sistema: código, número de cédula, género, edad, procedencia, grupo sanguíneo, factor Rh, fenotipos del Rh, prueba Du y aloanticuerpos presentes en la base de datos de cada donante.
- Se eliminaron los registros de aquellos donantes que no eran ecuatorianos.
- Se eliminaron aquellos registros que presentaron incongruencia entre el cuaderno utilizado en el área de Inmunohematología y la base de datos electrónico.
- Aquellos datos que cumplieron con todos los parámetros fueron validados y recolectados en la base de datos.

Fase III: Base de datos

Se creó una base de datos en una hoja electrónica (Excel versión 2010) para la información recolectada necesaria para la investigación, esta base consta de la fecha de donación, el código utilizado en el Hemocentro, el número de cédula, edad, género, procedencia, grupo sanguíneo, factor Rh, fenotipos del Rh, prueba Du, y aloanticuerpos del donante. (Anexo 1)

Fase IV: Recolección de la información

Los datos se obtuvieron de los registros primarios es decir de los cuadernos utilizados en el área de Inmunohematología, previamente validados; mientras que los datos del donante se recolectaron de la base de datos electrónica del Hemocentro Nacional. Todos los datos obtenidos en la investigación fueron copiados en la hoja electrónica (Excel versión 2010) que se creó para esta investigación. (Anexo 2 y 3)

Fase V: Análisis de la información

Se analizó estadísticamente los datos obtenidos mediante el programa estadístico SPSS V.020 en el cual se realizó un análisis descriptivo.

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS

Descripción de la Población de Estudio

Se revisó un total de 461176 registros de donantes de sangre en las bases de datos del Hemocentro de Cruz Roja Quito, determinándose su aumento al pasar de los años. (Gráfico N°4.1).

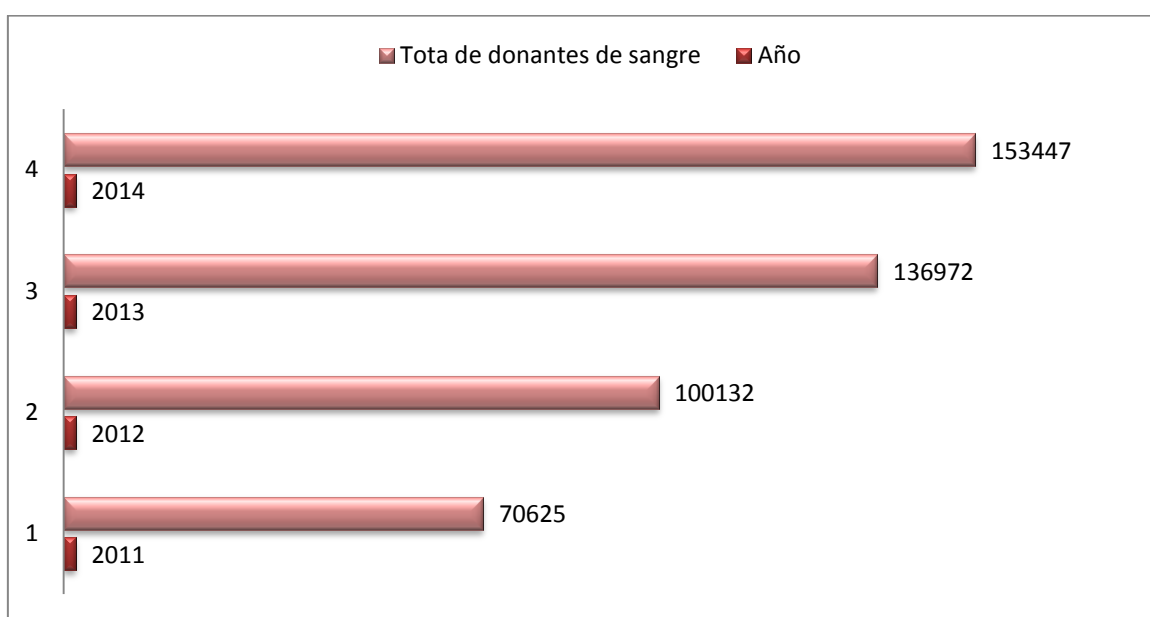


Gráfico N° 4.1 Total de donantes de sangre por año de captación

***Autor:** Catherine Gallegos*

***Fuente:** Base de datos del Hemocentro de Cruz Roja*

El gráfico muestra un aumento de donantes de sangre en el año 2014

Del total de registros revisados se eligieron todos aquellos documentos que correspondían a donantes de sangre identificados como Rh D negativos, estableciéndose que en los cuatro años existió un total de 9411 donantes de sangre tipificados inicialmente como portadores del factor Rh D negativo.

Se estableció que la frecuencia del género en la población de donantes de sangre se encuentra distribuida mayoritariamente por hombres que por mujeres. (Gráfica N°4.2).

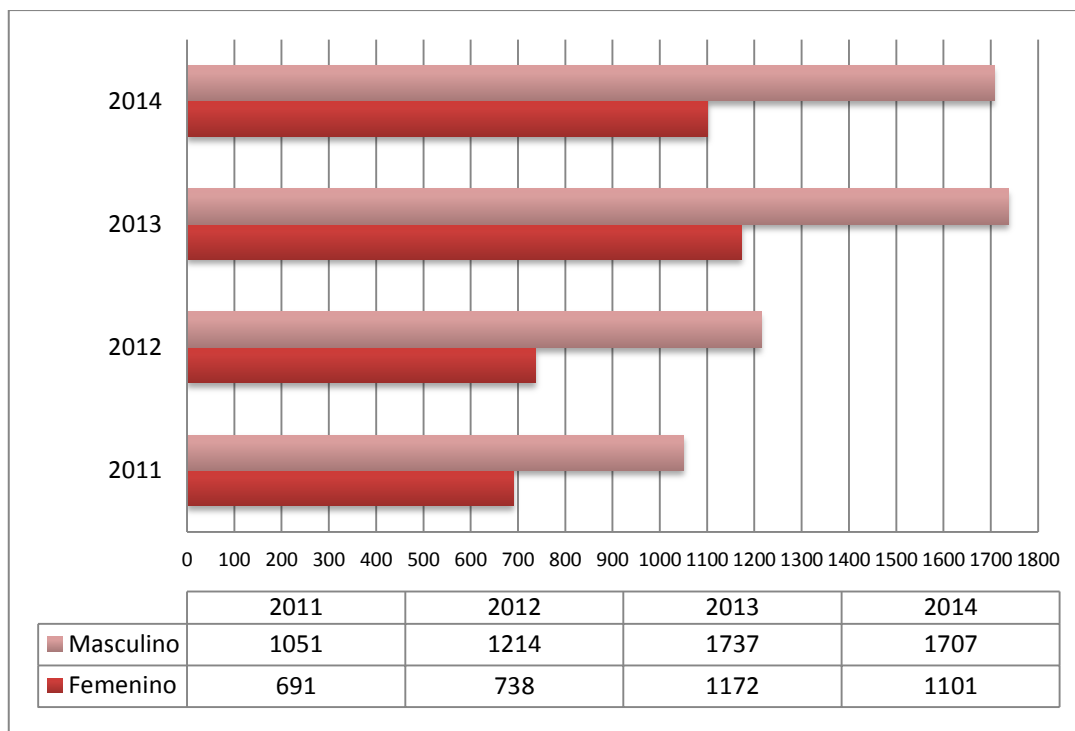


Gráfico N° 4.2 Total de donantes de sangre tipificados como Rh D negativos de acuerdo al género

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos del Hemocentro de Cruz Roja

En el gráfico se observa la distribución de los donantes tipificados como Rh D negativos de acuerdo al género.

Frecuencia del antígeno D negativo y débil en donantes de sangre durante los años 2011-2014.

En el análisis de la prevalencia de donantes identificados como Rh D negativos en relación al año de donación, se estableció que existe un porcentaje cuyo rango varía entre 1,8 a 2,5%. (Tabla N°4.1).

Tabla N° 4.1 Prevalencia de donantes de sangre tipificados como Rh D negativo

Año	Total Donantes Rh D negativo	Porcentaje
2011	1742	2,5
2012	1952	1,9
2013	2909	2,1
2014	2808	1,8
<i>Total</i>	<i>9411</i>	

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

La tabla muestra una prevalencia variable en cada año revisado que llega hasta el 2,5%.

Del total de donantes identificados inicialmente como Rh D negativos 191 muestras fueron confirmadas posteriormente como Rh D débil, es decir un 2,02% de prevalencia del total de muestras, las cuales fueron consideradas como Rh D positivo para despachar la pinta de sangre. Al analizar por año se estableció que existe un rango de prevalencia de 1,79% a 2,28%. La tabla muestra una prevalencia similar en los años 2011, 2012 y 2014. (Tabla N°4.2).

Tabla N°4.2 Prevalencia de donantes de sangre tipificados como Rh D débil

Año	Total Donantes Rh D Débil	Porcentaje
2011	35	2,01
2012	40	2,05
2013	52	1,79
2014	64	2,28
	191	

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

Relación de la presencia del antígeno D negativo y débil con el género, edad y procedencia de los donantes de sangre que acudieron durante el período 2011-2014.

Al analizar la frecuencia del antígeno D negativo y débil con el género se determinó que existe una similitud en la distribución de los dos antígenos, sin embargo es

estadísticamente poco significativa. Los gráficos muestran una distribución del antígeno Rh D en forma mayoritaria en hombres que en mujeres. (Gráfico N°4.3 y 4.4) (Tabla N°4.3). Estos resultados demuestran que el 39 y el 34% de la población femenina tienen riesgo de sufrir una aloinmunización durante un embarazo, debido a la falta de profilaxis, por otro lado el mayor porcentaje de estos antígenos se encuentra en el sexo masculino lo que representa un factor de riesgo ya que es la población que dona con mayor frecuencia, los cuales al ser mal tipificados podrían generar aloinmunizaciones innecesarias.

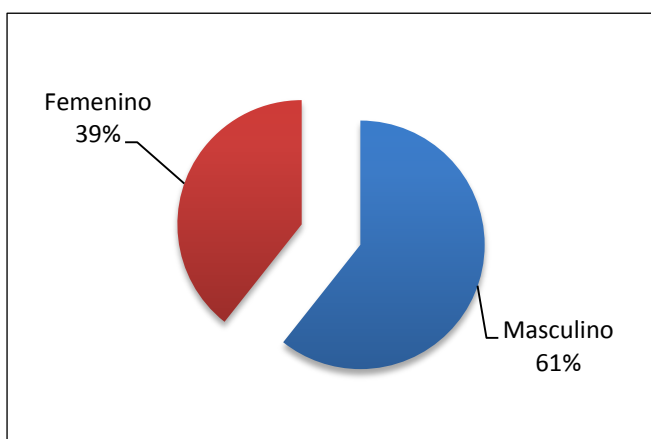


Gráfico N°4.3 Distribución porcentual del antígeno D negativo de acuerdo al género

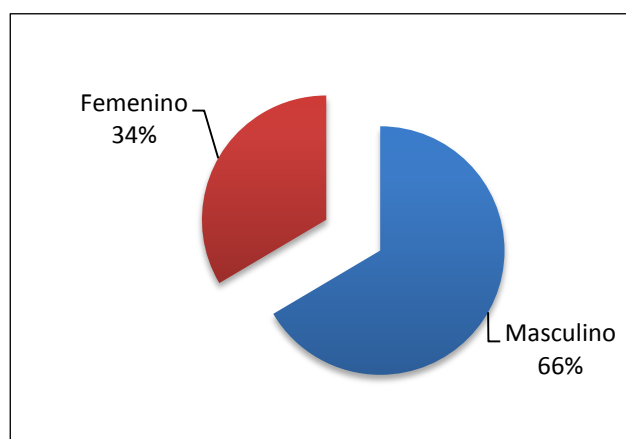


Gráfico N°4.4 Distribución porcentual del antígeno D débil de acuerdo al género

Autor: Catherine Gallegos
Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

Tabla N°4.3 Pruebas de chi-cuadrado: Género vs Variantes del antígeno D

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,776 ^a	1	,096		
Razón de verosimilitud	2,831	1	,092		
Prueba exacta de Fisher				,100	,055
N de casos válidos	9411				

Autor: Catherine Gallegos
Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

También se analizó la procedencia de los donantes de sangre tipificados inicialmente como Rh D negativos determinándose que procedían de 24 provincias ecuatorianas, siendo la de mayor prevalencia la de Pichincha; seguida por la de Guayas, Manabí y Loja durante los cuatros años de estudio. La tabla muestra la frecuencia de donantes de sangre identificados como Rh D negativos siendo las de menor prevalencia Galápagos (0,04%), y las provincias del Oriente (0,07-0,09%) al no tener un mayor número de donantes que acuden al Hemocentro. (Tabla N°4.4).

Tabla N°4.4 Distribución de donantes de sangre Rh D negativo de acuerdo a la procedencia

Provincia	Años							
	2011	%	2012	%	2013	%	2014	%
Azuay	10	0,57	14	0,72	20	0,69	56	1,99
Bolívar	19	1,09	20	1,02	22	0,76	29	1,03
Cañar	2	0,11	5	0,26	6	0,21	11	0,39
Carchi	59	3,39	54	2,77	61	2,10	68	2,42
Chimborazo	24	1,38	18	0,92	30	1,03	45	1,60
Cotopaxi	37	2,12	21	1,08	65	2,23	71	2,53
El Oro	17	0,98	19	0,97	27	0,93	68	2,42
Esmeraldas	59	3,39	54	2,77	54	1,86	54	1,92
Galápagos		0,00		0,00	3	0,10	1	0,04
Guayas - Guayaquil	42	2,41	261	13,37	577	19,83	346	12,32
Imbabura	80	4,59	70	3,59	108	3,71	136	4,84
Loja	138	7,92	117	5,99	142	4,88	148	5,27
Los Ríos	30	1,72	65	3,33	156	5,36	107	3,81
Manabí	118	6,77	216	11,07	211	7,25	252	8,97
Morona Santiago	1	0,06	1	0,05	3	0,10	6	0,21
Napo	4	0,23	2	0,10	1	0,03		0,00
Orellana		0,00	1	0,05	3	0,10	2	0,07
Pastaza	2	0,11	2	0,10	3	0,10	1	0,04
Pichincha	985	56,54	878	44,98	1165	40,05	1155	41,13
Santa Elena		0,00	1	0,05	5	0,17	4	0,14
Santo Domingo de los Tsachilas	57	3,27	69	3,53	95	3,27	104	3,70
Sucumbíos	3	0,17	3	0,15	4	0,14	5	0,18
Tungurahua	52	2,99	56	2,87	140	4,81	130	4,63
Zamora Chinchipe	3	0,17	5	0,26	8	0,28	9	0,32
Total	1742		1952		2909		2808	

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos del Hemocentro de Cruz Roja

Del análisis de la procedencia de los donantes de sangre confirmados como Rh D débil se identificó que procedían de 17 provincias ecuatorianas, siendo las de mayor prevalencia la de Pichincha y Guayas. La tabla muestra la frecuencia de donantes de sangre identificados como Rh D débil siendo 15 provincias las que exhiben una prevalencia entre 0,52 a 44,23%. (Tabla N° 4.5).

Tabla N°4.5 Distribución de donantes de sangre Rh D débil de acuerdo a la procedencia

Provincia	Años							
	2011	%	2012	%	2013	%	2014	%
Azuay - Cuenca		0	2	5		0,00	2	3,08
Bolívar	1	2,94		0		0,00		0,00
Carchi	2	5,88	1	2,5	1	1,92	1	1,54
Chimborazo	1	2,94		0	1	1,92	2	3,08
Cotopaxi		0,00	1	2,5	1	1,92	3	4,62
El Oro	1	2,94	2	5	1	1,92	2	3,08
Esmeraldas	3	8,82	1	2,5	2	3,85	2	3,08
Guayas - Guayaquil	1	2,94	5	12,5	12	23,08	12	18,46
Imbabura	1	2,94	2	5		0,00	3	4,62
Loja	4	11,76	5	12,5	3	5,77	6	9,23
Los Ríos		0,00	3	7,5	5	9,62	3	4,62
Manabí	4	11,76	2	5	1	1,92	4	6,15
Morona Santiago		0,00	1	2,5		0,00		0,00
Pichincha	13	38,24	13	32,5	23	44,23	24	36,92
Santo Domingo de los Tsachilas	1	2,94	2	5	1	1,92		0,00
Sucumbíos	1	2,94		0		0,00		0,00
Tungurahua	1	2,94		0	1	1,92	1	1,54
Total	34		40		52		65	

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos del Hemocentro de Cruz Roja

El análisis de la distribución del antígeno D negativo y D débil en relación a la edad se estableció que se encuentran distribuidos en los grupos considerados en edad fértil 16 - 45 años, sin existir diferencias significativas entre ellos. (Gráfico N°4.5-4.6)

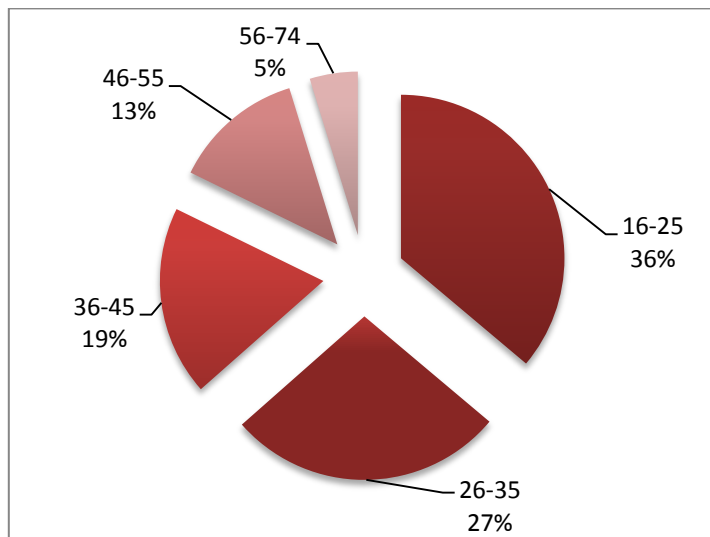


Gráfico N°4.5 Distribución porcentual del antígeno D negativo de acuerdo al grupo etario

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

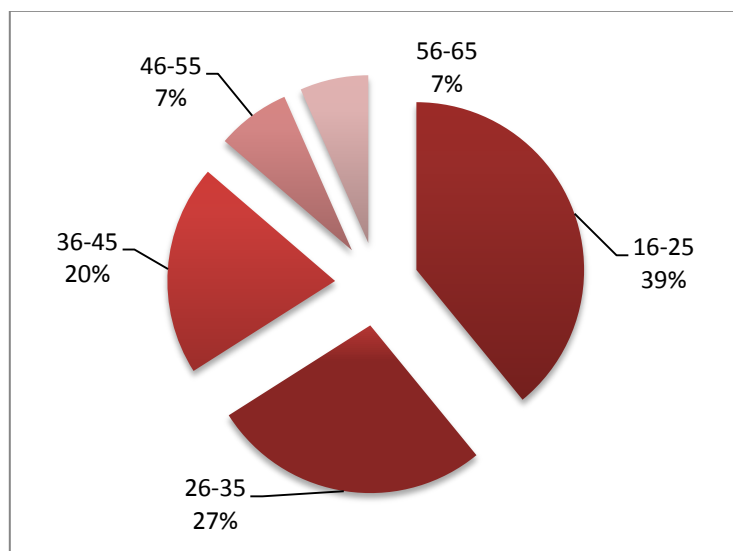


Gráfico N°4.6 Distribución porcentual del antígeno D débil de acuerdo al grupo etario

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja.

Relación de la presencia del antígeno D débil con la expresión fenotípica de los antígenos C y E en donantes de sangre que acudieron durante el período 2011-2014.

El análisis de los resultados permitió identificar que los fenotipo Rh D débil están relacionados mayoritariamente con el fenotipo C-c+E+e+ (39%) y C+c+E-e+ (32%), $p < 0.005$ (Gráfico N°4.7) (Tabla N°4.6)

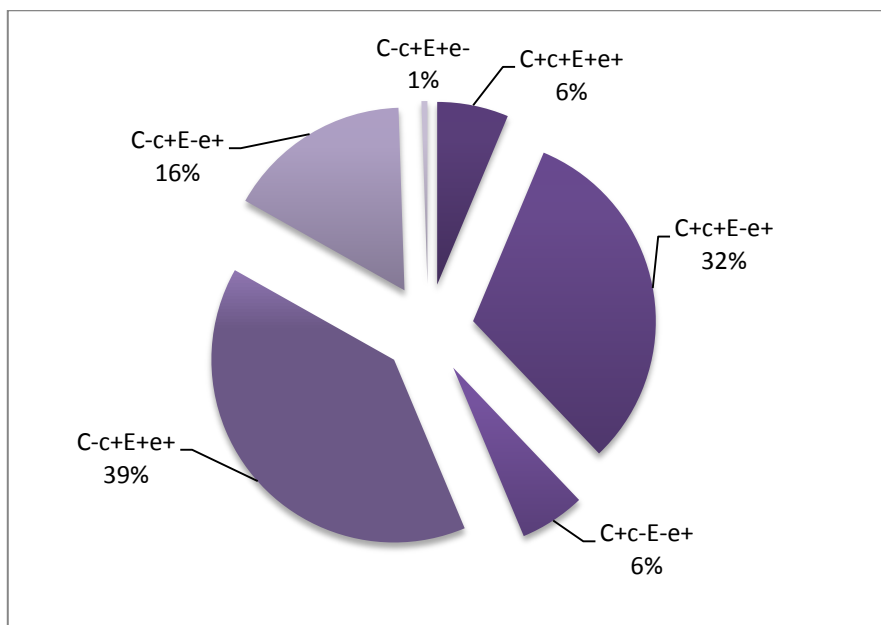


Gráfico N°4.7 Frecuencia del fenotipo Rh D-CDE con el antígeno D débil

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

El gráfico muestra la distribución de los fenotipos del sistema Rh-CDE en los donantes confirmados como D^u positivos.

Tabla N° 4.6 Pruebas de chi-cuadrado: Presencia D débil vs antígenos C/E

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	21,247 ^a	1	,000		
Corrección de continuidad	11,258	1	,001		
Razón de verosimilitud	6,856	1	,009		
Prueba exacta de Fisher				,011	,011
N de casos válidos	9411				

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

Al analizar los antígenos CDE por separado se identificó que los más frecuentes en donantes con antígeno D débil son el c+ (24%); e+(25%). (Gráfico N°4.8).

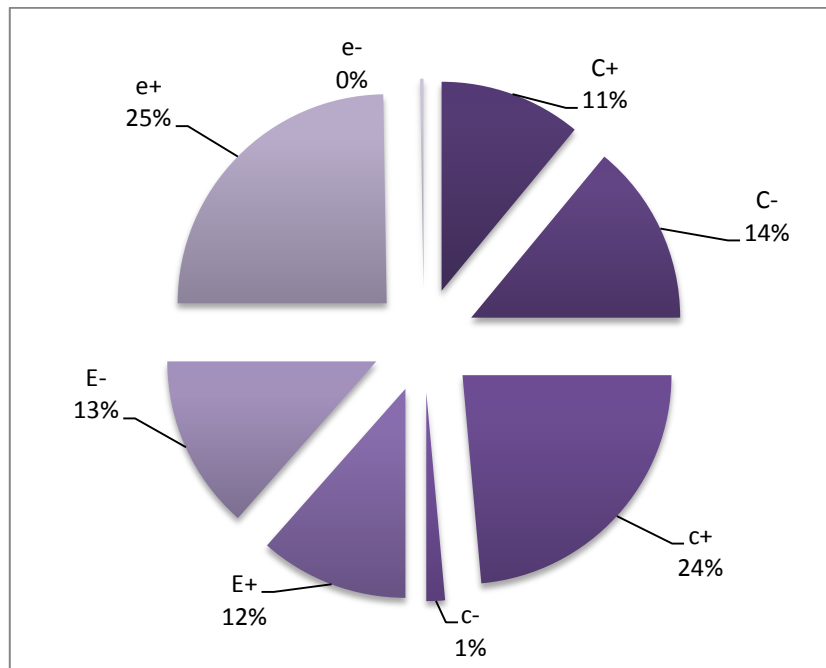


Gráfico N°4.8 Frecuencia de los antígenos CE/ce con el antígeno D débil

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

El gráfico muestra la distribución de los antígenos del sistema Rh-CDE en los donantes confirmados como D^u positivos.

Determinación de los posibles tipos del antígeno D débil de acuerdo a los fenotipos CDE/cde en los donantes de sangre que acudieron durante el período 2011-2014

Del análisis realizado de acuerdo a los resultados fenotípicos del sistema Rh se identificó que el Rh D débil más común en los donantes de sangre ecuatorianos es el tipo 2 y 5 (con una frecuencia de 40%) en el que se identificaron la existencia de homocigotos y heterocigotos para el antígeno E/e; seguido por el Rh D débil de tipo 1 y 3 (con una frecuencia de 37,3%) el que presenta la forma homocigota y heterocigota para el antígeno C/c; mientras que el Rh D débil de tipo 4,1 - 4,2 (con una frecuencia de 16,3%) es el más escaso, este presenta el fenotipo homocigoto para los antígenos c/e.

Adicionalmente existe el fenotipo CcEe en 12 donantes tipificados como Rh D débil. (Tabla N°4.7)

Tabla N°4.7 Tipos de antígenos D débil de acuerdo a la clasificación serológica de los fenotipos del sistema Rh

<i>Tipificación</i>		<i>Tipo de D débil</i>	<i>Heterocigoto</i>	<i>Homocigoto</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Total</i>	<i>Porcentaje</i>
C+c+E+e+	CcEe	Tipo 1 y 3	CcEe		CDE/cDe	12	6,32%
C+c+E-e+	Ccee	Tipo 1 y 3	C	e	CDe/cDe	60	37,37%
C+c-E-e+	CCee	Tipo 1 y 3		C-e	CDe/CDe	11	
C-c+E+e+	ccEe	Tipo 2 y 5	Ee	c	cDE/cDe	75	40%
C-c+E+e-	ccEE	Tipo 2 y 5		c-E	cDE/cDE	1	
C-c+E-e+	ccee	Tipo 4,1-4,2		c-e	cDe/cDe	31	16,32%

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

El gráfico muestra el tipo del antígeno D débil del sistema Rh-CDE en los donantes confirmados como D^u positivo (D débil)

Determinación de la existencia de aloanticuerpos en donantes tipificados como D negativos y D débil durante el período 2011-2014.

En el último parámetro de análisis se estableció que un donante de sangre de género femenino procedente de Morona Santiago confirmado como Rh D débil presentaba una aloinmunización doble, es decir dos anticuerpos anti-D y anti-C.

En contraste, en los donantes que fueron confirmados como Rh D negativos se estableció la existencia de aloinmunización por antígenos del sistema Rh-CDE así: 156 presentaron una aloinmunización relacionada con el antígeno D (anti-D); 24 donantes presentaron una doble aloanticuerpo (anti-D-anti-C); 1 donante presentó (anti-D-anti-E) y en 3 donantes fue identificado un anti-E. (Tabla N°4.8) (Gráfico N°4.9)

Tabla N°4.8 Presencia de aloinmunización en donantes tipificados como RhD negativos y D débil

<i>Donantes RhD negativos</i>	
Anticuerpos	Total de donantes
anti-D	184
anti-D; anti-C	24
anti-D; anti-E	3

<i>Donantes RhD débil</i>	
Aloanticuerpo	Total de donantes
anti-D; anti-C	1

Autor: Catherine Gallegos
Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

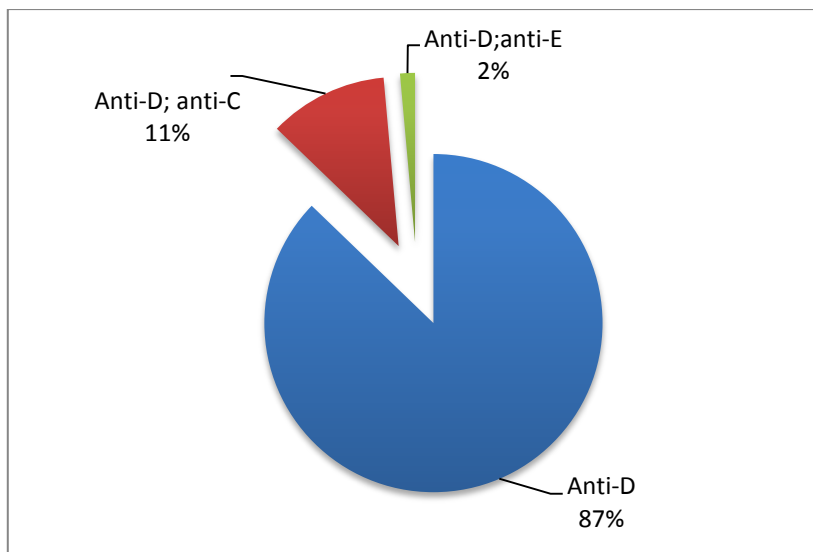


Gráfico N°4.9 Porcentaje de aloinmunización por los antígenos del sistema RH-CDE

Autor: Catherine Gallegos
Fuente: Base de datos Hemocentro de Cruz Roja

El gráfico muestra la distribución porcentual de aloinmunización en donantes confirmados como Rh D negativos.

5 DISCUSIÓN

El análisis de registros primarios en un proceso investigativo tiene la ventaja de obtener información original, no abreviada ni traducida lo que la transforma en una fuente de datos precisa. (Hernández y otros, 2010) Sin embargo debe tenerse en cuenta la confiabilidad de los datos obtenidos, en este estudio se revisaron un total de 461176 registros antes de elegir aquellos que permitirían medir las variables planteadas en cada uno de los objetivos, es así que se eligieron un total de 9411. Hernández y sus colaboradores mencionan que un aspecto dentro de la utilización de registros primarios es la objetividad que evita que el investigador introduzca sesgo y tendencias durante la obtención de resultados bajo este criterio se eliminaron del estudio aquellos registros que carecían de información o mostraban escritura defectuosa. Los registros elegidos pertenecían exclusivamente a donantes tipificados inicialmente como RhD negativos. (Hernández y otros, 2010)

La población estudiada se encontró formada mayoritariamente por hombres que mujeres esto debido a los requisitos previos necesarios para donar sangre como son: niveles de hematocrito y hemoglobina; de acuerdo al Manual de la OPS las donantes mujeres disminuyen sus valores de hematocrito y hemoglobina durante el período menstrual por la pérdida de aproximadamente 40-50 mL (OPS, 2009). De acuerdo al estudio realizado por Torres, 2011 la tercera causa para el diferimiento de los donantes de sangre fueron los valores bajos de hematocrito y hemoglobina (6,2%) (Torres Padilla, 2010), esto ocasiona un número menor de donantes femeninos.

La determinación de la prevalencia del antígeno D negativo y débil en donantes de sangre facilita a los bancos de sangre y Hemocentro los cálculos del stock de sangre disponible, en este estudio se estableció que la prevalencia del antígeno D negativo en donantes de sangre fue entre 1,8 a 2,5% a lo largo de cuatro años. El estudio realizado en Albania identificó una prevalencia de 10,86% y en la población caucásica fue del 15 al 17% (Xhetani y otros, 2014); sin embargo en la población africana es entre el 3 a 7% y en la Asiática es menor al 1% (Martin y otros, 2013)

En relación a la prevalencia del antígeno D débil se estableció que en los cuatro años de estudio existe entre 1,79 a 2,28% en donantes de sangre ecuatorianos tipificados inicialmente como D negativos. De acuerdo a las investigaciones realizadas en población caucásica se estableció una prevalencia de este antígeno del 0,2-1,0% (Xhetani y otros, 2014) en contraste en la población de Albania es del 0,14%, y en la africana es del

1,55%. Estos datos demuestran la afirmación dada por los investigadores que manifiestan que las frecuencias y prevalencias de los antígenos eritrocitarios son característicos de cada población o etnia.

El análisis de la relación del antígeno D negativo y D débil con el género y la edad no existieron diferencias estadísticamente significativas $p > 0,005$, encontrándose distribuidos equitativamente para cada variante del antígeno D, sin embargo es un dato que permite establecer la probabilidad de aloinmunización ya sea a través del embarazo como transfusiones sanguíneas, estos cálculos pueden ser realizados cuando se establece la frecuencia de cada antígeno (Del Peón-Hidalgo y otros, 2002) (Sojo y Chiriboga, 2013). Adicionalmente estos datos permiten crear “regulaciones por ley” como en el caso de Alemania, Reino Unido, Francia y Holanda países en los que se estableció el uso de reactivos monoclonales de clase IgM que no aglutine variantes del antígeno D (Muñis Díaz y otros, 2010); de esta manera en mujeres embarazadas y pacientes portadores de antígeno D débil no aglutinarán y se evitará tipificaciones erradas.

En este estudio se determinó la distribución y frecuencia del antígeno D negativo en 24 provincias ecuatorianas siendo la de Pichincha la de mayor prevalencia con 56,54% en el año 2011, seguido de la de Guayas con 19,83% en el año 2013 siendo las de menor prevalencia Galápagos 0,04% y el Oriente 0,07-0,10% en todos los años de análisis en contraste el estudio realizado en La Paz identificó una prevalencia de 4,6% similar a la de México que es del 4,1%, siendo Monterrey la de mayor prevalencia con el 7,7% (Del Peón-Hidalgo y otros, 2002). Los datos relacionados con el antígeno D débil muestran que se encuentra distribuido en 17 provincias ecuatorianas al igual que el antígeno D negativo es más frecuente en la de Pichincha y Guayas, sin embargo en las provincias restantes su frecuencia esta entre 2,94 al 8,82%, similar a otros estudios la distribución de los fenotipos del sistema Rh son típicos de cada población y etnia. (Muñis Díaz y otros, 2010) (AABB, 2012)

Se analizó la presencia del antígeno D débil con la expresión fenotípica de los antígenos “C/c” y “E/e” determinándose que se encuentran relacionados con el fenotipo c+e+ en un 24 a 25%, una de las estrategias tomadas en consideración en los países que no cuentan con reactivos clasificadores o técnicas moleculares fue la introducción de fenotipaje CDE a todos los donantes portadores de este antígeno para la clasificación del antígeno D débil, así determinaron que el fenotipo tipo 1 es el más frecuente en la población europea mientras que en la península ibérica el tipo 2 es el más común dentro de los individuos portadores del fenotipo D débil, en contraste en la población africana donde es más

frecuente el fenotipo D débil tipo 4 y 2 (Muñis Díaz y otros, 2010), en el presente estudio se estableció que los tipos más comunes fueron el 2 y 5, seguidos del 1 y 3 cada uno representados por fenotipos heterocigotos y homocigotos.

En el estudio realizado por Mota y sus colaboradores en Brasil en el año 2012 se determinaron por métodos serológicos muestras de donantes tipificados como D negativo y que al ser confirmados por métodos moleculares se identificaron a los verdaderos D negativo y sus variantes, determinándose que existe un 0,8% de muestras erróneamente tipificadas. (Mota y otros, 2012).

En este estudio se analizó la existencia de aloinmunización en la población de estudio identificándose que una mujer confirmada como Rh D débil, la cual presentó una doble aloinmunización (anti-D y anti-C), este dato es de suma importancia para el futuro manejo de estos donantes especialmente cuando exista el requerimiento de transfusiones sanguíneas o en caso de embarazo. El estudio realizado por Al-Dughaihi y otro 2016, afirma la importancia del estudio de la prevalencia del antígeno RhD negativo en mujeres como un importante proceso para evitar una aloinmunización durante el embarazo ya que la información obtenida facilitaría el desarrollo de programas de tamizaje que les permita identificar a los verdaderos RhD negativos. (Al-Dughaihi y otros, 2016)

Así mismo el estudio realizado por Studničková M y otros, menciona que la identificación de mujeres portadoras del factor RhD negativo, es de suma importancia ya que pueden desarrollar un anticuerpo anti-D espontáneo antes del parto debido a una hemorragia feto-materna, por lo que se debe realizarse exámenes previos de identificación inequívoca del antígeno D y de anticuerpos irregulares tomando en cuenta que los anticuerpos anti-D, anti-C y anti-K son de gran importancia en el desarrollo de la denominada enfermedad hemolítica del recién nacido. (Studničková y otros, 2016)

El análisis de los datos permitió establecer que los donantes que fueron confirmados como Rh D negativos presentaron aloinmunización con anticuerpos solos y combinados así: anti-D, anti-C y Anti-D, anti-C y el anticuerpo anti-E. De acuerdo a Farnault y otros, la enfermedad hemolítica del recién nacido debida al anticuerpo anti-D ha disminuido en los últimos 10 años por la introducción del tratamiento con Rhogam, sin embargo existe un aumento en la incidencia de casos debida a la producción de otros anticuerpos como anti-c y anti-E y en un 14% debido a la existencia de anticuerpos combinados. Farnault reporta un caso de enfermedad hemolítica leve debida a anti-E complicada con hiperbilirrubinemia que fue tratada a tiempo, pero la anemia en el recién nacido se manifestó progresivamente hasta el mes de edad por lo que requirió un seguimiento

continuo. Este hecho pone en evidencia la falta de un tratamiento profiláctico para este tipo de anticuerpos. (Farnault y otros, 2011)

La aloinmunización por el antígeno D no solamente es debida a la transfusión de concentrado de glóbulos rojos sino también a concentrados plaquetarios así lo demostró el estudio realizado por Joan Cid y otros, quienes identificaron una prevalencia del 1,44%, su teoría indicaba tres posibilidades así: la primera debido al paso de pequeñas cantidad de glóbulos rojos (D+) a receptores Rh D negativos; la segunda teoría enfocada a la capacidad de respuesta inmune así los pacientes (D-) que tenían contacto con cantidades pequeñas de D+ pero que eran inmunocompetentes desarrollaban aloinmunización en el 80% de los casos y la última las técnicas y algoritmos de detección son variadas y únicas de cada centro de tipificación, todo esto ocasiona diferencias significativas en las posibles causas de producción de aloanticuerpos, sin embargo es claro que debe realizarse una adecuada e inequívoca identificación del antígeno D y sus variantes.

6 CONCLUSIONES

- Se determinó que existe una prevalencia variante de donantes tipificados como Rh (d) negativos a lo largo de cuatro años pero que no superaba el 2,5%.
- La prevalencia de donantes confirmados como Rh (D) débil fue del 2,28% en el año 2014.
- La distribución del factor Rh (d) negativo en mujeres fue del 39%, mientras que del antígeno D débil fue del 34%. En relación al género masculino fue del 61 y 66% respectivamente, a pesar de esto se determinó que no existe significancia estadística entre la presencia de estos antígenos y el género.
- El análisis de la distribución del antígeno D débil se estableció que se encuentra en 17 provincias ecuatorianas, siendo la de Pichincha la de mayor prevalencia.
- Se estableció que el 39% de donantes entre 16-25 años presentaron el antígeno D débil y el 27% de donantes entre 26-35 años.
- Se determinó una relación estadísticamente significativa del antígeno D débil con los antígenos c, E, e (39%).
- Al analizar estadísticamente la relación entre la frecuencia de los antígenos CDE con el fenotipo D débil, se identificó que existe relación entre estas variables, de esta manera se correlaciona con la teoría de que estos causan una disminución en la expresión del antígeno D.
- De acuerdo a la fenotipificación de los antígenos del sistema Rh se encontró que el tipo D débil 2 (ccEe) y 4 (ccee) fueron los más frecuentes.
- En relación a la aloinmunización se identificó que 184 donantes presentaron aloinmunización por el antígeno D y 27 donantes presentaron anticuerpos dobles (anti-D; anti-C) (anti-D; anti-E). Comprobándose así que existe aloinmunización en donantes de sangre tipificados inicialmente como Rh (d) negativos.

7 RECOMENDACIONES

- Se recomienda que se establezca un algoritmo de detección del antígeno D tanto en bancos de sangre como en laboratorios clínicos dedicados a esta actividad.
- Es indispensable que sea confirmada una tipificación que inicialmente fue identificada como Rh (d) negativa por la probabilidad de que se trate de otra variante del antígeno D.
- Es necesario establecer un esquema de detección del antígeno D en mujeres en edad fértil, antes, durante y después del embarazo.
- Se debe mantener un estricto cuidado en el momento de una transfusión sanguínea a pacientes con fenotipo Rh (d) negativo.
- Se debe establecer un sistema de identificación para individuos tipificados como Rh (D) débil especialmente al momento de que se conviertan en donantes de sangre para que sus hemoderivados sean utilizados en pacientes Rh (D) positivos.
- Se recomienda que en individuos tipificados como Rh (d) negativos se realice la tipificación de los antígenos CDE para de alguna manera alertar sobre la posibilidad de ser portadores de una variante del antígeno D.
- Estos algoritmos de detección deben ser considerados por el Programa Nacional de Sangre e incluidos en el Programa de Maternidad Gratuita.

8 BIBLIOGRAFÍA

AABB, 2012, *Manual Técnico de la AABB*. 17. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología.

ABBAS, A. K., LITCHTMAN, A. H. H. and PILLAI, S, 2014, *Cellular and Molecular Immunology; with Student Consult Online Access*. 8. Elsevier Health Sciences. ISBN 978-0-323-22275-4.

AL-DUGHAIISHI, Tamima, AL HARRASI, Yusra, AL-DUHLI, Maymoona, AL-RUBKHI, Ikhlass, AL-RIYAMI, Nihal, AL-RIYAMI, Arwa Z., PATHARE, Anil V. and GOWRI, Vaidyanathan, 2016, Red Cell Alloimmunization to Rhesus Antigen Among Pregnant Women Attending a Tertiary Care Hospital in Oman. *Oman Medical Journal*. January 2016. Vol. 31, no. 1, p. 77–80. DOI 10.5001/omj.2016.15. PMID: 26813962PMCID: PMC4720943

AL-JOUDI, Fawwaz, ALI, Anuar Bin, RAMLI, Majdan Bin, AHMED, Suhair and ISMAIL, Mohd, 2011, Prevalence and specificities of red cell alloantibodies among blood recipients in the Malaysian state of Kelantan. *Asian Journal of Transfusion Science*. January 2011. Vol. 5, no. 1, p. 42–45. DOI 10.4103/0973-6247.75997. PMID: 21572715PMCID: PMC3082716

ARBELÁEZ GARCÍA, Carlos Alberto, 2009, Fundamentos de genética e inmunología para bancos de sangre y medicina transfusional. *Medigraphic*. 2009. Vol. 15, no. 1 - 2, p. 37 – 68.

BENALCÁZAR, Lucía and CHIRIBOGA, Rosa, 2013, *Determinación de la capacidad de detección de los reactivos monoclonales y policlonales utilizados para la identificación del antígeno "D en técnica en tubo*. [online]. Quito : Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/9630>

BENNADELLO, Francesco, COLUZZI, Serelina, CURCIARELLO, Giuseppe, TODROS, Tullia and VILLA, Stefania, 2015, Recommendations for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. *Blood Transfusion*.

January 2015. Vol. 13, no. 1, p. 109–134. DOI 10.2450/2014.0119-14.
PMID: 25633877PMCID: PMC4317097

BIOARRAY SOLUTIONS, 2011, BioArray™ RHCE and RHD BeadChip™. [online].
2011. [Accessed 21 February 2016]. Available from: http://www.immucor.com/en-us/Products/Documents/BioArray_RH_SalesSheet.pdf

BRANCH, Donald R, 2012, Solving the dilemma of prevention of red cell
alloimmunization. *Immunotherapy*. September 2012. Vol. 4, no. 9, p. 903–905.
DOI 10.2217/imt.12.90.

BRAVO LINDORO, A. G., 2014, Efectos adversos no infecciosos de la transfusión
sanguínea. . 2014. Vol. 11, no. 1, p. 12 – 15.

BUELVAS, A., MUÑOZ-DÍAZ, E and LEÓN, G., 2014, *Inmunohematología básica y
aplicada*. Colombia : Feriva.

CREDIDIO, Débora Castilho, PELLEGRINO, Jordão and CASTILHO, Lilian, 2011,
Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for
typing and transfusion strategy. *Immunohematology / American Red Cross*. 2011.
Vol. 27, no. 1, p. 6–11. PMID: 22356480

DEL PEÓN-HIDALGO, Lorenzo, PACHECO-CANO, Ma Guadalupe, ZAVALA-RUIZ,
Mirna, MADUEÑO-LÓPEZ, Alejandro and GARCÍA-GONZÁLEZ, Adolfo, 2002,
Frecuencias de grupos sanguíneos e incompatibilidades ABO y RhD, en La Paz,
Baja California Sur, México. *Salud Pública de México*. September 2002. Vol. 44,
no. 5, p. 406–412.

DE OLIVEIRA CRUZ, Roberto, MOTA, Mariza Aparecida, MENDES CONTI, Fabiana,
D'ALMEIDA PEREIRA, Ricardo Antônio, KUTNER, Jose Mauro, ARAVECHIA,
Maria Giselda and CASTILHO, Lilian, 2011, Prevalence of erythrocyte
alloimmunization in polytransfused patients. *Einstein (São Paulo)*. June 2011.
Vol. 9, no. 2 Pt 1, p. 173–178. DOI 10.1590/S1679-45082011AO1777.
PMID: 26760811

FARNAULT, L., GARCIA-MERIC, P., CORTEY, A. and ARNAUD, F., 2011, [Fetomaternal

anti-RH3, -4 (anti-E and anti-c) rhesus isoimmunization: a case report]. *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*. February 2011. Vol. 18, no. 2, p. 176–182. DOI 10.1016/j.arcped.2010.11.005. PMID: 21194903

FLEGEL, Willy A., 2011, Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. February 2011. Vol. 44, no. 1, p. 81–91. DOI 10.1016/j.transci.2010.12.013. PMC3042511 PMID: 21277262 PMID: PMC3042511

GEOFF, Daniels, 2013, *Human blood groups* [online]. Chichester, West Sussex : John Wiley & Sons. [Accessed 2 February 2015]. ISBN 9781118493625 1118493621. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=542832>.

GOLDMAN, L. and SCHAFER, A., 2013, *Cecil y Goldman, Tratado de medicina interna*. 24. Elsevier España. ISBN 978-84-8086-970-6.

GOLFFED, Jorge, 2014, Microtécnica de Aglutinación en gel Fundamentos y técnicas básicas. [online]. July 2014. Available from: http://www.donasangre.uy/wp-content/uploads/2014/07/Microtecnica_de_Aglutinacion_en_Gel.pdf

GREEN, A.R., 2011, *Postgraduate Haematology*. John Wiley & Sons. ISBN 978-1-4051-9180-7.

GUZMÁN, F. J. L., 2010, *Introducción a la medicina clínica: fisiología y semiología*. Elsevier España. ISBN 978-84-458-2031-5.

HERNÁNDEZ, Roberto, FERNÁNDEZ, Carlos and BAPTISTA, María del Pilar, 2010, *Metodología de la Investigación*. Colombia : McGrawHill. ISBN 978-607-15-02919.

HERRÁEZ, Ángel and SÁNCHEZ, Ángel Herráez, 2012, *BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA*. Elsevier Health Sciences. ISBN 8480866470.

- HUSSEIN, Eiman and TERUYA, Jun, 2013, Weak D Types in the Egyptian Population. *American Journal of Clinical Pathology*. 1 June 2013. Vol. 139, no. 6, p. 806–811. DOI 10.1309/AJCP1T9FGZBHIQET. PMID: 23690125
- KABIRI, Z., BENAJIBA, M., HAJJOUT, K., DAKKA, N. and BELLAOUI, H., 2014, Testing for Partial RhD with a D-Screen Diagast Kit in Moroccan Blood Donors with Weak D Expression. *Journal of Blood Transfusion* [online]. 2014. Vol. 2014. [Accessed 24 March 2016]. DOI 10.1155/2014/204301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4228700/> PMID: 25530908PMCID: PMC4228700
- KACKER, Seema, VASSALLO, Ralph, KELLER, Margaret A., WESTHOFF, Connie M., FRICK, Kevin D., SANDLER, S. Gerald and TOBIAN, Aaron A.R., 2015, Financial implications of RHD genotyping of pregnant women with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*. September 2015. Vol. 55, no. 9, p. 2095–2103. DOI 10.1111/trf.13074. PMID: 25808011PMCID: PMC4739823
- KAPPLER-GRATIAS, Sandrine, AUXERRE, Carine, DUBEAUX, Isabelle, BEOLET, Marylise, RIPAUX, Maryline, LE PENNEC, Pierre-Yves and PHAM, Bach-Nga, 2014, Systematic RH genotyping and variant identification in French donors of African origin. *Blood Transfusion*. January 2014. Vol. 12, no. Suppl 1, p. s264–s272. DOI 10.2450/2013.0270-12.PMC3934220PMID:23867180PMCID: PMC3934220
- KIM, Young-Hoon, KIM, Hyun O., BAEK, Eun J., KURITA, Ryo, CHA, Hyuk-Jin, NAKAMURA, Yukio and KIM, Hyongbum, 2015, Rh D blood group conversion using transcription activator-like effector nucleases. *Nature Communications* [online]. 16 June 2015. Vol. 6. [Accessed 30 March 2016]. DOI 10.1038/ncomms8451. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4490371/> PMID: 26078220PMCID: PMC4490371
- KÖRMÖCZI, Günther F. and MAYR, Wolfgang R., 2014, Responder Individuality in Red Blood Cell Alloimmunization. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. November 2014. Vol. 41, no. 6, p. 446–451. DOI 10.1159/000369179. PMID: 25670932PMCID: PMC4280446

- KULKARNI, Swati, KASIVISWANATHAN, Vasantha and GHOSH, Kanjaksha, 2013, A simple diagnostic strategy for RhD typing in discrepant cases in the Indian population. *Blood Transfusion*. January 2013. Vol. 11, no. 1, p. 37–42. DOI 10.2450/2012.0006-12. PMID: 22871818PMCID: PMC3557475
- MAKROO, R. N., RAINA, Vimarsh, CHOWDHRY, Mohit, BHATIA, Aakanksha, GUPTA, Richa and ROSAMMA, N.L., 2010, Weak D prevalence among Indian blood donors. *Asian Journal of Transfusion Science*. July 2010. Vol. 4, no. 2, p. 137–139. DOI 10.4103/0973-6247.67030. PMID: 20859520PMCID: PMC2937297
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, Julio César, ARRAZOLA-GARCÍA, Araceli and SUÁREZ-CRUZ, América, 2007, La biología molecular y su aplicación en el Banco de Sangre. Una herramienta a nuestro alcance. *Medigraphic*. 2007. Vol. 143, no. 2, p. 43 – 51.
- MARTIN, Fábio O., DE MENEZES, Sidnéia S., CHIBA, Akemi K., LANGHI, Dante M., NARDOZZA, Luciano M. M., CHIATTONE, Carlos S. and BORDIN, José O., 2013, RHD gene polymorphisms in alloimmunized RhD-negative individuals with high rate of racial admixture. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*. February 2013. Vol. 48, no. 1, p. 113–116. DOI 10.1016/j.transci.2012.09.004. PMID: 23276724
- MILLER, R. D., 2010, *Anestesia + Exert Consult*. Elsevier España. ISBN 978-84-8086-713-9.
- MOTA, Mariza, DEZAN, M., VALGUEIRO, M.c., SAKASHITA, A.m., KUTNER, J.m. and CASTILHO, L., 2012, RHD Allelic Identification Among D–Brazilian Blood Donors as a Routine Test Using Pools of DNA. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1 February 2012. Vol. 26, no. 2, p. 104–108. DOI 10.1002/jcla.21489.
- MOUSSA, Hajer, GHOMMEN, Néjiba, ROMDHANE, Houda, ABDELKEFI, Saadia, CHAKROUN, Taher, HOUISSA, Batoul and JEMNI, Saloua Yacoub, 2014, (C)ces haplotype screening in Tunisian blood donors. *Blood Transfusion*. July 2014. Vol. 12, no. 3, p. 405–409. DOI 10.2450/2013.0153-13. PMID: 24333089PMCID: PMC4111823

MUÑIS DÍAZ, Eduardo, CANALS SURIS, C, MONTERO TEJEDOR, R and NOGUÉS GALVES, N, 2010, Importancia clínica de las variantes RH(D) en pacientes, donantes y gestantes. *XXI Congreso Nacional de la SETS_Programa Educativa*. 2010. P. 23 – 27.

MUÑIS DÍAZ, E, 2010, *Grupos Sanguíneos Eritrocitarios*.

MUÑIS DÍAZ, E., 2013, Indicaciones actuales para la transfusión de hematíes de fenotipo compatible. . 2013. Vol. 11, no. 1, p. 36 – 41.

MUÑIZ and GARGIULO, 2009, Identificación del factor Rh. *Congreso Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional*. Colombia. 2009.

OPS, 2009, Elegibilidad para la donación de sangre. *Organización Panamericana de la Salud*. 2009. P. 1 – 42. NLM WH460

ORLANDO, Nicoletta, PUTZULU, Rossana, MASSINI, Giuseppina, SCAVONE, Fernando, PICCIRILLO, Nicola, MARESCA, Maddalena, ZINI, Gina and TEOFILI, Luciana, 2015, Weak D Type 4.2.2 (DAR1.2) in an African child: Serology and molecular characterization. *Transfusion and Apheresis Science*. 1 April 2015. Vol. 52, no. 2, p. 217–219. DOI 10.1016/j.transci.2014.12.020. PMID: 25582272, 25582272

OUCHARI, Mouna, JEMNI-YAACOUB, Saloua, CHAKROUN, Taher, ABDELKEFI, Saida, HOUISSA, Batoul and HMIDA, Slama, 2013, RHD alleles in the Tunisian population. *Asian Journal of Transfusion Science*. 2013. Vol. 7, no. 2, p. 119–124. DOI 10.4103/0973-6247.115568. PMID: 24014941 PMCID: PMC3757771

PHAM, B.-N., ROUSSEL, M., GIEN, D., ANDRE-BOTTE, C., RIPAUX, M., AUXERRE, C. and LE PENNEC, P.-Y., 2013, Molecular analysis of patients with weak D and serologic analysis of those with anti-D (excluding type 1 and type 2). *Immunohematology / American Red Cross*. 2013. Vol. 29, no. 2, p. 55 – 62.

SANDLER, S. Gerald, ROSEFF, Susan D., DOMEN, Ronald E., SHAZ, Beth and GOTTSCHALL, Jerome L., 2014, Policies and procedures related to testing for weak D phenotypes and administration of Rh immune globulin: results and

recommendations related to supplemental questions in the Comprehensive Transfusion Medicine survey of the College of American Pathologists. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. May 2014. Vol. 138, no. 5, p. 620–625. DOI 10.5858/arpa.2013-0141-CP. PMID: 24786120

SOJO, J. and CHIRIBOGA, Rosa, 2013, *Identificación del fenotipo RH-HR en parejas que acuden a la unidad de fertilidad y esterilidad Clínica CONCEBIR* [online]. Quito : Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/7718>

ST-LOUIS, Maryse, RICHARD, Martine, CÔTÉ, Marie, ETHIER, Carole and LONG, Anne, 2011, Weak D type 42 cases found in individuals of European descent. *Immunohematology / American Red Cross*. 2011. Vol. 27, no. 1, p. 20–24. DOI 0894-203X. PMID: 22356482

STUDNIČKOVÁ, M., HOLUSKOVÁ, I., DURDOVÁ, V., KRATOCHVÍLOVÁ, T., STRAŠILOVÁ, P., MARKOVÁ, I. and LUBUŠKÝ, M., 2016, [Spontaneous antepartal RhD alloimmunization]. *Ceská Gynekologie / Česká Lékařská Společnost J. Ev. Purkyne*. December 2016. Vol. 80, no. 6, p. 401–404. PMID: 26741153

TORRES PADILLA, Juan and FERNÁNDEZ, Raúl, 2010, Propuesta para disminuir las causas y porcentajes de rechazo en el segundo banco de sangre más grande de México. *Medigraphic*. May 2010. Vol. 3, no. 1, p. S92–118.

WANG, Dehua, LANE, Catherine and QUILLEN, Karen, 2010, Prevalence of RhD Variants, Confirmed by Molecular Genotyping, in a Multiethnic Prenatal Population. *American Journal of Clinical Pathology*. 1 September 2010. Vol. 134, no. 3, p. 438 – 442. DOI 10.1309/AJCPSXN9HQ4DELJE. PMID: 20716800

XHETANI, Merita, SEFERI, Irena, FÉREC, Claude, ZORAQI, Grigor and FICHOU, Yann, 2014, Distribution of Rhesus blood group antigens and weak D alleles in the population of Albania. *Blood Transfusion*. October 2014. Vol. 12, no. 4, p. 565–569. DOI 10.2450/2014.0240-13. PMID: 24960662 PMCID: PMC4212038

9 ANEXO

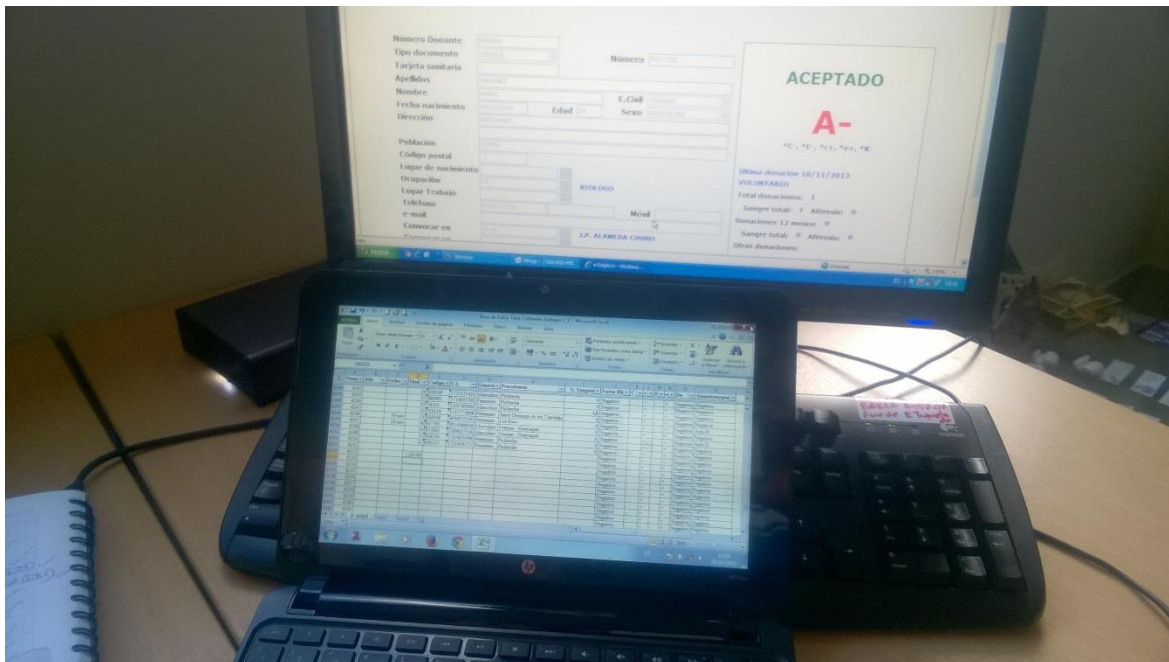
Anexo 1: Base de datos electrónica

Núm.	Año	Fecha	Edad	Código	C.I.	Género	Procedencia	G. Sanguin	Factor Rh	C	c	E	e	Du	Aloanticuerpos
1	2011	3-ene.	38	488556	1002108791	Masculino	Santo Domingo de los Tsachilas	A	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
2	2011	3-ene.	60	488850	1703559276	Femenino	Chimborazo	A	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Anti-D
3	2011	3-ene.	63	534677	1700013988	Femenino	Pichincha	0	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Anti-D
4	2011	3-ene.	57	488815	1703804177	Masculino	Loja	B	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
5	2011	3-ene.	40	348479	0501720767	Femenino	Cotopaxi	0	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
6	2011	3-ene.	55	400670	1704212156	Masculino	Pichincha	A	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
7	2011	3-ene.	54	205188	1704708500	Masculino	Pichincha	0	Negativo	+	+	-	+	Negativo	Negativo
8	2011	3-ene.	35	428459	1708770233	Femenino	Pichincha	0	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
9	2011	3-ene.	50	488975	1706295068	Masculino	Pichincha	A	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
10	2011	3-ene.	56	116108	1704185600	Femenino	Pichincha	0	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
11	2011	3-ene.	27	454078	1712108248	Femenino	Manabi	B	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
12	2011	3-ene.	25	489013	1311979395	Masculino	Manabi	0	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
13	2011	3-ene.	21	210949	1717764631	Masculino	Pichincha	B	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
14	2011	5-ene.	20	593437	1720209558	Masculino	Pichincha	0	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
15	2011	5-ene.	54	275342	1705164836	Femenino	Tungurahua	A	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
16	2011	5-ene.	54	993	1703628196	Femenino	Pichincha	A	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
17	2011	5-ene.	27	164168	1718454562	Masculino	Pichincha	AB	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo
18	2011	5-ene.	32	489247	1002587747	Femenino	Imbabura	0	Negativo	-	+	-	+	Negativo	Negativo

Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana

Anexo 3: Base de datos electrónica e-Delphyn del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana y hoja electrónica creada para la recolección de datos.



Autor: Catherine Gallegos

Fuente: Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana