

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO CLÍNICO

FRECUENCIA DEL ANTÍGENO Y ALOANTICUERPOS DEL
SISTEMA “DIEGO” EN DONANTES DE SANGRE DEL
HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA, 2015

GÓNGORA MARTÍNEZ FERNANDO BRYAN

DIRECTORA: Máster, Rosa Chiriboga Ponce.

QUITO, 2015

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, FERNANDO BRYAN GÓNGORA MARTÍNEZ, C.I. 1722432638; autor del trabajo de graduación intitulado: FRECUENCIA DEL ANTÍGENO Y ALOANTICUERPOS DEL SISTEMA “DIEGO” EN DONANTES DE SANGRE DEL HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA, 2015, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO 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.

FERNANDO BRYAN GÓNGORA MARTÍNEZ, C.I. 1722432638

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres que son los pilares fundamentales de la persona que soy ahora. A mi madre por ser la portadora de palabras de aliento, aquellas que aparecen espontáneamente y en el momento preciso, casi prediciendo la necesidad de escucharlas. A mi padre por su apoyo incondicional a través de los años, sin haber faltado una sola vez a su palabra y regalándome un ejemplo vivo de motivación, superación y liderazgo. Y finalmente a Dios, por regalarme y permitirme llenar esta curiosidad innata con un profundo y sincero amor por la ciencia.

Fernando Bryan Góngora Martínez

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi directora de disertación Rosita Chiriboga P. por su entera dedicación e interés brindado en este trabajo, gracias por convertirse en este largo proceso académico y mantenerse semestre tras semestre, en no solo uno de los mejores ejemplos de docencia que se quedan en mí, sino en una verdadera amiga. Mi más sincero agradecimiento por su tiempo y el apoyo dispuesto de su parte para completar esta meta.

Al Hemocentro Nacional de la Cruz Roja, y al Dr. Marco Herdoiza en su representación, por abrirme las puertas de sus instalaciones y acogerme siempre con la mejor predisposición durante el tiempo correspondiente a la fase práctica de este estudio, así mismo al personal de la institución con quienes tuve el placer de trabajar, gracias por su siempre amable colaboración y paciencia dentro de este proceso.

A mis maestros, y compañeros de la Escuela de Bioanálisis que hicieron de la carrera una oportunidad única e invaluable para crecer en la ética como persona, como ser humano y principalmente como profesional.

A mis amigos, verdaderos hermanos que hicieron de un camino probablemente largo y pesado, un proceso inolvidable de risas y alegrías que estuvieron ahí, siguen ahora y seguirán para siempre con nosotros. Son parte de los mejores momentos de mi vida.

A mis padres por toda la confianza y el apoyo emocional y económico, gracias porque sin ustedes nada de esto sería posible, mi mayor motivación será siempre ser para ustedes su ejemplo de satisfacción y orgullo.

A Dios, por regalarme oportunidades únicas, permitirme aún disfrutar de mis padres y familiares, y poner en mi camino amigos, compañeros, maestros, y demás personas valiosas.

RESUMEN

Frecuencia del antígeno y aloanticuerpos del sistema “Diego” en donantes de sangre del Hemocentro de la Cruz Roja, 2015.

Introducción: El sistema Diego es un sistema sanguíneo irregular que forma parte de los 600 grupos sanguíneos identificados por la International Society of Blood Transfusion (ISBT), su descubrimiento fue en un recién nacido de origen latino que falleció por una enfermedad hemolítica de etiología desconocida, y que posteriormente se identificó como un sistema sanguíneo nuevo que se encuentra íntimamente relacionado con reacciones transfusionales inmediatas y con Enfermedad Hemolítica el Recién Nacido. Actualmente se conocen 22 antígenos dentro de este sistema sanguíneo de los cuales los antígenos Di^a y Di^b son considerados inmunógenicos. Del mismo modo la distribución geográfica del sistema Diego, específicamente del antígeno Di^a, es mayormente en la población asiática mongoloide y en las poblaciones étnicas de América Latina por lo que se evidencia la importancia de conocer la incidencia de este sistema sanguíneo como de sus aloanticuerpos dentro de nuestra población, partiendo de que en Ecuador existe un alto porcentaje de población indígena y de la no existencia de estudios sobre la prevalencia de antígenos y aloanticuerpos del sistema Diego. **Materiales y Métodos:** Es un estudio descriptivo de corte transversal que determinó la frecuencia de antígeno Diego Di^a y su aloanticuerpo anti-Di^a en la población de donantes voluntarios de sangre que aducen a los servicios de bancos de sangre de la Cruz Roja Ecuatoriana alrededor de todo el país, concentrándose directamente en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana. Se aplicó muestreo aleatorio simple con 383 donantes para la determinación de antígeno y anticuerpo respectivamente, los cuales fueron analizados mediante la técnica de aglutinación en tubo utilizando células comerciales Di^a positivas y anticuerpos monoclonales anti-Di^a. **Resultados:** Se incluyeron en el estudio 22 provincias del territorio nacional y se obtuvo una prevalencia para antígeno Diego Di^a positivo en donantes de sangre del 25 % y una incidencia del 6,09 % de aloanticuerpos anti-Di^a. **Conclusiones y Recomendaciones:** La distribución de la frecuencia de antígenos y aloanticuerpos del sistema Diego es casi uniforme dentro de la población de nuestro país causado probablemente por ser un territorio con alto grado de mestizaje, por lo que es de vital importancia la implementación de la detección de este sistema sanguíneo y su inclusión dentro de los protocolos de identificación de antígenos y anticuerpos irregulares en los bancos de sangre del Ecuador para prevenir reacciones transfusionales y reacciones hemolíticas materno fetales.

ABSTRACT

Frequency of antigen and alloantibodies of the "Diego" blood group in blood donors from the Blood Center of the Ecuadorian Red Cross, 2015.

Introduction: The Diego system is an irregular blood group which is part of the 600 blood groups identified by the ISBT, its discovery starts when a latin new born dies by hemolytic disease of unknown etiology, later it was determined as a new blood system that is closely related to immediate hemolytic transfusion reactions and Hemolytic Disease of the New Born. Nowadays there are 22 antigens as part of this blood system which of the Di^a and Di^b are considered as immunogenic antigens. Similarly the geographical distribution of Diego system, specifically the antigen Di^a , is clearly marked in the Mongoloid Asian populations and ethnic populations in Latin America then the importance of knowing the incidence of this blood group and their alloantibodies inside our town, assuming that in Ecuador there are a large ethnic population, and there are not studies about the Diego blood group. **Materials and Methods:** This study is a descriptive cross-sectional study which presents the frequency of antigen Diego Di^a and its alloantibody anti- Di^a inside the population of volunteer donors who are attending in the net of blood banks of the Ecuadorian Red Cross around the country, focusing specifically on the Blood Center of the Ecuadorian Red Cross. Applying simple random sampling there were 383 donors selected for the determination of antigen and antibody respectively, which were analyzed using the manual tube agglutination technique using positive Di^a commercial cells and anti- Di^a monoclonal antibodies. **Results:** The study included a total of 22 provinces of the country, showing a prevalence of Diego antigen Di^a of 25% and an incidence of 6.09% obtained for the presence of alloantibodies anti- Di^a in blood donors. **Conclusions and Recommendations:** The frequency distribution of antigens and alloantibodies from the Diego blood group is almost uniform in the population of our country probably caused by being a territory with a high incidence of miscegenation, then it becomes vitally important the implementation of this blood system inside the protocols of antigen and irregular antibodies identification in Ecuadorian blood banks in order to collaborate with the preventive diagnosis of hemolytic transfusion reactions and HDNB.

TABLA DE CONTENIDOS

Declaración y autorización	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Resumen	iv
Abstract	v
CAPÍTULO I.....	11
1.1 Justificación.....	11
1.2 Planteamiento del problema.....	13
1.3 Objetivos	14
1.3.1 Objetivo general.....	14
1.3.2 Objetivo específicos.....	14
1.3.3 Limitación del estudio	14
CAPÍTULO II.....	15
2.1 Marco teórico y conceptual.....	15
2.1.1 Antecedentes.....	15
2.2 Marco teórico	17
2.2.1 Sistema sanguíneo Diego.....	17
2.2.2 Sistema Diego como marcador antropológico.....	18
2.2.3 Bases estructurales	18
2.2.4 Bases genéticas del sistema Diego	19
2.2.5 Antígenos del sistema Diego.....	22
2.2.6 Anticuerpos anti-Diego.....	24
2.2.7 Clínica del sistema Diego.....	26
2.2.7.1 Reacciones Transfusionales asociadas a la inmunización por antígenos del sistema Diego.....	26
2.2.7.2 Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido asociada al sistema Diego.....	27
2.2.8 Método de detección de antígenos y aloanticuerpos del sistema Diego.....	28

2.2.8.1 Aglutinación en tubo, reacción antígeno-anticuerpo <i>in vitro</i>	28
2.2.8.2 Microaglutinación o técnica en gel	28
2.2.8.3 Detección de antígenos del sistema Diego por métodos de biología molecular.....	29
2.2 Marco conceptual.....	30
CAPÍTULO III.....	32
3.1 Marco metodológico	32
3.1.1 Materiales y métodos.....	32
3.1.1.1 Tipo de Estudio.....	32
3.1.1.3 Tamaño de Muestra.....	32
3.1.1.4 Criterios de Inclusión.....	33
3.1.1.5 Criterios de Exclusión	33
3.1.1.6 Análisis Estadístico	33
3.2 Operacionalización de variables.....	33
3.2.1 Variable dependiente	33
3.2.2 Variable independiente	33
3.3 Materiales y proceso	35
3.3.1 Materiales	35
3.3.2 Reactivos.....	35
3.3.3 Control de calidad.....	35
3.3.3.1 Control de calidad de los reactivos anti-Di ^a	36
3.3.3.2 Control de calidad de Células Diego Di ^a	37
3.4 Procedimiento	37
3.4.1 Fase Uno.....	37
3.4.2 Fase Dos.....	37
3.4.3 Fase Tres.....	37
3.4.4 Fase Cuatro.....	38
CAPÍTULO IV	39
4.1 Resultados determinación de antígeno Di ^a	39

4.1.1 Descripción de la población de estudio para la determinación de antígeno.....	39
4.1.2 Determinación de la prevalencia de antígeno en donantes de sangre.	40
4.1.3 Determinación de la presencia de antígenos Di ^a de acuerdo a la procedencia	40
4.1.4 Presencia de antígeno Di ^a de acuerdo a la procedencia, edad y género.....	41
4.2 Resultados determinación de aloanticuerpos	43
4.2.1 Descripción de la población de estudio para la determinación de aloanticuerpos	43
4.2.2 Determinación de la prevalencia de aloanticuerpos en donantes de sangre. ...	44
4.2.3 Presencia de aloanticuerpos anti-Di ^a de acuerdo a la procedencia, edad y género.	46
4.3 Discusión.....	48
4.4 Conclusiones.....	51
4.5 Recomendaciones.....	52
Bibliografía	53
Anexos	59

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Antígenos del Sistema Diego.

Tabla N°4.1: Presencia de aloinmunización por el antígeno Di^a en donantes de diferentes provincias

Tabla N°4.2: Presencia de aloanticuerpo Di^a en donantes de sangre de acuerdo al género

Tabla N°4.8: Presencia de aloanticuerpo Di^a en donantes de sangre de acuerdo al grupo etario

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfica N°4.1: Total de donantes de sangre que participaron en la determinación de antígeno Diego por provincia

Gráfica N°4.2: Porcentaje de donantes que presentan el antígeno Diego

Gráfica N°4.3: Distribución porcentual del antígenos Di^a en donantes de sangre de acuerdo a la procedencia

Gráfica N°4.4: Distribución porcentual del antígenos Di^a en donantes de sangre de género femenino y grupo etario

Gráfica N°4.5: Distribución porcentual del antígenos Di^a en donantes de sangre de género masculino y grupo etario

Gráfico N°4.6: Distribución porcentual de donantes de sangre que participaron en el estudio de acuerdo a la procedencia

Gráfico N°4.7: Porcentaje de donantes de sangre de acuerdo al género

Gráfica N°4.8: Porcentaje de donantes aloinmunizados por provincia

LISTA DE FIGURAS

Figura N°1: Representación de la banda 3 en la membrana eritrocitaria

Figura N°2: Cromosoma 17 gen SLC4A1

Figura N°3: Polimorfismo de la expresión del antígeno Di

Figura N°4: Polimorfismo de la expresión del antígeno Wr

Figura N°5: Distribución de los antígenos del sistema Diego en Banda 3

Figura N°6: Patrones de lectura para la técnica de aglutinación en gel

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Hoja del donante, incluye consentimiento informado

Anexo 2: Muestreo Aleatorio simple calculado en excel, ejemplo n=100

Anexo 3: Protocolo de control de calidad de células Diego y antisuero Diego

Anexo 4: Reactivos de Identificación para el sistema Diego Di^a e insertos

Anexo 5: Procesamiento de muestras

Anexo 6: Control de calidad de reactivos Anti-Di^a

LISTA DE SIGLAS

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

EHRN: Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido

HDNB: Hemolytic Disease of the New Born

ISBT: International Society of Blood Transfusion

CD: Cúmulo de Diferenciación

SLC4A1: Solute Carrier Family 4 (anion exchanger), Member 1

NCBI: National Center of Biotechnology Information

IgM: Inmunoglobulina de clase M

IgG: Inmunoglobulina de clase G

CGR: Concentrado de Glóbulos Rojos

AHG: Anti Human Globulin

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

LISS: Low Ionic Strength Saline

AABB: Asociación Americana de Bancos de Sangre

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético

IgG1: Inmunoglobulina G de tipo 1

IgG3: Inmunoglobulina G de tipo 3

INTRODUCCIÓN

El antígeno o factor Diego dentro de la clasificación de los grupos sanguíneos ocupa el décimo lugar de descubrimiento entre los antígenos eritrocitarios (Soyano & Müller, 2014), a partir de este hallazgo realizado por Miguel Layrisse y Tuli Arends tomó importancia la identificación de este antígeno realizándose varios estudios principalmente en grupos indígenas de población venezolana y caribeña encontrándose una frecuencia del 35,54%, esto puso en alerta a los países latinoamericanos de la existencia de un nuevo antígeno eritrocitario capaz de provocar la producción de anticuerpos que ocasionan una enfermedad hemolítica del recién nacido (Geoff D. , 2013) (Soyano & Müller, 2014).

Estudios posteriores demostraron que el antígeno Diego Di^a a pesar de presentar una baja incidencia en la población caucásica puede producir aloinmunización y desarrollo de anticuerpos anti-Di^a que ocasionan reacciones hemolíticas postransfusionales (Park, y otros, 2003). Una de las características particulares de este anticuerpo es que puede estar presente como una respuesta inmune o de forma natural y ocasionar una reacción hemolítica inmediata. Un caso reportado en la literatura relacionado con reacción postransfusional ocasionada por este anticuerpo fue en el trasplante de hígado entre un donante Di^a positivo y un receptor con aloanticuerpos anti-Di^a que ocasionó una reacción hemolítica pos trasplante, otro de los problemas enfrentados en este caso clínico fue obtener sangre libre del antígeno Di^a, por ser un antígeno frecuente en la población (Futagawa, y otros, 2013). Todas las investigaciones relacionadas con este antígeno proporcionan las bases científicas para la inclusión de su identificación en las pruebas rutinarias de tipificación sanguínea y las pre-transfusionales especialmente en poblaciones con prevalencias significativas y población indígena. En Ecuador, el INEC establece que existe una elevada incidencia de población indígena aproximadamente un millón de habitantes, lo que determina que el 7% de la población es considerada como población étnica (INEC, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2010), por lo tanto debe ser considerada la detección rutinaria del antígeno Diego especialmente en mujeres en edad fértil y antes de una transfusión sanguínea.

Investigaciones han establecido que el antígeno Diego forma parte de una proteína de la membrana de los eritrocitos que representa el 25% del total de proteínas eritrocitaria, es por esta razón que hoy es uno de los antígenos que debe ser identificado en poblaciones con prevalencias altas. (Geoff D, 2013).

Este estudio determinó una prevalencia del 25% de antígeno Di^a distribuido en 22 provincias y de forma similar en hombres y mujeres. Así también se identificó una frecuencia del 6,09% de aloinmunización por el antígeno Di^a existiendo una mayor prevalencia en la provincia de Manabí. Estos datos demuestran la necesidad de que los bancos de sangre deben incluir en las pruebas pretransfusionales células que contengan el antígeno Diego ya que actualmente las células adquiridas comercialmente carecen de este antígeno, probablemente debido a esto es que existe un importante número de aloanticuerpos reportados como indeterminados o no identificados.

Por otro lado la distribución de donantes positivos para Di^a se encuentran en las provincias de Pichincha, Manabí y Loja, mientras que los donantes portadores de anticuerpos anti-Di^a se localizan en mayor porcentaje en la provincia de Manabí, este dato debe ser investigado en estudios posteriores para establecer las principales causas de esta aloinmunización.

Una de las sugerencias al Ministerios de Salud Pública es la revisión y cambio de la normativa de seguimiento a mujeres embarazadas especialmente en la determinación del grupo sanguíneo como herramienta para la prevención de la enfermedad hemolítica del recién nacido, en este estudio se estableció que el 6,30% (7/111) mujeres se encuentran aloinmunizadas. Es importante enfatizar que los anticuerpos anti-Di^a generalmente son de tipo IgG1 que atraviesa fácilmente la placenta constituyendo un riesgo durante el embarazo para el desarrollo de enfermedad hemolítica del recién nacido (Geoff & Bromilow, 2010).

Los datos obtenidos en este estudio servirán como una base para alertar al Sistema Nacional de Sangre de la existencia del factor Diego y sus futuras implicaciones en las reacciones transfusionales y enfermedad hemolítica del recién nacido.

CAPÍTULO I

1.1 JUSTIFICACIÓN

En una población que se encuentra íntima y antropológicamente relacionada con Venezuela y otros países latinos y en los que se ha evidenciado la presencia de diferentes sistemas sanguíneos, es necesario conocer la prevalencia de antígenos eritrocitarios, entre ellos los relacionados al sistema sanguíneo Diego, más cuando se conoce que la prevalencia de este sistema sanguíneo en Latinoamérica es del 36%, incidencia claramente marcada en relación a la prevalencia mundial la cual se encuentra focalizada en las poblaciones nativas americanas con una incidencia del 11%; 5% para población china, 12% de incidencia para la población japonesa y hasta 14,5% para la población coreana; en contraste, en la población africana y caucásica de Europa la presencia del sistema Diego es casi nula. (Park, y otros, 2003) (Baleotti, y otros, 2014)

Adicionalmente se ha alertado que estos antígenos son inmunógenos y están relacionados con la producción de aloanticuerpos causantes de enfermedades transfusionales y muerte por enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), (Silva, George, & Hirtsch, 2004) (Mun & Lee, 2012), por lo que resulta de vital importancia el escrutinio tanto del antígeno como del anticuerpo para conocer, a más de su prevalencia, la correlación entre la población donante portadora de los antígenos y aquella que resulta población de riesgo para desarrollar trastornos hematológicos fatales por EHRN (Mun & Lee, 2012).

Muchas veces la aloinmunización por antígenos eritrocitarios del sistema “Diego” pasa desapercibido, y no es hasta que se presenten reacciones transfusionales o hemólisis fatales en neonatos, cuando se determina su existencia en aquellos pacientes involucrados, abriendo así la duda sobre qué porcentaje de la población se encuentra expuesta a estos antígenos de manera desconocida. (Lopez & Cortina, 2000) (Park, y otros, 2003) (Mun & Lee, 2012).

Otro aspecto para incluir al sistema Diego en las pruebas de detección de aloanticuerpos en donantes de sangre y pacientes multitransfundidos, es la falta de identificación del tipo de aloanticuerpo, los análisis realizados por Ulloa en el estudio retrospectivo de anticuerpos irregulares en donantes de sangre se estableció que existe un 10% de donantes portadores de aloanticuerpos clasificados como “no determinados” (Ulloa & Chiriboga, 2012), es importante que sean identificados para de esa manera evitar una transfusión no compatibles y sobretodo comunicar al donante que tipo de anticuerpos es

portador especial en mujeres en edad fértil, una de las posibles causas de la falta de identificación es la utilización de células panel que carecen del sistema Diego.

Actualmente el sistema de salud ecuatoriano no ha realizado investigaciones de antígeno eritrocitario Diego como parte del plan de prevención de EHRN y reacciones transfusionales dejando de lado de manera errónea el estudio de este sistema sanguíneo tanto por la disponibilidad de los reactivos para determinación en gel como por los elevados costos de los kits de diagnóstico moleculares por ello la aglutinación en tubo es la técnica más utilizada como método de detección, ya que permite correlacionar los signos clínicos, con la presencia de antígenos y/o anticuerpos tipo "Diego". (Luna, 2005) (Wei, Al-Hassan, Naim, & Knight, 2013) (Marín & Duarte, 1997).

Aplicando técnicas in vitro es factible determinar cuál es la frecuencia de antígenos eritrocitarios y anticuerpos irregulares en la población de donantes que acuden al Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana y contribuir con datos que permitan prevenir aloinmunizaciones futuras, así como el diagnóstico oportuno de una enfermedad hemolítica fatal; también ayudará a la concientización y aplicación de nuevas pruebas dentro del medio transfusional.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El antígeno Diego es un inmunógeno eritrocitario irregular cuya presencia induce a la producción de aloanticuerpos con importante significancia clínica ya que dichas inmunoglobulinas se ven involucradas en procesos de enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) así como en reacciones transfusionales tardías (Mun & Lee, 2012) (Bhutani, y otros, 2013).

Dentro de este sistema sanguíneo se encuentran 22 antígenos de los cuales el Di^b y el Wr^b son considerados de alta frecuencia mientras que los antígenos Di^a y el Wr^a presentan baja frecuencia, siendo de importancia clínica los antígenos Di^a y Di^b por ser los principales involucrados en reacciones transfusionales y aloinmunización. (Trujillo, 2012) (Mun & Lee, 2012) (Geoff D. , 2013).

En cuanto a la EHRN, según la Fundación Internacional de Investigación Pediátrica en 2013, afirma que la prevalencia de dicho trastorno es del 22% a nivel global, de los cuales 7% corresponden a casos reportados en Latinoamérica (Bhutani, y otros, 2013). Sin embargo se especifica que el 78% de los casos corresponden a incompatibilidad por el sistema Rh sin determinar cuántos casos se deben a otros sistemas sanguíneos, entre ellos el sistema Diego; Venezuela en 1953 (Gottlieb,1971) reportó el primer caso de EHRN y otros países como México reportan sensibilización en el embarazo por anticuerpos anti-Diego. (Bhutani, y otros, 2013)

En Ecuador, la información de la presencia de antígenos y aloanticuerpos del sistema Diego se desconoce, y más aún cuando se trata sobre estudios de prevalencia de dicho sistema, en el cual la información resulta casi nula, de la misma manera se desconoce la incidencia de casos de EHRN causado por sistemas sanguíneos irregulares, por lo que cabe la interrogante sobre la frecuencia con que se presenta este sistema sanguíneo en el país tomando en cuenta que la población no es de manera significativa ni antropológicamente diferente al resto de la población latina del continente. Adicionalmente en el campo transfusional se ha dado mayor importancia a las reacciones producidas por antígenos del sistema ABO y Rh dejando de lado de manera errónea las reacciones producidas por antígenos irregulares entre ellos los del sistema Diego. (Bhutani, y otros, 2013) (Marin y Duarte, 1997).

Pregunta de Problema: ¿Qué influencia tendrá la determinación de la frecuencia de antígeno y anticuerpos del sistema Diego sobre la población materno-neonatal y la medicina transfusional ecuatoriana?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de antígenos y aloanticuerpos del sistema “Diego” en donantes de sangre del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana mediante método de aglutinación en tubo.

1.3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Establecer la frecuencia del antígeno Diego en donantes de sangre del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana durante los meses de junio 2014 a mayo 2015.
- Determinar la frecuencia de aloinmunización por el antígeno Diego en la población de donantes del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana durante los meses de junio 2014 a mayo 2015.
- Relacionar la presencia del antígeno Diego con la procedencia, edad y género del donante de sangre como factores predisponentes.
- Relacionar la presencia del aloanticuerpo Diego con la procedencia, edad y género del donante de sangre para la identificación de aloinmunización

1.3.3 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Una de las limitaciones del estudio constituye las dificultades en la importación de reactivos para la determinación de los antígenos del sistema Diego debido a las restricciones impuestas en el país y la falta de fabricación del anti-Di^o.

Otra limitación constituye la escasa información científica actualizada por lo que se han utilizado publicaciones con una antigüedad mayor de 5 años.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1.1 ANTECEDENTES

En 1982 se reportó la muerte de un recién nacido por enfermedad hemolítica severa, a su madre, de origen japonesa, no se le detectó en el periodo prenatal la presencia de anticuerpos irregulares anti-Di^a por tratarse de un anticuerpo raro en la población, este caso fue publicado por Alves de Lima y lo menciona Silva, George y Hirtsch en su publicación en el año 2004. (Silva, George, & Hirtsch, 2004).

En el año 2003, Hundric-Haspl describen el caso de un niño de 3 semanas de nacido con anemia hemolítica causada por el aloanticuerpo anti-Di^a, la madre era portadora de un antígeno Di^a negativo mientras que el padre fue Di^a positivo, a pesar de ser considerado de baja prevalencia en la población de estudio, se demostró la capacidad antigénica que posee este antígeno para producir EHRN (Hundric-Haspl & Sanja Balen-Marunic, 2003). Un estudio publicado en Brasil, refuerza el argumento de que debe introducirse el tamizaje de anticuerpos anti-Diego en estudios prenatales de forma rutinaria, debido a que existe un aumento en los casos de enfermedad hemolítica del recién nacido por el sistema Diego (Nardoza, y otros, 2007). Otro antígeno del sistema Diego e identificado como causante de la enfermedad hemolítica del recién nacido fue el anti-Wr^a igualmente considerado de baja prevalencia en la población en general (Squires, y otros, 2012), sin embargo fue identificado como el causante de una reacción hemolítica inmune.

Thompson, Childers y Hatcher en el año de 1967 descubrieron el anticuerpo contra el segundo antígeno del sistema Diego (Di^b), en dos indígenas de origen mexicano, debido a una reacción hemolítica postransfusional con pruebas cruzadas compatibles (Arreygue Avila, 2011). Martínez Álvarez y sus colaboradores afirman en su investigación que se han detectado 4 casos con Diego positivo en la ciudad de México, durante un periodo de 10 años especialmente en pacientes con un amplio registro de transfusiones, y en dos casos analizados se demostró la presencia de anticuerpos anti-Diego positivos en un periodo de hasta 17 años. (Martínez, y otros, 2009).

Estudios han demostrado que el antígeno Di^a es de baja incidencia entre la población caucásica (0,01%); sin embargo es elevada entre los indios americanos y población de

Asia, Mongolia; indígenas sudamericanos, chinos y japoneses; también se ha encontrado una prevalencia entre el 8,2 al 14,7% en mexicanos-americanos; y el 22% en indígenas mayas de Guatemala. (Park, y otros, 2003) (Gutiérrez, Lanz, Pérez Minera, & Castellanos, 2013). En contraste, en donantes de sangre de Estados Unidos no se identificaron antígenos del sistema Diego en la raza blanca y negra, otras investigaciones también han establecido que no existe el antígeno Di^a en individuos esquimales y polinesios (Park, y otros, 2003). En base a estos resultados se definió al antígeno Diego como “Factor Indígena” ó “Factor Mongólico” por lo que fue utilizado como marcador antropológico.

Los antígenos del grupo sanguíneo Diego están adquiriendo un papel fundamental en transfusión sanguínea, en la enfermedad hemolítica del recién nacido y en trasplante de órganos, así se reportaron dos casos de trasplante de hígado de un donante Di^a positivo a un receptor con anticuerpos anti-Di^a los que ocasionaron una leve elevación de bilirrubinas con una reacción hemolítica inmediata pero al final no se observó una reacción inmune humoral o celular, por lo que el procedimiento resultó exitoso, a pesar de la dificultad de encontrar concentrados globulares libres de antígeno Diego. Sin embargo en trasplantes renales debe ser considerada la identificación de antígenos y anticuerpos del sistema Diego, debido a que la proteína Banda 3 está presente en los túbulos renales (Sawada, y otros, 2007) (Futagawa, y otros, 2013).

Es así, que a raíz de estos estudios se afirmó la existencia de aproximadamente 22 antígenos eritrocitarios dentro de este sistema sanguíneo dato sustentado en el Reporte de Terminología de Grupo Sanguíneo emitido en el año 2004 por la ISBT, Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea, (Trujillo, 2012). En Ecuador no se conoce hasta la fecha la presencia del antígeno Diego y sus subtipos en la población.

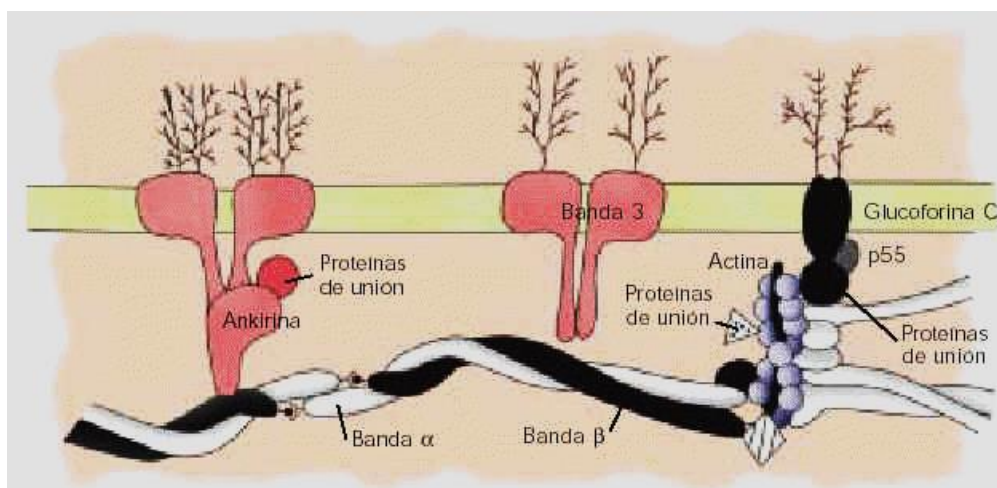
2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Sistema sanguíneo Diego

El Sistema Diego ocupa la décima posición en el sistema de grupos clasificados de acuerdo con la Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre (ISBT), compuesto principalmente por dos pares de antígenos denominados Di^a/Di^b y Wr^a/Wr^b ; la característica de estos antígenos es que están constituidos por uno de baja incidencia y otro de alta incidencia (Park, y otros, 2003) (Geoff D. , 2013).

Además de estar involucrado en reacciones transfusionales y enfermedad hemolítica del recién nacido, los avances moleculares permitieron determinar que el antígeno Diego forma parte de la proteína de membrana de eritrocitos conocida como banda 3 o AE1 por sus siglas en inglés, Anión Exchanger membrer 1, y su participación en el transporte de aniones e intercambio de cloro (Cl^-) por bicarbonato (HCO_3^-) es clave, por lo que la deficiencia de esta proteína produce trastornos como: esferocitosis hereditaria y acidosis tubular renal. (Soyano & Müller, 2014). (Figura N°1)

Figura N°1. Representación de la banda 3 en la membrana eritrocitaria



Autor: Ortega, 2004

Fuente: Anemias Hemolíticas

El gráfico muestra las proteínas integrantes: banda 3; glucoforina C (GPC).

2.2.2 Sistema Diego como marcador antropológico

El descubrimiento clínico del sistema Diego abrió otra puerta hacia el estudio antropológico del mismo ya que los antígenos de este sistema sanguíneo son característicos y frecuentes en poblaciones específicas, es así que el antígeno Di^a por ejemplo, es frecuente en la población mongoloide propia del sudeste asiático, y su prevalencia en la población americana se la explica por los factores migracionales de dicha población a través del estrecho de Bering (Daniels, 2002) (Soyano A. &, 2014).

De la misma manera este antígeno es poco frecuente en la población europea en la cual el antígeno predominante es el Di^b, mientras que en la población de raza negra y caucásica la presencia de antígenos del sistema Diego es casi nula. (Trujillo, 2012) (Wei, Al-Hassan, Naim, & Knight, 2013). Es evidente que ha existido un marcado mestizaje en todas las poblaciones a nivel mundial, al ser este sistema específico de ciertas poblaciones se ha podido determinar factores migratorios principalmente hacia el continente americano donde el porcentaje de prevalencia de los antígenos de este sistema es del 12% a nivel de la población india México-americana. Además el descubrimiento de este sistema por primera vez en Caracas, ciudad de Sud América, permitió que se determine la incidencia de este sistema en Venezuela, presentando una frecuencia del 29%. Otros países de Sudamérica han sido objeto antropológico de estudio determinándose así la presencia de este sistema sanguíneo en poblaciones indígenas de Perú, Chile y Argentina así lo menciona Trujillo en su compendio publicado en 2012. (Trujillo, 2012).

2.2.3 Bases estructurales

Los antígenos del sistema Diego son de tipo eritroide, se encuentran localizados en la banda 3 del eritrocito que es también conocida como CD 233 o AE1 (anión transporter 1) (Klaus, 2009), esta es una proteína transmembrana que se encuentra multiplicada hasta por un millón de unidades a lo largo de la membrana del eritrocito por lo que comprende aproximadamente el 25 % del balance proteico de las células rojas. (Lin, Pavenski, Saldenberg, & Branch, 2009) (Trujillo, 2012) (Buevas Cortés, A., Muñoz-Díaz, E., & León de González, G, 2014). Estructuralmente la banda 3 contiene 911 aminoácidos distribuidos en tres dominios, un dominio N-terminal, un dominio transmembranal de carácter hidrofóbico y un dominio C-terminal de origen citoplasmático, cada uno de ellos constituido por 403, 479 y 29 aminoácidos respectivamente. Se conoce que sobre esta

banda del eritrocito se encuentran los antígenos del sistema Diego, principalmente los antígenos NFLD, ELO, Fr^a, Rb^a, WARR, Vg^a, Wd^a, Wd^b, BOW/NFLD, Wu, Jn^a,/KREP, Bp^a, Sw^a/SW1, Hg^a/Mo^a, Wr^a/Wr^b, Di^a/Di^b, DISK. (Trujillo, 2012) (Jarolim, 1998).

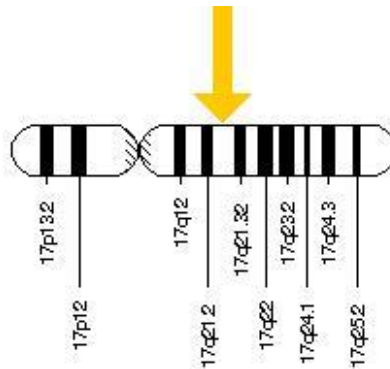
La importancia clínica de la estructura de la banda 3 y su correlación con los antígenos del sistema Diego se basan en que dicha banda del eritrocito se encuentra en varios procesos fisiológicos encontrándose relacionada directamente con la función renal, debido a que la porción citoplasmática de la misma regula la expresión del dióxido de carbono mediante el intercambio de cloro y bicarbonato, además esta proteína transmembranal es la responsable de los procesos de senescencia y destrucción de las células rojas y del mismo modo está involucrada en las vías glicolíticas del metabolismo del eritrocito y procesos hemocrómicos, por ello es que una alteración de dicha banda resulta en la aparición de varios fenotipos antigénicos que conllevan a estados patológicos, (Tabla 1). (Lin, Pavenski, Saidenberg, & Branch, 2009) (Futagawa, y otros, 2013).

2.2.4 Bases genéticas del sistema Diego

La genética de los antígenos del sistema Diego está ligada al gen SLC4A1 (Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger Member 1) el mismo que a su vez está implicado en la expresión de la banda 3 del eritrocito así lo determinó Spring y sus colaboradores en el año de 1992 cuando, mediante electroforesis, se encontró que en los eritrocitos Di^a positivos existía la variante Memphis II en la banda 3, aunque nunca se determinó que todos los hematíes con la banda 3 variante Memphis fuesen Di^a positivos (Junquería, 2002) (Soyano & Müller, 2014).

A partir de este descubrimiento se asocia la expresión del sistema Diego al cromosoma 17, específicamente en el locus q12-q21, esto mediante la secuenciación y la clonación del gen SLC4A1.(Figura N°2). Al aplicar esta metodología se dieron a conocer también las bases moleculares del gen, se sabe que está constituido por 19 intrones y 20 exones de los cuales 5 son los involucrados en la codificación de variantes fenotípicas de los antígenos del sistema Diego. (Baleotti, 2003) (Geoff D. , 2013)

Figura N°2. Cromosoma 17 SLC4A1 gene7



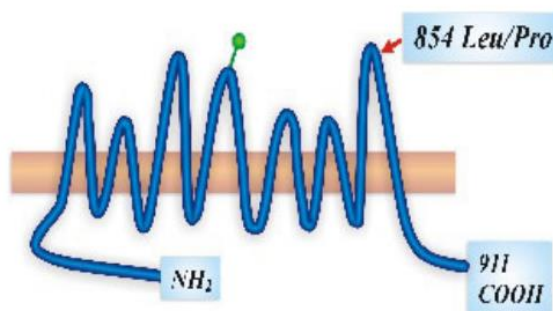
Autor: Genetics home reference, 2015

Fuente: National Library of Medicine

Localización del gen SLC4A1 en el cromosoma 17: posición 21.31

El estudio molecular del gen codificante de la banda 3 se logró determinar la mutación causante de la expresión de los antígenos del sistema Diego, es así que para el antígeno Di^a positivo la causa es una mutación simultánea que se basa en la sustitución de nucleótidos de citosina por timina en la posición 2561, que desencadena la expresión de leucina por prolina, mientras que en los individuos Di^b positivos, no hay cambio en la citosina de posición 2561 lo que determina que el aminoácido 854 siga siendo prolina (Figura N°3). (Daniels, 2002) (Geoff D. , 2013).

Figura N°3. Polimorfismo de la expresión del antígeno Di



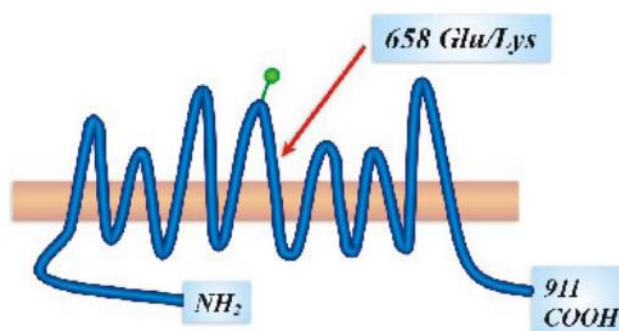
Autor: Costa Nuñez, 2004

Fuente: Estudio del polimorfismo del Sistema Diego

Gráfico muestra el polimorfismo entre el Di^a y Di^b en la banda 3: 854 leucina causante de la expresión del antígeno Di^a y prolina del Di^b. Fuente: (Costa Nunes da Cunha Cozac, 2004).

Los antígenos del par W_r ($a+$, $b+$) deben su expresión a una mutación en la cuarta porción proteica correspondiente a los aminoácidos extracelulares, siendo así que la expresión de los antígenos W_r^a y W_r^b está condicionada al cambio del aminoácido de posición 658 siendo este lisina por el ácido glutámico. En cuanto a la variante Memphis la sustitución es de una adenina por una base guanídica en la posición 166 del exón 4, lo que desencadena en la codificación de ácido glutámico en lugar de lisina en la posición 56 del dominio N-terminal, porción citoplasmática. (Junquería, 2002) (Buelvas Cortés, A., Muñiz-Díaz, E., & León de González, G, 2014) (Figura N°4) (Trujillo, 2012)

Figura N°4. Polimorfismo de la expresión del antígeno W_r



Autor: Costa Nuñez, 2004

Fuente: Estudio del polimorfismo del Sistema Diego

Gráfico muestra el polimorfismo entre el W_r^a y W_r^b en la banda 3: 658 lisina causante de la expresión del antígeno W_r^a y ácido glutámico del W_r^b

Existe una amplia expresión de los alelos codificantes de los antígenos del sistema Diego, de tal manera que la frecuencia del gen es del 40% en la población indígena de Sur América.

El gen también presenta amplias frecuencias en Centro América mientras que en la población indígena de América del Norte son pocos los casos registrados, en el este de Asia la frecuencia es del 1 al 5 % mientras que en Korea y en el Tibet la población en la que se expresa el gen varía entre el 7 y el 8 %. Por otro lado la expresión del alelo D_i^b positivo es frecuente en todas las poblaciones. (NCBI, 2012).

2.2.5 Antígenos del sistema Diego

El sistema sanguíneo Diego cuenta con 22 antígenos eritrocitarios de los cuales el fenotipo Di^b y el Wr^b son considerados de alta frecuencia mientras que los antígenos Di^a y el Wr^a son considerados de frecuencia baja, de la misma manera se determina que aquellos antígenos con característica inmunógena son los antígenos Di^a y Di^b ya que son principales involucrados en enfermedad hemolítica del recién nacido y en reacciones transfusionales tardías, aunque se ha evidenciado pacientes sanos con un fenotipo Di^b débil. Se sabe que estos antígenos ya se encuentran desarrollados al momento de nacer (Trujillo, 2012) (Buelvas Cortés, A., Muñoz-Díaz, E., & León de González, G, 2014)

En el año 2004 la Sociedad internacional de Transfusión Sanguínea determinó y clasificó 17 de los antígenos del sistema Diego hasta entonces conocidos, y a partir de entonces se han descubierto nuevas variantes antigénicas en los que se incluyen el antígeno Fr^a , $SW1$, Sw^a2 , $DISK$ y el $Di(a-b-)$ o fenotipo nulo, completando los actuales 22 antígenos del sistema Diego (Tabla 1). El fenotipo nulo no se había encontrado en personas sanas debido a que se trataba de una variante altamente inmunógenos que desencadenaba reacciones consecuentemente fatales. (Daniels, 2002) (Geoff D. , 2013) (ISBT, 2004) (Storry, 2014)

La denominación del antígeno *Diego null* o Diego nulo se debe al reporte de un caso en el que se evidenció la completa ausencia de la banda 3 en los eritrocitos del paciente por lo que se considera un antígeno Diego (a-b-). Así mismo se han evidenciado antígenos del sistema Diego en la banda 3 de glóbulos rojos anormales implicados en procesos de adhesión principalmente por contagio de malaria. (Trujillo, 2012) (Buelvas Cortés, A., Muñoz-Díaz, E., & León de González, G, 2014).

Finalmente en un ensayo basado en electroquimiomicroscopía, en el que se usó una IgG marcada con ferritina, se logró determinar la porción de antígenos sobre un eritrocito Di^b positivo, en el que el resultado fue 15400 unidades del antígeno por célula roja, (Masouredis, Sudora, Mahan, & Victoria, 1980) estudio con el que se determina la importancia del conocimiento del potencial inmunógeno de los antígenos pertenecientes a este sistema sanguíneo irregular. (Alves de Lima, 1982) (Buelvas Cortés, A., Muñoz-Díaz, E., & León de González, G, 2014). (Figura N°5)

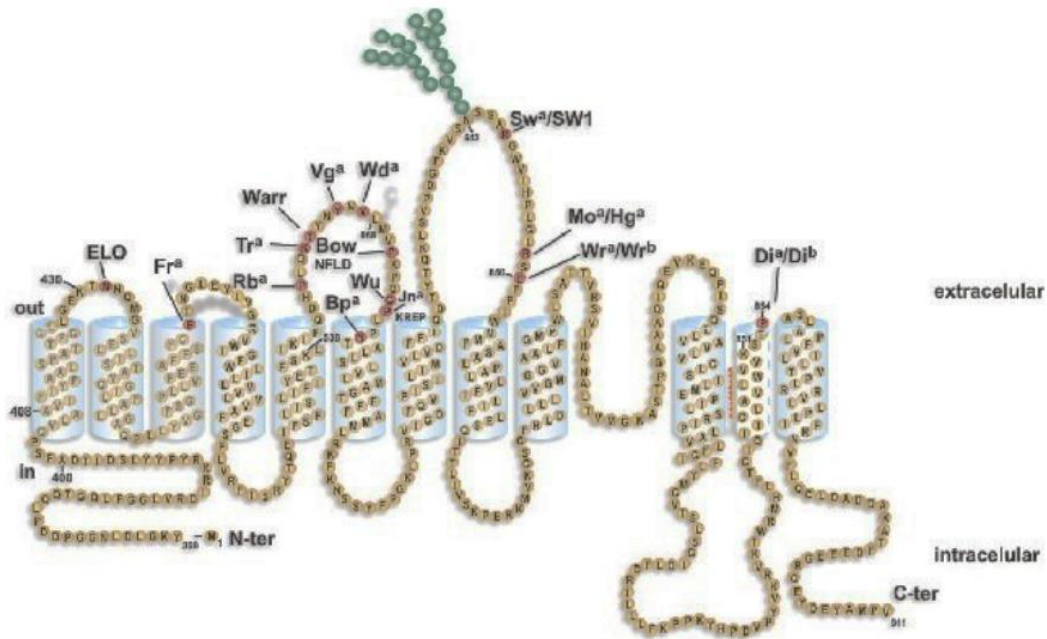
Tabla 1: Antígenos del Sistema Diego.

DI*02 codifica Di ^b , Wr ^b , DISK				
Fenotipo ISBT	Nombre del alelo	Cambio de nucleótido	Exón	Cambio del aminoácido
DI:1,-2 o Di (a+b-)	DI*01 o Di ^a	2561 C>T	19	Pro 854 leu
DI:-1,2 o Di (a-b+)	DI*02 o Di ^b	2561 C	19	Pro 854
DI:3,-4 o Wr (a+b-)	DI*02.03	1972 G>A	16	Glu 658 Lys
DI:5 o Wd ^a	DI*02.05	1669 G>A	14	Val 557 Met
DI:6 o Rb ^a	DI*02.06	1643 C>T	14	Pro 548 Leu
DI:7 o WARR+	DI*02.07	1654 C>T	14	Thr 552 Ile
DI:8 o ELO+	DI*02.08	1294 C>T	12	Arg 432 Trp
DI:9,-22 o Wu+, DISK-	DI*02.09	1694 G>C	14	Gly 565 Ala
DI:10 o Bp ^a	DI*02.10	1707 C>A	14	Asn 569 Lys
DI:11 o Mo ^a	DI*02.11	1967 G>A	16	Arg 656 His
DI:12 o Hg ^a	DI*02.12	1966 G>T	16	Arg 656 Cys
DI:13 o Vg ^a	DI*02.13	1663 T>C	14	Tyr 555 His
DI:14 o Sw ^a	DI*02.14.01	1937 G>A	16	Arg 646 Gln
DI:14 o Sw ^a	DI*02.14.02	1936 C>T	16	Arg 646 Trp
DI:15 o BOW+	DI*02.15	1681 C>T	14	Pro 561 Ser
DI:16 o NFLD+	DI*02.16	1287 A>T; 1681 G>G	12; 14	Glu 429 Asp Pro 561 Ala
DI:17 o Jn ^a	DI*02.17	1696 C>T	14	Pro 566 Ser
DI:18 o KREP+	DI*02.18	1696 C>G	14	Pro 566 Ala
DI:19 o Tr ^a	DI*02.19	1653 C>G	14	Lys 551 Asn
DI:20 o Fr ^a	DI*02.20	1438 G>A	13	Glu 480 Lys
DI:21 o SW1+	DI*02.21	1936 C>T	16	Arg 646 Trp
Fenotipo Nulo				
Di (a-b-)	DI*02N.01	1462 G>A	13	Val 488 Met

Autor: Storry, 2014

Fuente: Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea, 2014

Figura N°5. Distribución de los antígenos del sistema Diego en Banda 3



Autor: Costa Nuñez, 2004

Fuente: Estudio del polimorfismo del Sistema Diego

Gráfico muestra los múltiples antígenos del sistema Diego en la banda 3.

2.2.6 Anticuerpos anti-Diego

Fue en el año de 1967 cuando se detectó por primera vez un anticuerpo anti-Di^b, esto ocurrió en un paciente de origen latino con un amplio registro de transfusiones sanguíneas, sin embargo los reportes de casos en los que se especifica la presencia de anti-Di^b son escasos, apenas se describen 15 casos a nivel internacional. (Martínez, y otros, 2009). Se han reportado varios casos de presencia de otros anticuerpos de mayor frecuencia entre ellos el anti-Di^a, casos en los que se han visto involucradas principalmente mujeres embarazadas por lo que se determina que la vía perinatal es la principal forma de sensibilización para el desarrollo de trastornos hemolíticos (Silva, George, & Hirtsch, 2004). Por otro lado los anticuerpos anti Wr^a y anti-Wr^b fueron descubiertos en 1953 y en 1971 respectivamente, siendo estos hallados en pacientes politransfundidos con presencia de enfermedad hemolítica leve. (Trujillo, 2012) (Buevas Cortés, A., Muñoz-Díaz, E., & León de González, G, 2014) (Geoff D., 2013)

Los anticuerpos anti-Diego son principalmente inmunoglobulinas del tipo IgG (Silva, George, & Hirtsch, 2004) (Geoff D. , 2013) aunque también se han reportado casos de

anticuerpos del tipo IgM, siendo estos de baja frecuencia. (Daniels, 2002) Dentro de los anticuerpos del tipo IgG están el anti-Di^a y anti Di^b que son los causantes de reacciones hemolíticas transfusionales y neonatales, dichos trastornos pueden ser leves o evolucionar hasta volverse trastornos severos (Martínez, y otros, 2009). Del mismo modo los anti-Wr^a y anti-Wr^b así como el anti-ELO se los ha clasificado como anticuerpos con importancia clínica mientras que el resto de antígenos anti-Diego no presentan valor clínico significativo. (Daniels, 2002) (Buevas Cortés, A., Muñoz-Díaz, E., & León de González, G, 2014)

La importancia clínica que presentan los anticuerpos anti-Di^a y anti-Di^b ha hecho que sean el foco de varios estudios mediante los cuales se ha demostrado que estas inmunoglobulinas fijan fuertemente el complemento produciendo un alto factor de adherencia, favoreciendo la fagocitosis con los eritrocitos Di^a y Di^b positivos respectivamente (Trujillo, 2012) (Daniels, 2002) (Geoff D., 2013).

El escrutinio de los anticuerpos anti-Diego se los realiza mediante la técnica de antiglobulina indirecta, o Coombs indirecto, sin embargo el potencial inmunógeno de los del tipo anti-Di^a y anti-Di^b hacen que estos aglutinen directamente con eritrocitos positivos para su respectivo antígeno. (Daniels, 2002) (Bhutani, y otros, 2013) (Baleotti, y otros, 2014).

La importancia clínica y transfusional de este sistema ha hecho que sea de vital importancia la incorporación de los antígenos del sistema Diego en paneles celulares para el escrutinio de anticuerpos anti-Diego. Actualmente en Japón se ha desarrollado un antisuero monoclonal anti-Di^a cuyas clona HMR15 aglutina directamente con eritrocitos positivos hacia su antígeno Di^a, mientras que la clona HMR22 aglutina con células positivas para su respectivo antígeno mediante la técnica de antiglobulina humana directa. (Miyazaki, Sato, Kato, & Ikeda, 2000) (Daniels, 2002)

La aplicación de paneles celulares Diego positivo como la utilización de un antisuero para la determinación directa de antígenos Diego en eritrocitos es un importante paso el para obtener un diagnóstico preventivo en mujeres embarazadas y en pacientes transfundidos de manera oportuna, haciendo de las técnicas in vitro los procedimientos de diagnóstico de primera mano. (Silva, George, & Hirtsch, 2004)

2.2.7 Clínica del sistema Diego

Se sabe que los antígenos del sistema Diego son altamente inmunógenos, es así que al entrar en contacto con el sistema inmune inducen a la sensibilización y producción de anticuerpos frente a dichos antígenos, a partir de esto se desarrollan dos trastornos hematológicos relevantes, las reacciones transfusionales y la EHRN, ambas causadas por el contacto transfusional con antígenos del sistema diego, principalmente el Di^a, y por la consecuente sensibilización inmunológica del paciente transfundido como de la aloinmunización materno fetal. (Figuroa, 2013) En ambos casos la respuesta inmune puede ser leve o derivar a moderada, inclusive inducir una respuesta inmunológica tan severa que conlleve a la muerte del individuo. (Luna-Gonzales, 2005)

2.2.7.1 Reacciones Transfusionales asociadas a la inmunización por antígenos del sistema Diego

Las reacciones transfusionales son trastornos de hipersensibilidad de tipo 2 en los que se produce una respuesta inmunológica exacerbada debido al contacto del paciente transfundido con moléculas antigénicas sobre la superficie de la membrana de los eritrocitos contenidos en el CGR (O'Connell, Bare, Hinkle, & Cheever, 2010), este tipo de reacciones transfusionales son exclusivamente de carácter inmune y sus manifestaciones características son la presencia de fiebre y urticaria, relacionadas directamente a la hemólisis eritrocitaria, y en casos severos se puede llegar a un choque anafiláctico. (Luna-Gonzales, 2005).

Las reacciones transfusionales asociadas a antígenos del sistema Diego pueden ser inmediatas o tardías (Trujillo, 2012) es decir que dependen del tiempo en que se presentan las manifestaciones clínicas, siendo inmediatas cuando estas aparecen dentro de las primeras 24 horas de la administración del paquete globular o tardías cuando la reacción se produce posterior a las 24 horas de la transfusión. (Martínez, Rivero, & Fernández, 2015). Es así que en 2012 en Korea se reporta un caso de reacción transfusional inmediata tras la administración de una unidad de CGR como procedimiento compensatorio tras un proceso quirúrgico a un paciente de 75 años de edad de sexo femenino, cuyo previo resultado a la identificación de anticuerpos irregulares fue negativo, la reacción desencadenó hemoglobinuria moderada una hora después de finalizada la transfusión, sin que la paciente presente otras manifestaciones clínicas relevantes. En un nuevo estudio se determina que la paciente es entonces positiva para anticuerpos anti-Di^a y se presume que su sensibilización ocurrió dos semanas antes del

episodio hemolítico debido una transfusión previa de dos unidades de CGR realizada posterior a otra cirugía ajena al caso mencionado. (Sung Ha Mun, 2012).

2.2.7.2 Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido asociada al sistema Diego

La Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido es un trastorno inmuno-hematológico causada por la incompatibilidad existente entre los anticuerpos maternos y las células rojas fenotípicamente diferentes del recién nacido (Barrera Andocilla, 2011), provocando una hiperbilirrubinemia debido a la liberación de la hemoglobina causada por la destrucción de los eritrocitos fetales, es común que este trastorno se deba a la incompatibilidad por el sistema ABO y Rh, sin embargo existen grupos sanguíneos entre ellos el sistema Diego cuyos anticuerpos específicos maternos predisponen al desarrollo de la enfermedad. (De Alarcón, Werner, & Christen, 2013)

Existen varios reportes de casos de EHRN causados por anticuerpos pertenecientes al sistema Diego, es así que el punto de partida para la investigación de dicho sistema es el fallecimiento de un recién nacido de raíces latinas que desarrolla hiperbilirrubinemia durante tres días hasta su fallecimiento, posteriormente se determina que se trató de una reacción hemolítica materno fetal por anticuerpos anti-Di^a (Soyano & Müller, 2014). A partir de este caso existen varios casos en los que se determinan anticuerpos del sistema Diego como lo causantes de la hemólisis neonatal, es así que en 2007 se presenta un nuevo caso de anemia hemolítica causado por anti-Di^a, en dicho reporte presentado por Sun Min Lee se detalla la presencia de hiperbilirrubinemia en un infante nacido a término, por lo que es ingresado al tercer día de nacido a tratamiento con fototerapia y exanginotransfusión debido a la severidad de la reacción hemolítica, si bien las pruebas de rutina realizadas a la madre para la determinación de anticuerpos irregulares fueron negativas, se evidenció mediante pruebas in vitro la incompatibilidad del suero materno con las células de neonato, las mismas que dieron positivas tanto para la presencia de antígeno Diego Di^a como para la prueba de Coombs directo, se encontró también que la madre estaba sensibilizada mediante la prueba de su suero con células panel que incluían al antígeno Di^a. (Sun Min Lee, y otros, 2007)

Se han evidenciado varias casos de enfermedad hemolítica del recién nacido como de reacciones transfusionales en las que se ha involucrado al sistema Diego, por lo que se resalta la importancia de incluir a este sistema en el protocolo de rutina para la determinación de sistemas sanguíneos irregulares.

2.2.8 Método de detección de antígenos y aloanticuerpos del sistema Diego

Actualmente existen varios métodos para la determinación de antígenos y anticuerpo de sistemas sanguíneos irregulares, entre ellos los pertenecientes al sistema Diego. La gran mayoría se basan en la reacción de aglutinación con especificidad entre antígeno y anticuerpos (Luna-Gonzales, 2005) siendo uno de ellos parte de un kit de diagnóstico comercial y otro contenido en la muestra del paciente, de tal manera que si se busca la presencia de un anticuerpo irregular son las células positivas, en este caso células Di^a, las que corresponden al kit comercial de diagnóstico y viceversa. (Almonacid, 2014)

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

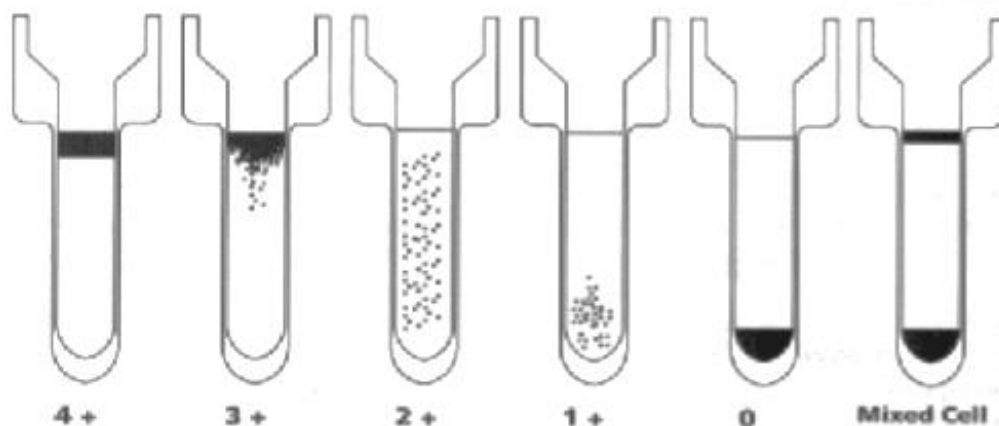
La aglutinación en tubo o método *in vitro* se basa en la reacción de células comerciales con suero del donante en un tubo de ensayo, el mismo que se incuba a 37° C para su lectura mediante reacción de Coombs indirecto (Almonacid, 2014) Si existiese reacción antígeno anticuerpo se espera que los anticuerpos anti-IgG presentes en el reactivo de Coombs formen un complejo llamado aglutinado el mismo que se ve como un botón compacto de células en el fondo del tubo. (Garibay Escobar, 2006) La presencia del aglutinado indica que en la muestra existe el anticuerpo irregular, para las células comerciales Di^a positivas el anticuerpo encontrado será el anti-Di^a. Para la determinación *in vitro* de antígenos irregulares es necesario realizar una suspensión de células del donante y probarlas con los anticuerpos monoclonales comerciales específicos, y a partir de entonces continuar con el protocolo establecido según la Asociación Americana de Banco de Sangre. (AABB, 2014)

2.2.8.2 Microaglutinación o técnica en gel

La técnica de aglutinación en gel es una técnica basada en la formación del aglutinado por una reacción antígeno-anticuerpo, el mismo que de existir, se mantiene retenido en la superficie de un microposillo contenido en el cassette de diagnóstico, cuando no existe aglutinación es indicativo de que no se ha realizado la reacción antígeno-anticuerpo por lo que después de la centrifugación del cassette la suspensión de células migra a través del gel completamente hacia el fondo, resultado que se debe interpretar como negativo. (Almonacid, 2014) Para la determinación de anticuerpos irregulares, incluidos el anti-Di^a, la columna de gel debe tener una suspensión de baja fuerza iónica conocida como LISS conjugada con la AHG propia del reactivo de Coombs. (AABB, 2014) La cantidad de la suspensión celular que migra por la columna determina la fuerza de la reacción antígeno-anticuerpo por los que se han establecidos patrones de lectura los mismos que se

determinan por cruces desde positivo fuerte hasta negativo o indeterminado por presencia de población celular mixta. (Golffed, 2014)

Figura N°6. Patrones de lectura para la técnica de aglutinación en gel



Autor: Golffed, Jorge, 2014

Fuente: Microtécnica de Aglutinación en Gel

Patrones de lectura para la técnica de aglutinación en gel.

2.2.8.3 Detección de antígenos del sistema Diego por métodos de biología molecular.

Los moleculares métodos de detección de antígenos irregulares se basan en la aplicación de la PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando secuenciadores de iniciación específicos o *primers* (Pham, y otros, 2013). En el caso específico para la determinación de antígenos del sistema Diego se utilizan secuenciadores de iniciación específicos para el cromosoma 17 en el que se encuentra el gen SLC4A1, el mismo que codifica la expresión de los antígenos eritrocitarios del sistema Diego. En un estudio realizado en México se logró amplificar las secuencias codificantes para el antígeno Di^a y para el antígeno Di^b, utilizando como referencia marcadores de peso molecular obtenidos de pacientes control positivos para los antígenos Di^a y Di^b. El resultado fue de 139 y 129 pares de bases respectivamente para cada antígeno. (Martínez, y otros, 2009)

Los métodos moleculares abren la puerta hacia un nuevo y más específico diagnóstico de los antígenos involucrados en trastornos hemolíticos y transfusionales sin embargo dejan de ser reproducibles por el tiempo, equipamiento y costo de dichos procedimientos.

2.2 MARCO CONCEPTUAL

Antígeno: Cualquier sustancia, molécula o microorganismo que al ingresar el cuerpo, provoque la respuesta del organismo a la producción de anticuerpos. (Collin, 2014)

Anticuerpo: Sustancia o molécula producida por el cuerpo en respuesta a la exposición de una sustancia extraña con características específicas y antagónicas al mismo. (Collin, 2014)

Inmunización: Exposición de un antígeno con la capacidad de iniciar la respuesta de producción de su anticuerpo específico, sea por la inyección del antígeno o por la exposición involuntaria del cuerpo ante el mismo. (Collin, 2014)

Alloinmunización: Producción de anticuerpos de un individuo con especificidad a células o tejidos de otro, ambos de la misma especie, usualmente madre a hijo en el embarazo. (Federal, 2010)

Hemólisis: Destrucción y fragmentación de los glóbulos rojos con liberación de hemoglobina. (Dorland, 2011)

Aglutinación: Fenómeno basado en la unión del antígeno varios de sus respectivos anticuerpos para formar una partícula mayor llamada aglutinado. (Martin, 2010)

Inmunoglobulinas: Moléculas derivadas de las proteínas plasmáticas que cumplen funciones inmunitarias al actuar como anticuerpos. (Dorland, 2011)

Inmunógeno: Término general para toda sustancia que desencadene una reacción de inmunidad (Dorland, 2011)

Fenotipo: Características expresadas en un individuo por la acción genética sean o no estas de carácter hereditario. (Collin, 2014)

Ictericia: Coloración atípica amarillenta en la piel, secreciones y mucosas como consecuencia de la acumulación de pigmentos biliares. (Collin, 2014)

Test de Coombs o Antiglobulina Humana Indirecta: Reacción que permite determinar la presencia de anticuerpos anti-glóbulos rojos provenientes de la madre en las células rojas del hijo mediante metidos de aglutinación. (Baptista, Hernandez, Galindo, Santamaría, & Rosenfeld, 2009)

Población Mongoloide: Población originaria asiática con marcadas características mongolas, piel amarilla, cara redonda, ojos pequeños y rasgados, generalmente de estatura corta. (Trujillo, 2012)

Población Caucásica: Grupos humanos de piel blanca, cabello claro o variable generalmente biraciales originarios de las montañas del Cáucaso. (Junqueira P. , 2002)

Bilirrubina: Compuesto pigmentado amarillo producto del metabolismo de la hemoglobina liberada en la destrucción de los eritrocitos en las células del retículo endotelial. Usualmente es el compuesto causante de la ictericia cuando está presente en mucosas y tejidos. (Dorland, 2011)

Homeostasis: Estado de equilibrio orgánico y sistémico de las condiciones fisiológicas del cuerpo con su medio externo. (Martin, 2010)

Aminoácido: Unidad estructural de las proteínas, es una biomolécula que contiene un grupo amino NH_2 y un grupo carboxílico ácido COOH . (Dorland, 2011)

Senescencia: Variaciones físicas y fisiológicas ligadas al tiempo. Sinónimo de envejecimiento. (Dorland, 2011)

Exón: Fragmento de la cadena de ADN capaz de convertirse en ARN para la codificación de aminoácidos y posterior síntesis de proteínas. (NHGRI, 2014)

Intrón: Fragmento de AND de un mismo gen que se encuentra separado de los exones por los que no codifican aminoácidos. (NHGRI, 2014)

Gen: Unidad funcional de ADN que forma parte del genoma humano. Contiene toda la información genética necesaria para la expresión de los factores hereditarios. (NHGRI, 2014)

Alelo: Corresponde a las dos unidades de un mismo gen. En los humanos un gen está compuesto por dos alelos heredados uno del padre y otro de la madre. (NHGRI, 2014)

Antisuero: Suero de un individuo que ha sido expuesto a un antígeno y haya producido inmunoglobulinas específicas a dicho antígeno. (Collin, 2014)

Monoclonal: Referente a anticuerpos producidos por una sola clona de linfocitos B y que reconocen específicamente a un epítope de su respectivo antígeno. (Ruiz, Moreno, López, & Vega, 2007).

CAPÍTULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1.1 Tipo de Estudio: Es un estudio de tipo descriptivo de corte transversal ya que se determinó la frecuencia y prevalencia de antígenos y anticuerpos del sistema Diego en la población donante en un periodo de tiempo previamente delimitado.

3.1.1.2 Tipo de Muestreo: Se realizó un muestreo aleatorio simple.

3.1.1.3 Tamaño de Muestra: Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la siguiente fórmula tomando en cuenta un nivel de confianza del 95% y un error de muestreo del 0.05%; además se conoce que la totalidad de donantes del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana es de 120000 donantes anuales.

$$n = \frac{N * Z^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z^2 * p * q}$$

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

$$n = \frac{120000 * 3.84 * 0.5 * 0.5}{0.0025 * 119999 + 3.84 * 0.5 * 0.5}$$

$$n = 383$$

Dónde:

n = Tamaño de la población

N = Población conocida

p = Porción esperada

q = 1 - p

d = Precisión del estudio

Decisión: En Ecuador no existen estudios publicados donde se determine la prevalencia de aloanticuerpos ni de antígenos del sistema Diego en donantes de sangre, por lo tanto se asume una proporción esperada del 50 %, además tomando en cuenta la totalidad de donantes anuales que acuden al Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana es de 120000, con un nivel de confianza del 95% y un error del 5%, se determina una muestra de 383 donantes tanto para la investigación de aloanticuerpos y antígenos del sistema Diego.

3.1.1.4 Criterios de Inclusión: Todos los donantes de sangre que han cumplido con los criterios de aceptación de la Organización Mundial de la Salud.

3.1.1.5 Criterios de Exclusión: Todos los donantes de sangre que no han sido aceptados por no cumplir con los criterios de aceptación de la Organización Mundial de la Salud.

3.1.1.6 Análisis Estadístico: Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó estadística descriptiva basándose en la aplicación del software informático IBM SPSS Statistics versión 22.0, esto con la finalidad de determinar de manera efectiva la prevalencia de aloanticuerpos anti-Di^a y antígeno Di^a en la población de donantes del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, además dicha aplicación informática nos permitió también identificar la prevalencia basada en las variables del estudio así como en los criterios de inclusión. Para la correlación entre variables independientes se utilizó el análisis de Chi-cuadrado.

3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.2.1 Variable dependiente: Frecuencia de antígenos y anticuerpos del sistema Diego.

3.2.2 Variable independiente: Donantes voluntarios, edad, género, procedencia, alelos, anticuerpos irregulares.

Operacionalización de la Variables

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	INSTRUMENTO DE MEDIDA
Antígenos del Sistema Diego	Proteínas de la membrana eritrocitaria. (Trujillo, 2012)	Cualitativo	Donantes Positivos para el antígeno Di ^a /Total de donantes analizados	Prueba de aglutinación en tubo utilizando un antisuero monoclonal reactivo para antígenos Di ^a
Aloanticuerpos anti-Diego	Son anticuerpos expresados como respuesta inmune a la exposición ante los antígenos eritrocitarios diferentes a los que presenta el receptor. (Martínez, y otros, 2009)	Cualitativo	Donantes Positivo para anticuerpos Di ^a / Total de donantes analizados Donantes Negativo para anticuerpos Di ^a /Total de donantes analizados	Prueba de aglutinación en utilizando células comerciales positivas para los antígenos Diego.
VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	INTRUMENTOS DE MEDICIÓN
Donantes de sangre	Es un individuo que de manera voluntaria y en pleno uso de sus facultades accede a dar parte de su sangre para que esta sea usada con fines terapéuticos (Dueñas, 2003)	Cualitativo	Total de donantes participantes en el estudio	Formulario de aceptación de donantes.
Sexo o Género	Identificación física y sicológica que diferencian a un hombre de una mujer.	Cualitativo	Porcentaje de donantes de género Femenino Porcentaje de donantes de género Masculino	Formulario de registro del donante.
Edad	Tiempo comprendido entre el nacimiento y el estado actual de un individuo expresado en años.	Cuantitativo	Total donantes entre las edades de 18 – 25 años/ Total donantes Total donantes entre las edades de 26 – 50 años/ Total donantes Total donantes entre las edades >50 años/ Total donantes	Formulario de Registro del donante.
Procedencia	Lugar de nacimiento	Cualitativo	Total de donantes por provincias / Total donantes que acuden al Hemocentro nacional	Formulario de registro del donante.
Donantes de sangre	Es un individuo que de manera voluntaria y en pleno uso de sus facultades accede a dar parte de su sangre para que esta sea usada con fines terapéuticos (Dueñas, 2003)	Cualitativo	Total de donantes participantes en el estudio.	Formulario de aceptación de donantes.
Sexo o Género	Identificación física y sicológica que diferencian a un hombre de una mujer.	Cualitativo	Porcentaje de donantes de género Femenino Porcentaje de donantes de género Masculino	Formulario de registro del donante.
Alelos	Formas alternativas de un gen	Cualitativo	Total de alelos tipo Di ^a /Total de individuos negativos para el antígeno	Presencia o ausencia de aglutinación

3.3 MATERIALES Y PROCESO

3.3.1 Materiales

- ✓ Tubos de ensayo de vidrio de 5mL
- ✓ Pipetas automáticas 10-50ul
- ✓ Tarjetas de gel neutro
- ✓ Serófuga
- ✓ Puntas plásticas de pipeta de 10µL a 100 µL
- ✓ Termobloque
- ✓ Lámpara de Aglutinación
- ✓ Lupa de lectura

3.3.2 Reactivos

- ✓ Células comerciales Diego Di^a+ , Marca BIORAD
- ✓ Anti-Di^a Marca BIORAD
- ✓ Solución de LISS
- ✓ Células Panel (BIORAD).
- ✓ Albúmina 30%
- ✓ Coombs (antiglobulina humana)

3.3.3 Control de calidad

Las pruebas se basan en el principio de reacción antígeno anticuerpo, en el que las células comerciales representan el antígeno y las inmunoglobulinas específicas del paciente los anticuerpos. De haber reacción se evidencia aglutinación (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Dentro de las limitaciones de la prueba es la presencia de falsos positivos así como de falsos negativos en las pruebas debido a contaminación de las muestras, efectos prozona, variables en las temperaturas de reacción e incubación, es por esta razón que se llevó un estricto control de estas variables. Para evaluar la calidad se realizaron controles de calidad en los que se examinaron la avidéz, la potencia y el aspecto general de los reactivos de aglutinación con el fin de determinar su límite de reacción mediante diluciones (AABB, 2012) (Anexo 1). Además se utilizó un control de calidad interno para la evaluación del suero policlonal anti-Di^a, utilizando células comerciales Di^a (Vitro).

3.3.3.1 Control de calidad de los reactivos anti-Di^a

Prueba de avidez:

1. Sangre con EDTA o un segmento de manguera de la unidad de sangre.
2. Colocar 1 gotas de sangre total y 1 gota del reactivo sobre un portaobjetos.
3. Con el uso de un cronómetro tomar el tiempo de reacción desde el momento de la unión de la sangre y el reactivo
4. Observar el inicio de la aglutinación con la ayuda de la lámpara de lectura y anotar el tiempo en que se forma la aglutinación (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Prueba de potencia:

1. Enumerar los tubos de acuerdo a la dilución a procesar.
2. Utilizar células comerciales Di^a
3. Preparar dilución con solución salina de cada reactivo individualmente desde 1:2 hasta 1:512
4. Colocar 2 gotas de la suspensión de eritrocitos en cada tubo de dilución que contenga 2 gotas del reactivo diluido.
5. Incubar a 37°C por 15 minutos
6. Centrifugar a 3.000 rpm por 15 segundos.
7. Observar la aglutinación y continuar con el lavado en solución salina al 0,85% por tres veces.
8. Colocar dos gotas de Coombs y centrifugar 15 segundos
9. Observar la aglutinación con la ayuda de la lámpara de lectura y anotar la mayor dilución a la que llega cada reactivo en su aglutinación (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012)

Prueba de especificidad:

1. Enumerar los tubos como Di^a
2. Utilizar las células comerciales Di^a
3. Colocar 2 gotas de la suspensión junto con 2 gotas de cada reactivo, respectivamente.
4. Incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Una vez concluido el tiempo centrifugar durante 15 segundos a 3.000 rpm.
6. Observar la presencia de aglutinación y leer.

7. Lavar tres veces con solución salina al 0,85%.
8. Colocar dos gotas de Coombs.
9. Centrifugar a 3.000 rpm por 15 segundos.
10. Observar aglutinación en este caso, todos son específicos para el antígeno que se muestra en el reactivo. (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012)

3.3.3.2 Control de calidad de Células Diego Di^a

1. Observar la apariencia de las células en búsqueda de patrones de hemólisis contaminación de acuerdo a las recomendaciones de la AABB. En cada ensayo se utilizará un suero positivo para anti-Di^a.

3.4 PROCEDIMIENTO

Ese estudio se realizó en cinco fases:

3.4.1 Fase Uno: Obtención de permisos de la institución: Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas mantiene una colaboración investigativa con el Hemocentro por lo que fue aceptada la realización de este estudio.

Consentimiento Informado: todos los donantes aceptan el uso de su sangre y la realización de pruebas antes de su uso por lo que no se requiere de consentimientos extras, además no se tiene contacto directo y los datos llegan codificados (Anexo 1).

3.4.2 Fase Dos: Elección de los concentrados de glóbulos rojos: se utilizó un muestreo aleatorio simple mediante el cálculo basado en la aplicación de una fórmula en el programa informático Excel versión 2013 (Anexo 2).

Control de Calidad siguiendo el mismo protocolo del AABB, 2012 para evaluar reactivos que determinan antígenos en la sangre del paciente (Anexo3)

Control de Calidad de las células este proceso se realizó con el antisuero comercial marca BIO-RAD y siguiendo el protocolo de detección de aloanticuerpos.

3.4.3 Fase Tres: *Detección de anticuerpos anti-Di^a*

1. Enumerar e identificar los tubos con la respectiva numeración de la muestra
2. Colocar una gota del suero del donante previamente descongelado en el tubo de reacción

3. Colocar una gota de las células comerciales Di^a+ y reaccionar con el suero del donante.
4. Observar y evaluar la aglutinación.
5. En los casos de aglutinación parcial, agregar una gota de albúmina
6. Incubar a 37°C por 15 minutos
7. Repetir la lectura de aglutinación.
8. Lavar tres veces las células con solución salina
9. Agregar una gota de reactivo de Coombs
10. Repetir la lectura de Aglutinación.

Detección de antígeno Di^a+

Preparación de la solución de eritrocitos:

Una vez elegida la pinta de sangre se utilizó el botón celular del tubo primario con EDTA este no debe tener microcoágulos, las muestras que presentaron fueron eliminadas del estudio. Se midió 50ul de sangre más 1ml de diluyente LISS.

Determinación del antígeno Di^a en solución de eritrocitos

1. Enumerar e identificar los tubos con la respectiva numeración de la muestra
2. Colocar una gota de la suspensión celular al 2.5% del donante en un tubo de ensayo de vidrio limpio
3. Añadir una gota del suero policlonal Di^a+ al tubo de reacción
4. Agitar levemente y evidenciar la reacción de aglutinación en la lámpara de aglutinación.
5. En los casos de aglutinación parcial, agregar una gota de albúmina
6. Incubar a 37°C por 15 minutos
7. Repetir la lectura de aglutinación (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

3.4.4 Fase Cuatro

Creación de la base de datos: Se llevó un registro en Excel en el que constaron los siguientes datos: Código, edad, sexo, procedencia, resultados, grupo sanguíneo SABO, antígeno Di^a, anticuerpos anti-Di^a todo codificado para el análisis en SPSS mediante estadística descriptiva y la para la relación entre variables se utilizó la prueba estadística del chi-cuadrado.

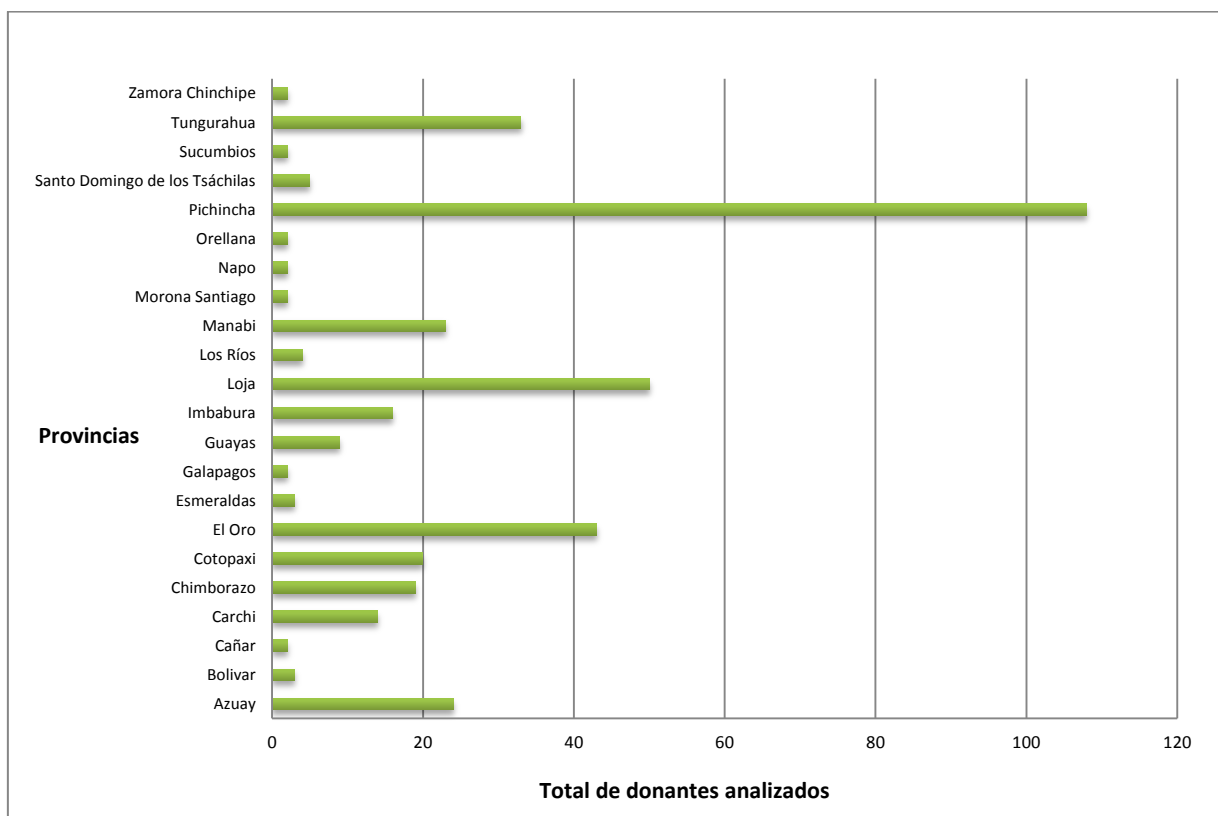
CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO Di^a.

4.1.1 Descripción de la población de estudio para la determinación de antígeno

Se analizó un total de 383 muestras de donantes voluntarios de sangre que acudieron al Hemocentro de Cruz Roja, procedentes de 22 provincias. Gráfico 4.1

Gráfica N°4.1. Total de donantes de sangre que participaron en la determinación de antígeno Diego por provincia



Autor: Fernando Góngora

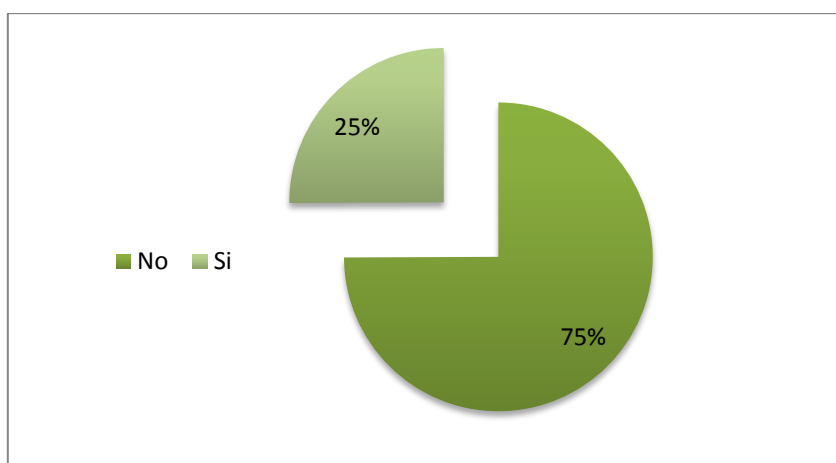
Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra el total de donantes que participaron en el estudio siendo en mayor número los de las provincias de Pichincha, Loja, El Oro, Tungurahua y Azuay.

4.1.2 Determinación de la prevalencia de antígeno en donantes de sangre.

En la identificación del antígeno Diego (Di^a) en donantes de sangre se determinó que existe una prevalencia del 25% distribuido todas las provincias que participaron en este estudio. Gráfico N°4.2

Gráfica N°4.2. Porcentaje de donantes que presentan el antígeno Diego



Autor: Fernando Góngora

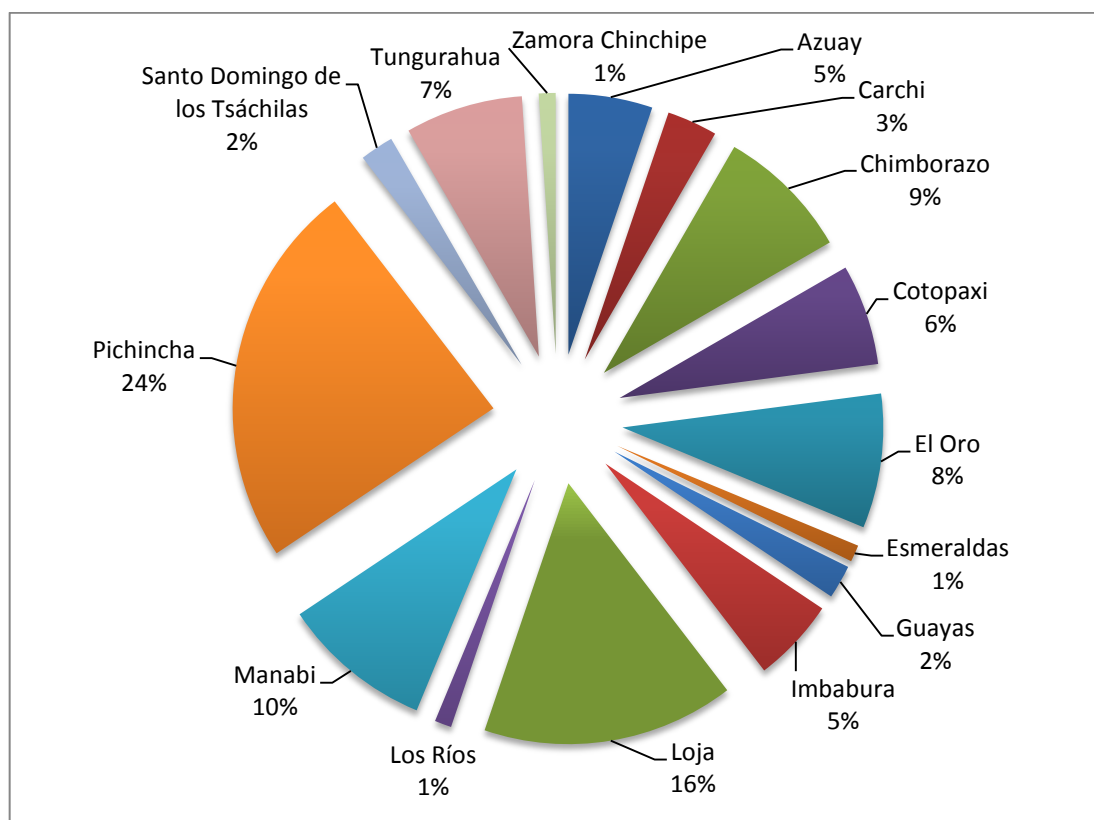
Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra la distribución porcentual del antígeno Diego en la población estudiada

4.1.3 Determinación de la presencia de antígenos Di^a de acuerdo a la procedencia

El análisis de la distribución del antígeno Diego (Di^a) de acuerdo a la procedencia estableció que el 24% se encuentran en Pichincha, seguido de Loja con el 16% y en El Oro con el 8%, estos datos demuestran que existen donantes que pueden desencadenar una aloinmunización al ser utilizados los concentrados eritrocitarios en pacientes con ausencia del antígeno Diego (Di^a). Otras provincias de la sierra central con porcentajes considerables son Chimborazo 9%, Tungurahua con 7%, Cotopaxi 6%. Sobresale también la provincia de Manabí con un 10%. (Gráfico 4.3)

Gráfica N°4.3. Distribución porcentual del antígenos Di^a en donantes de sangre de acuerdo a la procedencia



Autor: Fernando Góngora

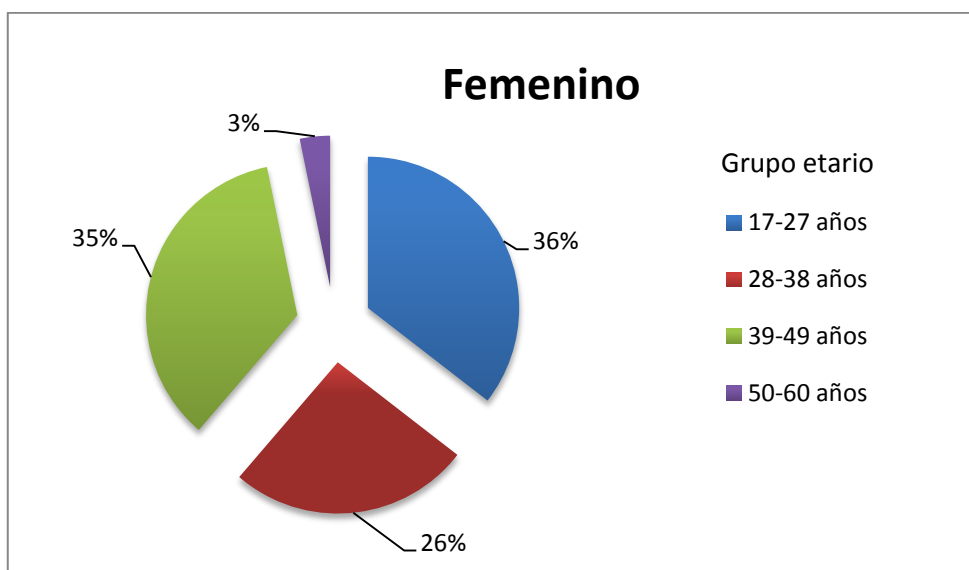
Fuente: Base de datos CIEIC

La gráfica muestra la presencia del antígeno Di^a en 22 provincias del Ecuador.

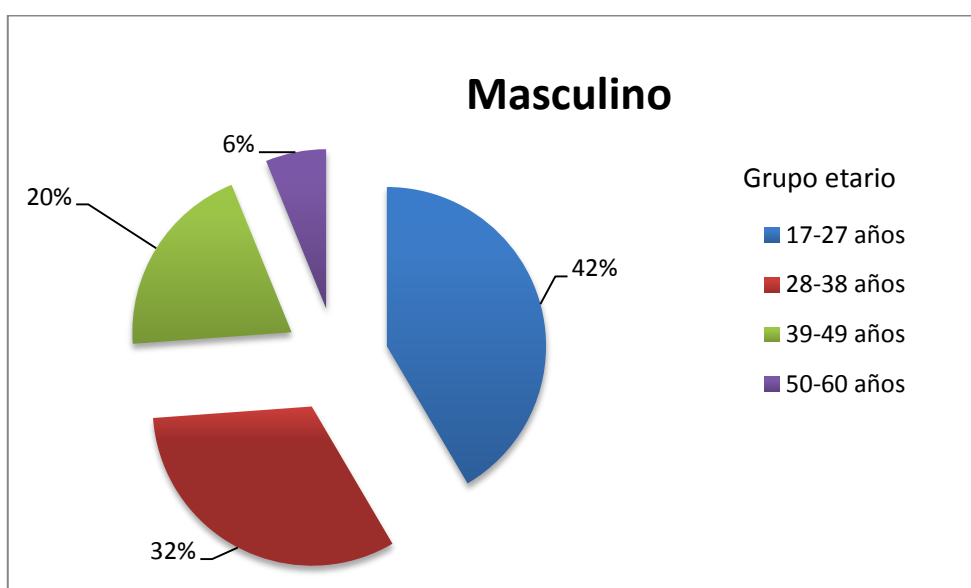
4.1.4 Presencia de antígeno Di^a de acuerdo a la procedencia, edad y género.

Se identificó que el antígeno Di^a se encuentra presente en los grupos etarios considerados en edad fértil tanto en hombres como mujeres manteniéndose una distribución similar en los dos géneros (Gráfico 4.4-4.5)

Gráfica N°4.4. Distribución porcentual del antígenos Di^a en donantes de sangre de género femenino y grupo etario



Gráfica N°4.5. Distribución porcentual del antígenos Di^a en donantes de sangre de género masculino y grupo etario



Autor: Fernando Góngora

Fuente: Base de datos CIEIC

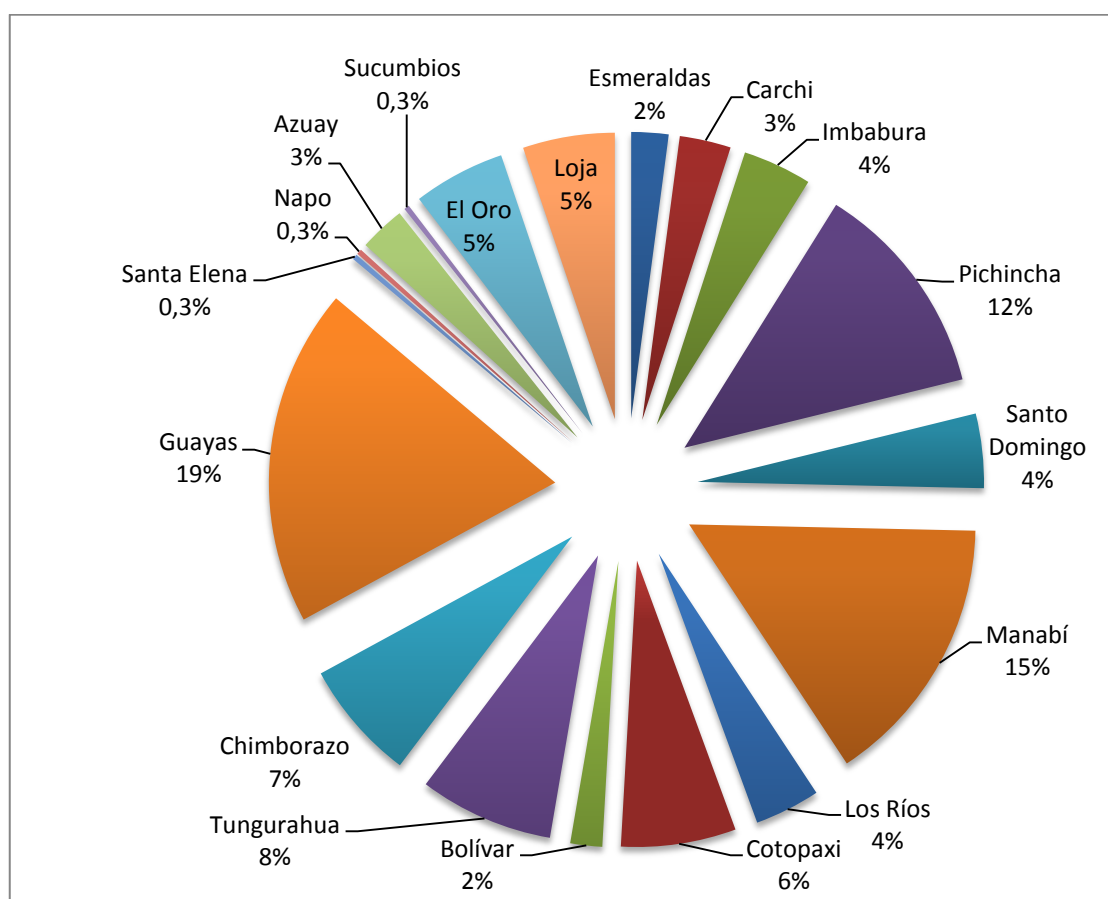
Los gráficos muestran la distribución porcentual del antígeno Diego de acuerdo al grupo etario.

4.2 RESULTADOS DETERMINACIÓN DE ALOANTICUERPOS

4.2.1 Descripción de la población de estudio para la determinación de aloanticuerpos

Se analizó un total de 383 muestras de donantes de sangre que acudieron al Hemocentro de Cruz Roja, procedentes de 18 provincias, siendo el 19% donantes guayaquileños, 12% de Pichincha y 15% de Manabí. Los menores porcentajes de donantes se localizaron en las provincias de Sucumbíos, Napo y Santa Elena. (Gráfico 4.5).

Gráfico N°4.6. Distribución porcentual de donantes de sangre que participaron en el estudio de acuerdo a la procedencia



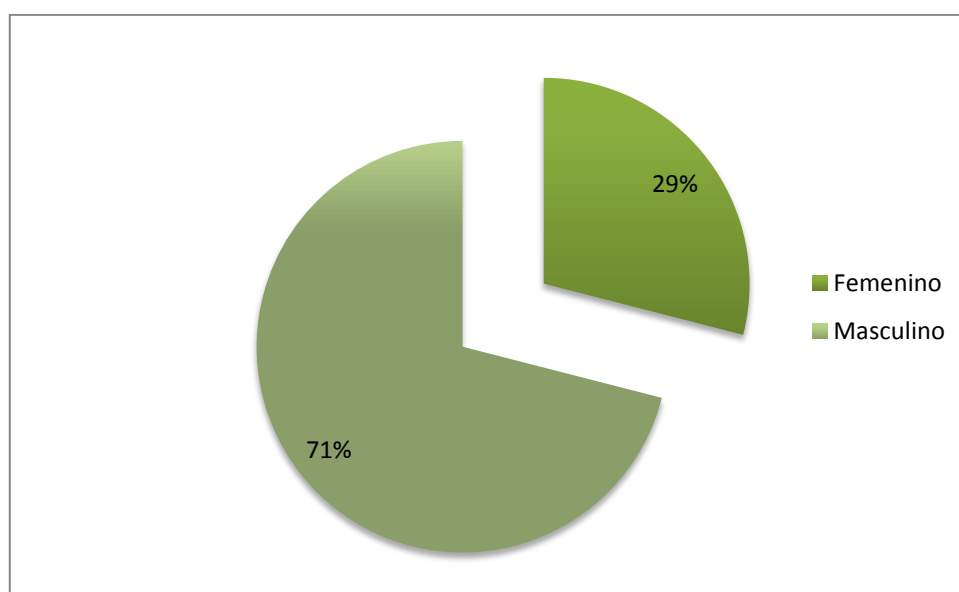
Autor: Fernando Góngora

Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra la distribución porcentual de muestras de donantes de sangre de acuerdo a la procedencia

Del total de donantes analizados el 29% (111) pertenecían al género femenino y el 71% (272) al masculino, evidenciándose que los hombres son mayormente aceptados como donantes que las mujeres, esto puede deberse a los requisitos establecidos para la selección de donantes como es el peso, valor del hematocrito, estado de gestación y lactancia, son los principales impedimentos para donar sangre (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012). (Gráfico 4.6)

Gráfico N°4.7. Porcentaje de donantes de sangre de acuerdo al género



Autor: Fernando Góngora

Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra el porcentaje de donantes de acuerdo al género que intervinieron en el estudio, siendo mayor el masculino.

4.2.2 Determinación de la prevalencia de aloanticuerpos en donantes de sangre.

Se estableció una prevalencia del 6,09% de aloanticuerpos anti-Di^a (22/383) en donantes de sangre, distribuidos en 11 de las 18 provincias, con una mayor prevalencia en la provincia de Manabí 31,82%, seguido de Guayas con 13,64% y Pichincha con 9,09%. Al realizar el análisis de relación se obtuvo un valor $p > 0,05$, es decir que no existe ninguna relación entre estas dos variables. (Tabla N°4.1) (Gráfico N°4.7)

Tabla N°4.1. Presencia de aloinmunización por el antígeno Di^a en donantes de diferentes provincias

	Negativo Anti-Di ^a	%	Positivo Anti-Di ^a	%
Manabí	52	14,4	7	31,82
Guayas	70	19,39	3	13,64
Los Ríos	12	3,32	2	9,09
Pichincha	45	12,47	2	9,09
Bolívar	6	1,66	1	4,55
Esmeraldas	7	1,94	1	4,55
Imbabura	14	3,88	1	4,55
El Oro	19	5,26	1	4,55
Loja	19	5,26	1	4,55
Cotopaxi	24	6,65	1	4,55
Chimborazo	25	6,93	1	4,55
Tungurahua	28	7,76	1	4,55
Santa Elena	1	0,28	0	0
Napo	1	0,28	0	0
Sucumbíos	1	0,28	0	0
Azuay	10	2,77	0	0
Carchi	11	3,05	0	0
Santo Domingo	16	4,43	0	0
	361	100	22	100

Autor: Fernando Góngora

Fuente: Base de datos CIEIC

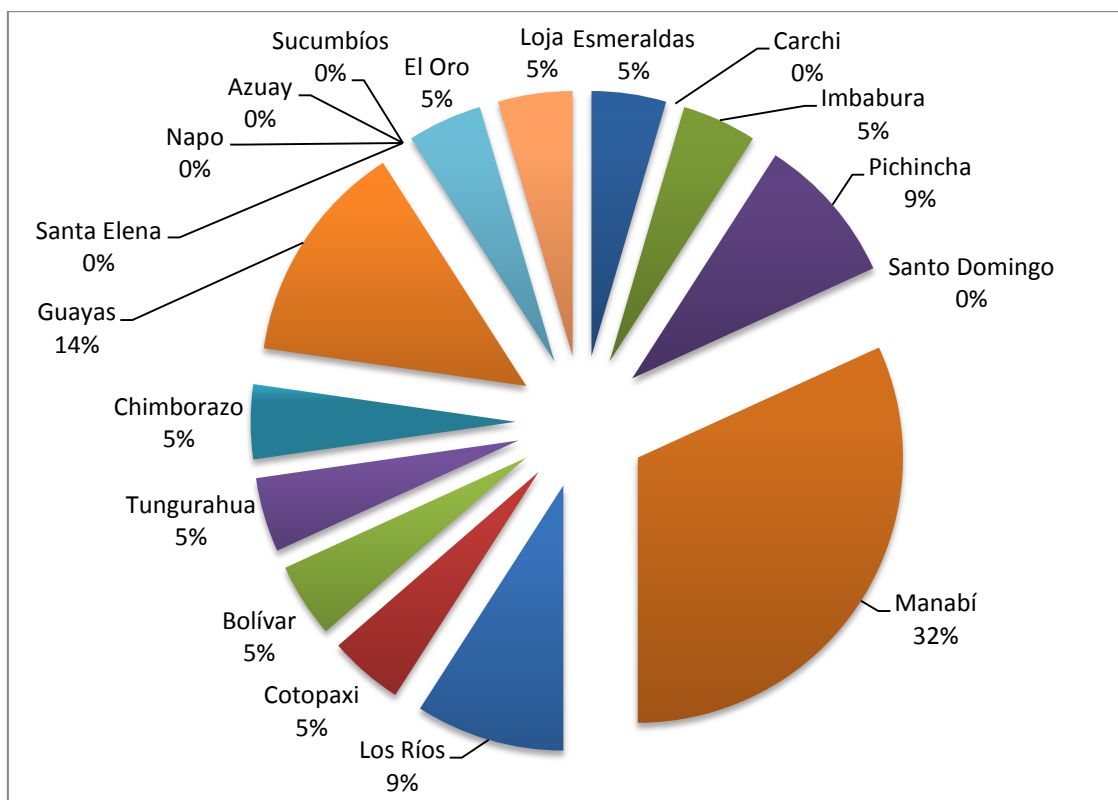
La tabla se muestra la distribución de aloinmunización en las diferentes provincias excepto en Carchi, Santo Domingo, Santa Elena, Napo, Azuay y Sucumbios; las restantes solo se analizó un donante por lo que no es un dato relevante. ($p > 0,05$).

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	16,364 ^a	21	,749
Razón de verosimilitud	18,274	21	,632
N de casos válidos	383		$p > 0,05$

El análisis estadístico demuestra que no existe relación entre la procedencia y la producción de aloanticuerpos

Gráfica N°4.8. Porcentaje de donantes aloinmunizados (anti-Di^a) por provincia



Autor: Fernando Góngora

Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra la distribución porcentual de donantes que presentan el aloanticuerpo “Diego” encontrándose en Manabí un 32%, seguido de Guayas 14%.

4.2.3 Presencia de aloanticuerpos anti-Di^a de acuerdo a la procedencia, edad y género.

También se determinó la distribución de este aloanticuerpo en donantes de acuerdo al género y edad; estableciéndose que en mujeres existe un mayor porcentaje (6,30 %) esto puede deberse a aloinmunización por el embarazo o transfusiones previas, en relación a la edad se identificó que el anti-Di^a se encuentra distribuido en todos los grupos etarios, al realizar el análisis estadístico de la relación de las variables se determinó que no era significativo $p > 0,005$. (Tabla N°4.2 y 4.8).

Tabla N°4.2. Presencia de aloanticuerpo Di^a en donantes de sangre de acuerdo al género

	Negativo	%	Positivo	%
	Anti-Di^a		Anti-Di^a	
Femenino	104	93,70	7	6,30
Masculino	257	94,48	15	5,52
	361		22	

Autor: Fernando Góngora

Fuente: Base de datos CIEIC

Tabla N°4.3. Presencia de aloanticuerpo Di^a en donantes de sangre de acuerdo al grupo etario

Grupo etario	Negativo	%	Positivo	%
	Anti-Di^a		Anti-Di^a	
17-27	6	1,66	0	0,00
28-38	156	43,21	9	40,91
39-49	97	26,87	6	27,27
50-60	71	19,67	5	22,73
61-71	31	8,59	2	9,09
Total	361		22	

Fuente: Base de datos CIEIC

Autor: Fernando Góngora

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,721 ^a	4	,317
Razón de verosimilitud	6,194	4	,185
N de casos válidos	383		p>0,05

Las tablas muestran la relación del aloanticuerpo Di^a con el género y los grupos etarios de donantes y el análisis estadístico demuestra que no existe significancia P=0,317.

4.3 DISCUSIÓN

La prevalencia de los antígenos del sistema Diego, específicamente el antígeno racial Di^a o Di1, es casi nula en la población afroamericana y caucásica pero es relativamente frecuente en la población indígena de latino América (Park, y otros, 2003) (Wei, Al-Hassan, Naim, & Knight, 2013). En el presente estudio se obtuvo una prevalencia en donantes de sangre ecuatorianos del 25% de antígeno Di^a, en contraste con el estudio realizado en Guatemala en el que se estableció una prevalencia total de antígeno Diego Di1 del 7,5 % en donantes de sangre, distribuyéndose la población entre mestiza e indígena y obteniendo una frecuencia del 12,99 % y del 3,90% respectivamente (Gutiérrez, Lanz, Pérez Minera, & Castellanos, 2013), la presente investigación no permite determinar diferencias étnicas debido a que no existe una pregunta que especifique la etnia del donante en el formulario de donación.

Sin embargo, de acuerdo al INEC en Ecuador, existe una elevada incidencia de población indígena aproximadamente un millón de habitantes, lo que determina que el 7% de la población es considerada como población étnica, por lo tanto se podría comprender la elevada prevalencia del antígeno Di^a encontrada en este estudio. Adicionalmente dicho porcentaje se encuentra distribuido casi uniformemente por todo el territorio nacional presentando marcados focos poblacionales en la región sierra. (INEC, 2010). Así, en este estudio se identificó que el 24% de los donantes con antígeno Di^a positivo se encuentran en la provincia de Pichincha seguido de Loja con 16%, Manabí con 10%, además de Chimborazo, Tungurahua y Cotopaxi con una prevalencia de 9%, 7% y 6% respectivamente, corroborando así la distribución de este antígeno en las provincias serranas del país, siendo foco importante de la distribución del antígeno Di^a la sierra central.

Un dato relevante fue la presencia del 10% de antígeno Diego en la provincia de Manabí en la que se identificó un 32% de aloinmunización por este antígeno, dato que muestra la necesidad de incluir pruebas de tipificación para el antígeno Diego en esta provincia. Otros estudios afirman que la frecuencia del antígeno Di^a puede ser mayor en regiones de América del sur, es así que en la población Kaingangues propia de la región de Santo Domingo, Cabo Verde, en Brasil la prevalencia asciende hasta el 45,8 % (Junqueira, 2002).

La identificación y localización de donantes de sangre portadores del antígeno Diego es de gran utilidad para los Bancos de Sangre debido a la relación existente entre este

antígeno y la producción de anticuerpos causantes de reacciones hemolíticas postransfusionales, el estudio realizado en Guatemala determinó que el 3,5% de pacientes politransfundidos presentaron anticuerpos anti-Di^a, a pesar de no ocasionar una reacción hemolítica severa inmediata constituye una de las causas de reacciones postransfusionales tempranas siendo estas de difícil detección de tal manera que una segunda transfusión incompatible podría ocasionar entonces una reacción hemolítica severa (Soyano & Müller, 2014). En este estudio se estableció que la provincia de Pichincha tiene una mayor prevalencia de antígeno Di^a en relación a las demás provincias, por lo que debe realizarse la identificación de este antígeno por ser el proveedor mayoritario de sangre a los centros de salud del país.

Otro aspecto considerado en esta investigación fue la frecuencia del antígeno Diego (Di^a) en relación al género determinándose una distribución similar entre hombres y mujeres y sus grupos etarios, estos datos constituyen una información relevante por la probabilidad de aloinmunización en mujeres en edad fértil, a pesar de que exista una prevalencia alta existe un porcentaje de mujeres carentes del antígeno, lo que podría ocasionar efectos adversos en una transfusión sanguínea incompatible e inclusive una enfermedad hemolítica del recién nacido. Layrisse, Arends y Domínguez fueron los investigadores que identificaron el primer caso de enfermedad hemolítica del recién nacido determinando que los eritrocitos del niño se encontraban sensibilizados por anticuerpos anti-Di^a provenientes de la madre (Junqueira P, 2002) (Soyano & Müller, 2014).

Posteriormente se estableció que el antígeno Diego que inicialmente fue considerado de baja prevalencia se ha convertido en un “marcador de poblaciones mongoloides de gran valor genético y antropológico” (Soyano & Müller, 2014). Varios estudios han establecido que el antígeno Diego forma parte de una proteína de la membrana de los eritrocitos que representa el 25% del total de proteínas eritrocitaria, es por esta razón que hoy es una de los antígenos que debe ser identificado en poblaciones con prevalencias altas. (Geoff D, 2013).

El tamizaje de anticuerpos irregulares o aloanticuerpos en donantes de sangre está dentro de los lineamientos de los estándares para bancos de sangre (Organización Panamericana de la Salud, 2011), sin embargo las células comerciales utilizadas para este fin no detectan aloanticuerpos del sistema Diego (BIO-RAD, 2013) (Sung Ha Mun, 2012) (Geoff D. , 2013), esto debido a que estas células son preparadas en países donde los antígenos Diego no son comunes, por lo tanto no es posible encontrar células con este fenotipo (Geoff D. , 2013). Por lo que es necesario introducir estos reactivos en

países con prevalencia de estos antígenos, así en Singapur el uso de células Di^a, permitió determinar la presencia de aloinmunización por el sistema Diego en 19 de 1383 muestras con resultados indeterminados en el panel de células comerciales (Xian EKC, 2011).

Estudios han determinado la presencia de aloanticuerpos anti-Di^a en donantes de sangre desde 0,02% hasta el 13,0% (Garg, Sharma, & Bharat, 2014), en esta investigación se detectó una prevalencia del 6% de anti-Di^a en donantes de sangre, mientras que en Texas en el área de Corpus Christi se reportó una prevalencia del 1,3% de aloanticuerpo anti-Di^a en individuos con transfusiones previas (Thompson, 2006), en Brasil se identificaron 112 (3,6%) pacientes con anti-Di^a, en Singapur se determinó una frecuencia del 1,37% (Geoff D. , 2013) (Xian EKC, 2011) y en el estudio realizado en Guatemala, se encontró una prevalencia del 3,5% de anti-Di^a en pacientes multitransfundidos (Gutiérrez, Lanz, Pérez Minera, & Castellanos, 2013).

Los anticuerpos anti-Di^a son generalmente de tipo IgG1 e IgG3 y está relacionado con enfermedad hemolítica del recién nacido (Geoff & Bromilow, 2010) En un estudio realizado en Brasil se determinó la presencia de anti-Di^a en mujeres en un 1,9% constituyendo un riesgo en caso de embarazo y/o trasfusión sanguínea, en dicho estudio Marcondones L. menciona la presencia de dos mujeres sensibilizadas por anti-Di^a durante el embarazo, sin embargo no tuvieron problemas los recién nacidos, esto debido al seguimiento realizado a lo largo del periodo natal, reforzando de esta manera la necesidad de realizar un tamizaje a mujeres de países con prevalencia de antígenos Diego (Marcandones Machado, y otros, 2007).

La presencia de anti-Di^a está directamente relacionado con reacciones hemolíticas transfusionales, un caso reportado en el año 2012, reportó la presencia de una reacción transfusional en una mujer luego de recibir 800 ml de sangre durante una cirugía, las pruebas pre transfusionales fueron negativas, sin embargo se suscitó síntomas relacionados a una hemólisis, estudios posteriores identificaron la presencia del aloanticuerpo anti-Di^a (Sung Ha Mun, 2012).

Finalmente, la inclusión del sistema Diego dentro de las pruebas de tamizaje de anticuerpos irregulares tanto en donantes de sangre como en pacientes multitransfundidos constituye un aspecto emergente debido a las características demográficas de la población ecuatoriana y al porcentaje de aloanticuerpos no identificados que existen en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana y bancos de sangre que realizan estas pruebas, además de que las células comerciales para tamizaje carecen de estos antígenos.

4.4 CONCLUSIONES

- Se identificó una prevalencia del 25% de antígeno Di^a en donantes de sangre ecuatorianos procedentes de 22 provincias ecuatorianas.
- Se estableció que el mayor porcentaje de donantes positivos para el antígeno Di^a se localizan en la provincia de Pichincha, Chimborazo, Loja y Manabí.
- La distribución para el antígeno Di^a positivo en donantes de sangre es común en hombres y mujeres.
- El porcentaje de donantes positivos para el antígeno Di^a presenta una distribución similar en los grupos etarios considerado en edad fértil.
- En los donantes de sangre ecuatorianos se determinó la presencia de un 6,09% de aloinmunización por anti-Di^a distribuido en las diferentes regiones ecuatorianas.
- No se encontró una relación significativa entre la presencia del aloanticuerpo y la procedencia de los donantes, existiendo provincias en las que no existen aloinmunización, es decir que la aloinmunización no depende del lugar de origen del donante de sangre.
- Se estableció que en la provincia de Manabí existe una aloinmunización del 31,82% por el anticuerpo anti-Di^a, mientras que en las provincias de Santo Domingo, Santa Elena, Napo, Azuay y Sucumbíos no se detectó este aloanticuerpo, por lo que no existe una significancia estadística en la relación de aloinmunización y procedencia.
- En relación entre el género y aloinmunización se identificó que el 6,30% de mujeres presentan un anti-Di^a constituyendo un factor de riesgo durante el embarazo o al recibir sangre incompatible.
- De igual manera existe una aloinmunización en hombres del 5,52% indicativo de transfusiones incompatibles, a pesar de ello no existe una significancia estadística entre una aloinmunización y el género.
- Se identificó que el 40,91% de aloanticuerpos se encuentran distribuidos en el grupo etario considerado como la “edad fértil”, constituyendo un riesgo para que se produzca la enfermedad hemolítica del recién nacido tomando en consideración que la distribución del antígeno Di^a es similar en el género femenino y masculino.

4.5 RECOMENDACIONES

- Al determinarse una prevalencia del 25% de antígeno Di^a se recomienda establecer una tipificación completa antes de realizar una transfusión sanguínea, especialmente en los bancos de sangre de las provincias de Pichincha, Manabí, Loja y Chimborazo por ser los distribuidores de productos sanguíneos a diferentes centros de salud el país.
- Al igual que en otros estudios en los que se ha determinado la presencia de aloinmunización se recomienda la tipificación extensiva, especialmente dirigida a identificar los grupos sanguíneos más prevalentes y clínicamente significativos.
- También se recomienda al sistema nacional de sangre que se prevea cambios en las normativas de seguimiento a mujeres embarazadas dentro del Programa de Maternidad Gratuita, especialmente en aquellas provincias donde se reportaron la existencia de aloanticuerpos del sistema Diego (Di^a).
- Se recomienda que todos los donantes que presentan aloanticuerpos indeterminados o no identificados se sometan a pruebas de detección de anticuerpos Di^a para prevenir reacciones transfusionales o enfermedad hemolítica del recién nacido en el caso de donantes mujeres.

BIBLIOGRAFÍA

- AABB. (2014). *Standards for Blood Banks and Transfusion Services* (Vigésimo novena ed.). American Association of Blood Banks.
- Almonacid, A. A. (2014). *Recomendaciones para la detección e identificación de anticuerpos irregulares eritrocitarios*. Ministerio de Salud Gobierno de Chile. Santiago de Chile: Instituto de Salud Pública.
- Alves de Lima. (1982). Caracterización de un anti-Di (a) de anticuerpos que causan la enfermedad hemolítica en el recién nacido. . *Transfusión* , 246-247.
- Arreygue Avila, M. (2011). DETERMINACION DE LOS ALELOS PRINCIPALES DE LOS GRUPOS SANGUINEOS DUFFY Y DIEGO. *Tesis*, México <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8443/DETERMINACION%20DE%20LOS%20ALELOS%20PRINCIPALES%20DE%20LOS%20GRUPOS%20SANGUI.pdf?sequence=1>.
- Asociación Americana de Bancos de Sangre. (2012). *Manual Técnico* .
- Baleotti, W. (2003). A novel Di*a allele without the Band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. *Vox Sang*, 326-330.
- Baleotti, W., Rui, M., Fabron, A., Castilho, L., Giuliatti, S., & EA., D. (2014). HLA-DRB1*07:01 allele is primarily associated with the Diego a alloimmunization in a Brazilian population. *Transfusion*, 2468-76. doi: 10.1111/trf.12652.
- Baptista, H., Hernandez, J. A., Galindo, P., Santamaría, C., & Rosenfeld, F. (2009). Utilidad de la Prueba Directa de Coombs en el Tamiz Neonatal. *Revista Médica del Hospital Mexicano Infantil*, 66, 502-510.
- Barrera Andocilla, M. F. (2011). *Incompatibilidad sanguínea materno fetal en recién nacidos atendidos en el servicio de neonatología atendidos en el hospital José María Velazco Ibarra Tena Enero-Junio 2010*. Escuela Superior Técnica de Chimborazo, Riobamba.

- Bhutani, V., Zipursky, A., Blencowe, H., Khanna, R., Sgro, M., Ebbesen, F., . . . Kumar, P. (2013). neonatal hyperbilirubinemia and rhesus disease of the newborn: incidence and impairment estimates for 2010 at regional and global levels. *International Pediatric Research Foundation, Pediatric RESEARCH*, 86-100.
- BIO-RAD. (12 de 07 de 2013). Set DiaPanel:45241.45x. *DiaPanel*. Switzerland, Cressier FR.
- Buelvas Cortez, A., Muñoz-Díaz., & León de Gonzáles, G. (2014). *Inmunohematología básica y aplicada*. Colombia: Feriva ISBN 978-958-46-4106-9.
- Collin, P. (2014). *Dictionary of Medicine*. New York: Routledge.
- Costa Nunes da Cunha Cozac, A. P. (2004). Estudio Do polimorfismo do sistema Sangüíneo Diego em Populações de Brancos, Asiáticos, Negros, Índios e Doadores de Sangue da Região de Ribeirão Preto. *Tesis*, Repositorio de Tesis:http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/pdf/dissert_anacozac.pdf.
- Daniels, G. (2002). *Human Blood Groups* (Tercera ed.). USA: Wiley-Blackwell
- De Alarcón, P., Werner, E., & Christen, R. (2013). *Neonatal hematology: pathogenesis, diagnosis, and management of hematologic problems* (Segunda ed.). New York: Cambridge.
- Dorland. (2011). *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Federal, G. (2010). *Prevención, Diagnóstico y Manejo de la Aloinmunización Materno-Fetal*. México.
- Figueroa, D. (2013). The Diego blood group system: a review. *Inmunohematology*, 29(2), 73-81.
- Futagawa, Y., Wakiyama, S., MatsumotoM, Shiba, H., Gocho, T., & Ishida, I. a. (2013). Living-related Liver Transplantation in Diego Blood Group Disparity:A case report. *Transplantation Proceedings*, 45, 814–816://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.07.156.
- Garg, N., Sharma, T., & Bharat, S. (2014). Prevalence of irregular red blood cell antibodies among healthy blood donors in Delhi population. *Transfusion and Apheresis Science*, 50: 415-417.

- Garibay Escobar, A. (2006). *Manual de practicas de inmunología*. Hermosillo: UniSon.
- Genetics home references. (Published: February 16, 2015). *National Library of Medicine*, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLC4A1>.
- Geoff, D. (2013). *Human Blood Groups_Capítulo 10 Diego Blood Group Systems* (Vol. 3era edición). USA: Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-4443-3324-4.
- Geoff, D., & Bromilow, I. (2010). *Essential Guide to Blood Groups*. Oxford: Wiler-Blackwell ISBN:978-1-44433530-9.
- Golfed, J. (2014). *Microtécnica de Alutinação en Gel*. Banco Nacional de Sangre. Montevideo: Servicio Nacional de Sangre.
- Gottlieb, A. (1971). Hemolytic disease of the newborn due to anti-Dib. *Vox Sang* , 79-80.
- Gutiérrez, J., Lanz, K., Pérez Minera, A., & Castellanos, P. &. (2013). Frecuencia del antígeno Dia en donantes y de anticuerpos anti-Dia en pacientes de Hospitales Públicos y del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social. *Revista de transfusión sanguínea*, 255-25 ID 9727289.
- Hundric-Haspl, Z., & Sanja Balen-Marunic, E. T.-S.-S. (2003). Anti-Diegoa Red Blood Cell Alloantibody as a Possible Cause of Anemia in a 3-Week-Old Infant. *Archives of Medical Research-Elsevier*, 149–151 doi:10.1016/S0188-4409(02)00469-1.
- INEC. (2010). *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos*. Obtenido de Resultados del censo 2010: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/resultados/>
- ISBT. (2004). *Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens*. Blackwell Publishing.
- Jarolim, P. (1998). Characterizacion of Seven Low Incidence Blood Group Antigens Carried by Erithrocyte Band 3 Protein. . *Blood* , 4836-4843.
- Junqueira, P. (2002). The history od Diego blood group. *Revista Brasileira de Hematología y Hemoterapia*, 15-23. doi:10.1590/s1516-84842002000100004
- Lin, Y., Pavenski, K., Saidenberg, E., & Branch, D. (2009). Blood Group Antigens and Normal Red Blood Cells Physiology: a Canadian Blood Services Research and Development Symposium. *Transfusion Medicine Reevews*, 23, 292-3309.

- Lopez, M. d., & Cortina, L. (2000). Enfermedad Hemolítica Perinatal. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16(3), 161-183.
- Luna-Gonzales, J. (2005). Anticuerpos Irregulares, su importancia en medicina transfusional. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 43(1), 17-20.
- Marcandonnes Machado, L., Nardoza, L., Fernandez Moron, A., Alexander Chinen, P., Guilherme, R. L., & Araújo Junior, E. (2007). Anti-Diego alloimmunization: report of two cases. *Arch Gynecol Obstet*, 275:495–497 DOI 10.1007/s00404-006-0282-4.
- Martin, E. (2010). *Concise Medical Dictionary*. New York: Oxford University Press .
- Marín, R.; Duarte, M. (1997). Fenotipos y genotipos del sistema Diego en Costa Rica. *Scielo- Revista Médica Cubana*
- Martínez, A., Alcazar, L., Arrazola, G., Suarez, C., Perez, R., Rivera, L., & Ambriz, F. (2009). Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la determinación del antígeno Diego (-b) utilizando iniciadores de secuencia específica. *Asociación Mexicana de Medicina Transfusional*, 1-10.
- Martínez, A., Rivero, R., & Fernández, N. (2015). Efectos adversos en la cadena transfusional en el Instituto de Hematología e Inmunología. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(3).
- Masouredis, Sudora, Mahan, & Victoria. (1980). Quantitative immunoferritin microscopy of Fya, Fyb, Jka, U, and Dib antigen site numbers on human red cells. *Blood*, 6(56), 969-977.
- Miyazaki, T., Sato, S., Kato, T., & Ikeda, H. (2000). Human anti-Dia monoclonal antibodies for mass screening. *Immunohematology*, 16(2), 78-81.
- Mun, S., & Lee, S. &. (2012). A case of acute hemolytic transfusion reaction due to anti-Dia antibody -A case report. *Korean Journal of Anesthesiology*, 63(4), 353–356. doi:10.4097/kjae.2012.63.4.353.
- Nardoza, L., Camano, L., Fernandes Moron, A., Chinen, P., Lobo, G., Araújo, & E., J. (2007). Anti-Diego alloimmunization: report of two cases. *Arch Gynecol Obstet.*, 275:495-497 doi 10.1007/s00404-006-0282-4.

- NCBI. (02 de Marzo de 2012). *National Center of Biotechnology Information* . Recuperado el 28 de Febrero de 2014, de Diego Blood Group System : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/rbc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmut/systems_info&system=diego
- NHGRI. (20 de Febrero de 2014). *National Human Genome Research Institute* . Recuperado el 12 de Marzo de 2014, de Glosario Hablado de Términos Genéticos : <https://www.genome.gov/GlossaryS/index.cfm?textonly=&search=alelo+>
- O'Connell, S., Bare, B., Hinkle, J., & Cheever, K. (2010). *Brunner & Suddarth's Textbook of Medical-surgical Nursing* (Doceava ed., Vol. 1). Lippincott Williams & Wilkins.
- Organización Panamericana de la Salud. (2011). Estándares de trabajo para servicios de sangre. OPS, Washington.
- Ortega, J. J. (2004). Anemias hemolíticas. *An Pediatr Contin.* , 2:12-21. - Vol. 2 Núm.1.
- Park, T., Oh SH, C. J., Lee, D., Kim, H., Chang CL, L. E., & HC., S. (2003). The clinical significance of antibody screening test including Dia+ panel cell in Asian-Mongoloid populations. *J korean Med Sci*, 18(5):669-72.PMID: 1455818.
- Pham, B., Roussel, M., Gien, D., Andre-Botte, C., Ripaux, M., Auxerre, C., & Le Penneç, P. (2013). Molecular analysis of patients with weak D and serologic analysis of those with anti-D (excluding type 1 and type 2). *Inmunohematology*, 29(2), 55-62.
- Reid, M., Lomas-Francis, C., & Olson, M. (2012). *The Blood Group Antigen* (Tercera ed.). Oxford: Academic Press.
- Ruiz, G., Moreno, M., López, M., & Vega, M. (2007). *Anticuerpos Monoclonales Terapéuticos, Informe de Vigilancia Tecnológica*. España: Genoma.
- Sawada, T., Kubota, K., Kita, J., Furihata, T., Iso, Y., Kato, M., . . . Shimoda, M. (2007). Liver transplantation in Diego blood disparity: a case report. *Transplantation*, 27;83(4):510-3 PMID: 17318085.
- Silva, C., George, A., & Hirtsch, I. (2004). Aloanticuerpos anti-Diego (a) en el embarazo. *Bras. Hematol. Hemoter.*, 26(4), 285-287.


- Soyano, A. &. (2014). El antígeno Diego alcanza los 60 años de edad: su descubrimiento y desarrollo. *Gac Méd Caracas*, 122(1):46-52 disponible en:http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=99616&id_seccion=4598&id_ejemplar=9715&id_revista=297.
- Squires, A., Nasef, N., Lin, Y., Callum, J., Khadawardi, E., Drolet, C., . . . Simmons, B. (2012). Hemolytic Disease of the Newborn Caused by Anti-Wright (Anti-Wra): Case Report and Review of the Literature. *Neonatal Network*, 69-80(12) dx.doi.org/10.1891/0730-0832.31.2.69.
- Storry, J. (2014). *Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology*. International Society of Blood Transfusión, Seoul.
- Sung Ha Mun, S. H. (2012). A case of acute hemolytic transfusion reaction due to anti-Dia antibody-A case report-. *Korean J Anesthesiol*, 63(4): 353-356 dx.doi.org/10.4097/kjae.2012.63.4.353 .
- Sun Min Lee, Sun Ju Im, Su Eun Park, Eun Yup Lee, & Hyung Hoi Kim. (2007). A Case of Severe Hemolytic Disease of the Newborn Due to Anti-Dia Antibody. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 27(2), 373-376. doi:10.3343/kjlm.2007.27.5.373
- Thompson, C. (2006). Diego(a) antigen frequency and anti-Diego(a) frequency in a South Texas community. *Clinical Lab Sci*, 19(4):203-5 PMID: 17181123.
- Trujillo, E. (2012). Sistema Diego, Inmunógenos que nos Hermanan. *Grupo Iberoamericano de Medicina Transfusional* .
- Ulloa, A., & Chiriboga, R. (2012). *Análisis retrospectivo de la frecuencia y tipo de anticuerpos irregulares en donantes voluntarios de sangre en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana*. Quito.
- Wei, C. T., Al-Hassan, F., Naim, N., & Knight, A. &. (2013). Prevalence of Diego blood group antigen and the antibody in three ethnic population groups in Klang valley of Malaysia. . *Asian Journal of Transfusion Science*, 7(1), 26–28. doi:10.4103/0973-6247.106725.
- Xian EKC, Y. M. (2011). To assess the number of cases of anti - Di a in Singapore and its importance to incorporate into antibody screening panel. *Transfusion*, 51 (Suppl):136A – 137A.

ANEXOS

Anexo 1: Hoja del donante, incluye consentimiento informado

Grupo Sanguíneo

SECRETARÍA NACIONAL DE BANCOS DE SANGRE



BANCO DE SANGRE

FECHA

URNO N.º

CIUDAD

PROVINCIA

Estimado donante le agradeceremos por su gesto solidario al acercarse a dar su sangre de manera altruista voluntaria para ayudar a salvar hasta 4 vidas por cada donación. De la información que usted honestamente nos brinde depende la seguridad de la sangre que nosotros entregamos a quien lo necesita. Es por esto que a su sangre se le realizarán algunas pruebas de laboratorio para investigar la presencia de posibles enfermedades e infecciones transmisibles por la sangre. Le recordamos que nuestro compromiso es mantener absoluta reserva y confidencialidad de la información que obtenemos del cuestionario, chequeo medico, interrogatorio y pruebas de laboratorio.

Si usted cree que su sangre no debe ser usada, por favor comuníquese a quien lo examine para mayor información o tome usted la decisión de no donar. También debe saber que es posible que alguna parte de su sangre no sea usada y que podría desecharse. Si usted ha decidido ser donante, tenga la seguridad que su sangre esta bien utilizada.

BIENVENIDO AL GRUPO DE DONANTES VOLUNTARIOS ALTRUISTAS Y REPETITIVOS QUE SALVAN VIDAS

▶ DATOS PERSONALES

Apellidos	Nombres
Estado civil	Lugar y Fecha de Nacimiento
CI o pasaporte	Lugar y dirección de su domicilio
Ocupación	Lugar y dirección de su trabajo
Edad	Teléfono /Celular
E-mail	Sexo

▶ CUESTIONARIO

El objetivo de este interrogatorio al que usted se somete voluntariamente, pretende preservar la salud del enfermo que recibe su sangre.

		DIA	MES	AÑO	
1 Indique la fecha y lugar de su última donación _____ Ciudad _____					1
2 ¿ Esta usted dispuesto a donar sangre ? _____	SI		NO		2
3 ¿ Ha sido impedido de donar sangre alguna vez? _____	SI		NO		3
4 ¿ Ha sufrido algún pinchazo o corte con objetos cortopunzantes en los últimos 12 meses? _____	SI		NO		4
5 ¿ Ha tenido Hepatitis, se han puesto sus ojos o piel amarillos (ictericia) o ha estado en contacto con pacientes con hepatitis ? _____	SI		NO		5
6 ¿ Usted o su pareja recibieron sangre o componente, o transplante de órganos en los últimos doce meses? _____	SI		NO		6
7 ¿ Se ha hecho tatuajes, orificios, piercings, maquillaje permanente, acupuntura o mesoterapia en los últimos doce meses? _____	SI		NO		7
8 ¿ Ha tenido Dengue, Paludismo o Chagas? _____	SI		NO		8
9 ¿ Ha estado en tratamiento dental en los últimos tres días? _____	SI		NO		9
10 ¿ Ha recibido algún medicamento en el último mes ? _____	SI		NO		10
11 ¿ Ha tomado Aspirina, analgésicos y/o antiinflamatorios en los últimos tres días ? _____	SI		NO		11
12 ¿ Sufre de ataques epilépticos, mareos o pérdida de conocimiento ? _____	SI		NO		12
13 ¿ Presenta al momento alguna alergia ? _____	SI		NO		13
14 ¿ Sufre de los pulmones, riñones, hígado, sangre, corazón u otros ? _____	SI		NO		14
15 ¿ Sufre de diabetes, tuberculosis u otra enfermedad crónica? _____	SI		NO		15
16 ¿ Le han operado o realizado algún tipo de intervención o procedimiento médico en los últimos doce meses? _____	SI		NO		16
17 ¿ Usted o su pareja habitualmente consumen alcohol, tabaco, medicamentos o drogas? _____	SI		NO		17
18 ¿ Ha observado la presencia de nódulos, tumores o secas en alguna parte de su cuerpo? _____	SI		NO		18
19 ¿ Ha sido vacunado en los últimos doce meses? _____	SI		NO		19
20 ¿ Tiene usted vida sexual activa? _____	SI		NO		20
21 ¿ Ha estado detenido en alguna cárcel en los últimos doce meses? _____	SI		NO		21
22 ¿ Ha estado fuera del país en los últimos doce meses? _____	SI		NO		22
23 ¿ Tuvo o fue tratado de sífilis o gonorrea en los últimos doce meses? _____	SI		NO		23
24 ¿ En los últimos doce meses le pagó a alguien para tener relaciones sexuales? _____	SI		NO		24
25 ¿ En los últimos doce meses tuvo relaciones sexuales con alguien que usaba drogas? _____	SI		NO		25
26 ¿ Alguna vez recibió dinero o drogas para tener relaciones sexuales? _____	SI		NO		26
27 ¿ En los últimos doce meses tuvo usted o su pareja relaciones sexuales con otras personas? _____	SI		NO		27
28 ¿ Recibió usted dinero o alguna compensación para donar sangre? _____	SI		NO		28
29 ¿ Ha recibido hormona de crecimiento o tuvo usted o algún pariente la enfermedad de Creutzfeld-Jacob(enfermedad de vacas locas)? _____	SI		NO		29
30 ¿ Dona usted sangre solamente para que se le haga el análisis de VIH o SIDA ? _____	SI		NO		30
31 ¿ Leyó y comprendió este cuestionario y fueron contestadas todas las dudas al respecto? _____	SI		NO		31
EXCLUSIVAMENTE PARA MUJERES					
32 ¿ Está usted embarazada o da de lactar? _____	SI		NO		32
33 ¿ Fecha de su última menstruación? _____ día _____ mes _____ año _____	SI		NO		33

Yo, _____ declaro que la información confidencial que he proporcionado es verdadera y en caso contrario asumo toda responsabilidad. Además autorizo a que se realicen los exámenes necesarios, incluyendo VIH para el uso de mi sangre y estoy informado acerca de las reacciones indeseables que puedan presentarse con la donación de sangre. Para constancia de lo antes dicho, firmo.

.....

Firma del donante o huella digital

Número de cédula de identidad

MUCHAS GRACIAS. SU SANGRE NOS AYUDARA A SALVAR VIDAS.

FOS - 10

POSTDONACION O AUTOEXCLUSION

LUEGO DE LA INFORMACION RECIBIDA ¿ CONSIDERA USTED QUE SU SANGRE ES BUENA PARA

Anexo 2. Muestreo Aleatorio simple calculado en Excel, ejemplo n=100

40	80	94	48
13	15	78	63
99	69	12	38
18	1	50	67
60	27	96	4
65	62	12	49
79	76	11	68
78	46	40	51
91	31	10	29
54	77	87	20
81	40	84	96
40	63	97	43
87	11	26	19
50	1	50	96
55	20	45	45
56	43	24	73
73	14	29	89
36	41	62	64
38	38	56	18
100	57	26	67
93	74	75	71

Fuente: Base de datos del autor

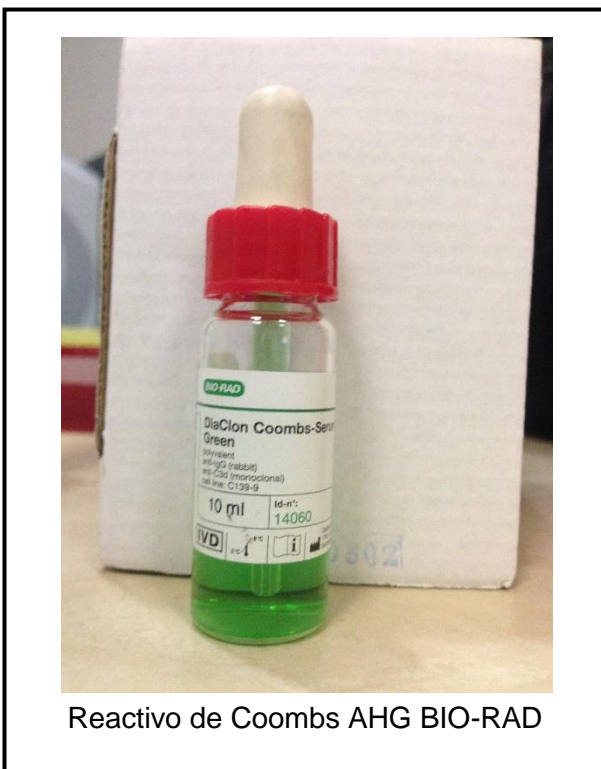
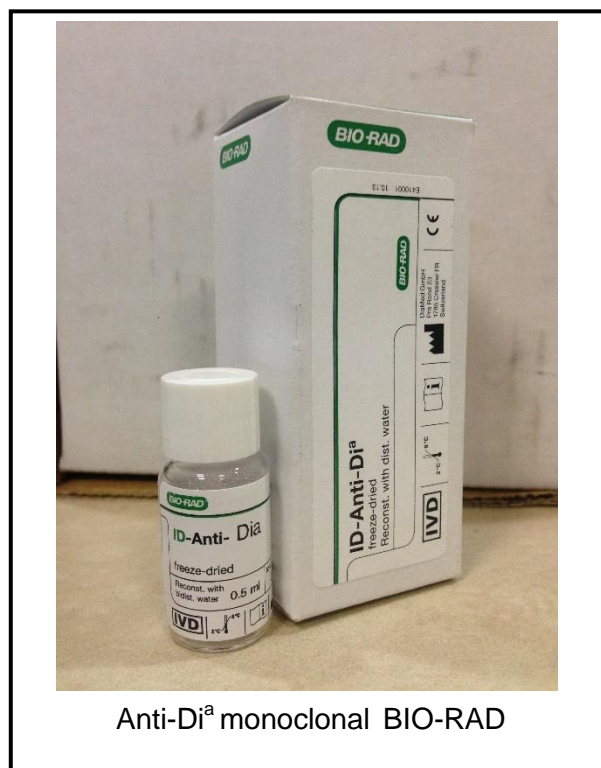
Anexo 3. Protocolo de control de calidad de células Diego y antisuero Diego

	potencia	afinidad	avidez
Anti-Diego (Di ^a)			
Valores de referencia AABB, 2012	Dilución máxima 1/32	Reactivo no diluido (++++ Grumo completo bien formado	Reactivo sin diluir (5 a 10 ⁷)

	Apariencia	afinidad	especificidad
Células Diego (Di ^a)			
Valores de referencia AABB, 2012	Trasparente Ausencia de hemólisis	Reactivo no diluido (++++ con anti-Di ^a)	Reactivo sin diluir Sólo reactividad con anti-Diego

Fuente: AABB, 2012

Anexo 4. Reactivos de Identificación para de antígenos y anticuerpos del sistema Diego e insertos



Inserto Células BIO-RAD Di^a Positivas

Test Cell Reagents for the ID-System

Español B004350 02.1
Reactivos de eritrocitos para detección de anticuerpos: ID-DiaCell I-II, ID-DiaCell I-II-III, ID-DiaCell IP-IIP-IIIIP (papainized), ID-DiaCell I-II-III Asia, ID-DiaCell Pool para identificación de anticuerpos: ID-Panel, ID-Panel-P antígenos especiales: ID-D^a (Diego) Positive, ID-I Negative Cell

INTRODUCCIÓN

La fiabilidad de los resultados de anticuerpos en gran parte depende de la disponibilidad de células reactivas con una dotación antigénica adecuada y de la sensibilidad de los métodos empleados.

Los criterios de selección o requerimientos de configuración antigénica de las células son rigurosos; deben asegurar la detección de todos los anticuerpos clínicamente significativos. Para el sistema Rh, MNS, Duffy y Kidd la dotación antigénica debe estar presente en forma homogota. Además, deben estar presentes los antígenos Lewis así como el raro antígeno Kp^a.

Tradicionalmente se consideraba que el procedimiento más efectivo para detectar todos los anticuerpos irregulares circulantes requería un escrutinio que combinara dos métodos, la aglutinina humana (AHG) y la prueba enzimática. Debido a los procedimientos, como ID-System y debido a la mayor sensibilidad de los pruebas de aglutinina indirecta (PAI) actuales, algunos científicos de distintos países consideran que el uso de pruebas enzimáticas puede ser menos importante.

Sin embargo, las técnicas enzimáticas son muy útiles cuando se requiere incrementar la sensibilidad del escrutinio de anticuerpos o cuando hay más de un anticuerpo circulante. Las enzimas potencian la reactividad de algunos anticuerpos, en especial los del sistema Rh, Kell y Kidd, mientras que los anticuerpos sensibles a las enzimas pueden ser no detectados, especialmente los de los sistemas Duffy y MNS.

Los reactivos celulares han sido especialmente preparados para el sistema ID-System.

REACTIVOS



Todos los eritrocitos de prueba son de origen humano, en un medio de suspensión tamponado al 0,8% (± 0,1%).
 Conservantes: los antibióticos Irinnetoprim y sulfametoxazol.

Para detección de anticuerpos en donantes individuales, grupo sanguíneo O:

ID-DiaCell I-II	R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ para prueba IAT y NaCl
ID-DiaCell I-II-III	R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ +rr para prueba IAT y NaCl
ID-DiaCell IP-IIP-IIIIP	papainizado, para técnica enzimática
ID-DiaCell Pool	R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ 12 tipos de eritrocito agrupados para análisis sistemático de donantes
ID-DiaCell I-II-III Asia	R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ +eritrocitos de fenotipo GPMUR, para IAT y para detección de aglutininas frías

Para identificación de anticuerpos en donantes individuales, grupo sanguíneo O:

ID-DiaPanel	11 tipos de eritrocitos de prueba para prueba IAT y NaCl
ID-DiaPanel-P	11 tipos de eritrocitos de prueba papainizados, para técnica enzimática

Antígenos especiales:

Estas células son para ser utilizadas como complementarias de otras células usadas rutinariamente en el escrutinio de anticuerpos.

ID-D^a (Diego) positivo
 Eritrocitos ID-I negativos
 Envío cada 4 semanas (pedido permanente).

Precaución: Los materiales utilizados en la elaboración de estos productos resultaron ser no reactivos para HBsAg, VHC y VIH (1-2) en pruebas con reactivos autorizados. Sin embargo, no se conoce ningún método de prueba que pueda garantizar completamente la ausencia de agentes infecciosos. Los productos derivados de sangre humana deben considerarse como potencialmente infecciosos.



Estabilidad: véase fecha de caducidad en la etiqueta.

REACTIVOS ADICIONALES NECESARIOS

- * Tarjeta ID-Card "USS Coombs + Enzyme Test" con 3 microtubos que contienen suero polispecifico antiaglutinina humana (AHG) para IAT en el interior de la matriz de gel, y 3 microtubos con gel neutro para técnica enzimática (Id-no: 50881).
- * Tarjeta ID-Card "USS/Coombs" con 6 microtubos que contienen suero AHG polispecifico en la matriz de gel para IAT (Id-no: 50831).
- * Tarjeta ID-Card "Coombs Anti-IgG" con 6 microtubos que contienen anti-IgG de conejo en la matriz de gel para IAT (Id-no: 50549).
- * Tarjeta ID-Card "NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins" con 6 microtubos que contienen gel neutro para técnica enzimática o prueba NaCl (Id-no: 50520).
- * Tarjeta ID-Card "Reverse Grouping with Antibody Screening" con 3 microtubos que contienen gel neutro y 3 microtubos que contienen suero polispecifico antiaglutinina humana (AHG) para IAT en el interior de la matriz de gel (Id-no: 50510).
- ID-Diluent 2: LIS modificada para suspensiones de eritrocitos (Id-no: 50761).

(véase el prospecto correspondiente)

OTROS MATERIALES NECESARIOS

- ID-Dispenser
- ID-Pipettor
- ID-Tips (puntas para pipeta)
- ID-Working table (superficie de trabajo)
- Tubos de suspensión
- ID-Incubator 37°C
- ID-Centrifuge (centrífuga) 6, 12 o 24

MATERIAL DE LA MUESTRA

Para un resultado óptimo, la determinación debe realizarse con una muestra recién extraída, o cumpliendo la normativa local del laboratorio en cuanto a criterios de aceptabilidad de las muestras. Preferiblemente, las muestras de sangre deben recogerse utilizando citrato, EDTA o CPD-A como anticoagulante. También es posible utilizar muestras recogidas en tubos sin anticoagulante.

Test Cell Reagents for the ID-System

Español B004350 02.1

CONTROLES

Deben incluirse muestras conocidas de acuerdo con las normas de garantía de calidad aplicables.

USO DE LOS ERITROCITOS DE PRUEBA ID

- Todos los reactivos de eritrocitos de prueba están destinados exclusivamente al uso con las tarjetas ID-Card del "ID-System" de Bio-Rad.
- Siga estrictamente los procedimientos descritos en los correspondientes folletos de las tarjetas ID-Card utilizadas.
- Los eritrocitos siempre deben resuspenderse suavemente invirtiendo el frasco varias veces antes del uso, y también antes de colocar los frascos en un pipeteador automático.
- Asegúrese de que los eritrocitos de prueba se emplean a temperatura ambiente (18-25°C).
- Durante las tareas de análisis, compruebe que los eritrocitos de prueba se mantienen en suspensión. Si se produce una precipitación, resuspenda los de nuevo.
- En el sistema ID es importante la máxima precisión en el pipeteo. Utilice los dispositivos ID-Pipetors para el pipeteo en serie.
- Evite la contaminación de los eritrocitos de prueba.
- Al registrar las reacciones, asegúrese de que el número de lote de la tabla de antígenos se corresponde con el número de lote de los frascos de reactivo.
- Después del uso, cierre los frascos e introdúzcalos de nuevo en el frigorífico.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Principio [2]

Positivo: La hematie aglutinadas forman una línea roja sobre la superficie del gel o están repartidas en el gel.

Negativo: Sedimento compacto de hematies en el fondo del microtubo.

Nota: Las células reactivas para escrutinio de anticuerpos que contienen una mezcla o „pool“ de células pueden dar reacciones de doble población, según el anticuerpo presente en la muestra. Esta reacción debe ser considerada como un resultado positivo.

B) Reacciones

véanse los prospectos correspondientes

LIMITACIONES

- La contaminación de los materiales empleados, bacteriana o de otro tipo, puede provocar falsos positivos o falsos negativos.
- Es esencial adherirse estrictamente a los procedimientos y equipos recomendados. El equipo debe comprobarse periódicamente según la normativa de prácticas de laboratorio correctas GLP.

BIBLIOGRAFÍA

- Technical Manual of the American Association of Blood Banks, 13th edition, 1999.
- Laperre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reaction. *Transfusion* 1990;30:109-113.

PRODUCTOS

ID-DiaCell I-II-III (Id-no: 45184)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ -rr)	3 x 10 ml REF 004310
ID-DiaCell I-II-III (Id-no: 45404)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ -rr)	3 x 5 ml REF004304
ID-DiaCell I-II-III Asia (Id-no: 45330)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ -GPMUR)	3 x 10 ml REF 003614
ID-DiaCell IP-IIP-IIIIP (Id-no: 45194)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ -rr papainized)	3 x 10 ml REF 005310
ID-DiaCell IP-IIP-IIIIP (Id-no: 45414)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄ -rr papainized)	3 x 5 ml REF 005304
ID-DiaCell I-II (Id-no: 45151)	Juego de 2 frascos (R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄)	2 x 10 ml REF 003613
ID-DiaCell Pool (Id-no: 06070)	2 tipos de eritrocitos combinados (R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄)	1 x 10 ml REF 003630
ID-DiaCell Pool (Id-no: 06070)	2 tipos de eritrocitos combinados (R ₁ R ₂ +R ₃ R ₄)	3 x 10 ml REF 003631
ID-DiaPanel (Id-no: 45161)	Juego de 11 frascos	11 x 4 ml REF 004114
ID-DiaPanel-P (Id-no: 45171)	Juego de 11 frascos	11 x 4 ml REF 004214
ID-D ^a (Diego) Positive (Id-no: 05980)	Juego de 11 frascos	1 x 10 ml REF 004134
ID-I Negative Cell (Id-no: 06291)		1 x 1,6 ml REF 004111

Se garantiza que estos productos se comportarán según lo descrito en la etiqueta y en la hoja de instrucciones. El fabricante declina toda responsabilidad en caso de que los productos se utilicen o vendan para cualquier otro uso diferente de los allí descritos.

Cambios en la versión 05.11 están sombreadas en gris.



BioMed GmbH
 Pra Rond 23
 1785 Cressier FR
 Suiza



Fuente BIO-RAD

Inserto Anti-Di^a monoclonal BIO-RAD

ID-Test Sera

Español

B007390 09.13

Determinación de antígenos de alta y baja frecuencia con sueros de prueba-ID para prueba de antiglobulina indirecta (IAT) con la tarjeta ID-Card "LISS/Coombs"

INTRODUCCIÓN

Cuando existe sospecha o certeza de la especificidad de un aloanticuerpo en la muestra de sangre de un donante o de un paciente, debe tiparse esos hemáties con un antisuero apropiado y confirmar la ausencia del antígeno correspondiente. Para transfundir un receptor portador de un aloanticuerpo conocido, se requiere cruzar unidades de sangre carentes del antígeno correspondiente al anticuerpo identificado. La determinación de antígenos en los eritrocitos paternos o fetales también puede ser importante para la evaluación y el seguimiento del riesgo para el feto en embarazos aloinmunizados.

Los sueros de prueba-ID Bio-Rad para prueba de antiglobulina indirecta (IAT) con la tarjeta ID-Card "LISS/Coombs" son sueros humanos que contienen anticuerpos incompletos, y están disponibles para los siguientes antígenos:

Alta frecuencia		Baja frecuencia	
Vel	99,99%	Co ^a	8,63%
U	99,99%	Vi ^a	< 0,01%
Xg ^b	99%	Wt ^a	< 0,01%
	86%	Js ^a	0,181%
Js ^b	89%	Di ^a	0,01 a 36%
	100%		
	99%		

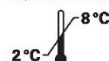
REACTIVOS



Sueros de prueba-ID, anticuerpos policlonales a partir de suero humano, liofilizados, en frascos de 0,5 ml. Conservante: < 0,1% NaNa.

- Anti-Co^a
- Anti-Vel
- Anti-Js^a
- Anti-Vi^a
- Anti-Js^b
- Anti-Xg^a
- Anti-Wt^a
- Anti-U
- Anti-Di^a

Precaución: los materiales utilizados en la elaboración de estos productos resultaron ser no reactivos para HBsAg, VHC y VIH (1+2) en pruebas con reactivos autorizados. Sin embargo, no se conoce ningún método de prueba que pueda garantizar completamente la ausencia de agentes infecciosos. Los productos derivados de sangre humana deben considerarse como potencialmente infecciosos.



Estabilidad: véase fecha de caducidad en la etiqueta.

REACTIVOS ADICIONALES NECESARIOS

- Tarjeta ID-Card "LISS/Coombs" con 6 microtubos que contienen suero antiglobulina humana polispecifico en la matriz de gel.
- ID-Diluent 2: LISS modificada para suspensiones de eritrocitos.

(véase el prospecto correspondiente)

OTROS MATERIALES NECESARIOS

- ID-Pipetor
- ID-Tips (puntas para pipeta)
- Tubos para suspensiones
- ID-Working table (mesa de trabajo)
- ID-Incubator 37 °C
- ID-Centrifuge 6, 12 o 24

MUESTRAS

Para un resultado óptimo, la determinación debe realizarse con una muestra recién extraída, o cumpliendo la normativa local del laboratorio en cuanto a criterios de aceptabilidad de las muestras. Preferiblemente, las muestras de sangre deben recogerse utilizando citrato, EDTA o CPD-A como anticoagulante. También es posible utilizar muestras recogidas en tubos sin anticoagulante.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Prepara una suspensión de eritrocitos al 0,8% en ID-Diluent 2 del modo siguiente: Deje que el diluyente alcance la temperatura ambiente antes de utilizarlo.

1. Pipetee 1,0 ml de ID-Diluent 2 en un tubo limpio.
2. Añada 10 µl de sedimento de hemáties y agite suavemente.

La suspensión de eritrocitos puede utilizarse inmediatamente.

PREPARACIÓN DE LOS ANTISUEROS

Reconstituya los sueros de prueba-ID con agua destilada (consulte el volumen en la etiqueta). Mezcle suavemente.

Estabilidad del reactivo después de ser reconstituido: 8 días entre 2-8 °C.

CONTROLES

Deben incluirse muestras positivas y negativas conocidas de acuerdo con las normas de garantía de calidad aplicables.

ID-Test Sera

Español

B007390 09.13

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

No usar las tarjetas ID-Card que muestren signos de desecación, burbujas en el gel, sellado defectuoso, gotas de gel o de sobrenadante en la parte superior de los microtubos o en la superficie interior del aluminio de sellado.

Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25 °C) antes de utilizarlos.

1. Identificar la tarjeta ID-Card con el número o nombre de identificación del donante o del paciente.
2. Retirar la lámina de sellado sólo de los microtubos que se vayan a utilizar manteniendo la tarjeta ID-Card en posición vertical.
3. Añada 50 µl de la suspensión de eritrocitos en el microtubo correspondiente de la tarjeta ID-Card.
4. Añada al microtubo 50 µl del suero de prueba-ID correspondiente al antígeno que se desea determinar.
5. Incube la tarjeta ID-Card durante 15 minutos a 37 °C en el ID-Incubator.
6. Centrifugue la tarjeta ID-Card durante 10 minutos en la ID-Centrifuge.
7. Lea y registre los resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Principio

Positivo: Los eritrocitos aglutinados forman una línea roja sobre la superficie del gel o aparecen dispersos en el gel.

Negativo: Sedimento compacto de eritrocitos en el fondo del microtubo.

B) Reacciones para antígenos de alta y baja frecuencia

Una reacción positiva (+ a +++) indica la presencia del correspondiente antígeno.

Una reacción negativa indica la ausencia del correspondiente antígeno.

OBSERVACIONES

Antes de determinar la presencia de un antígeno, hay que asegurarse que los hemáties en estudio no presentan un recubrimiento *in vivo* o *in vitro* por una fijación inespecífica de auto-anticuerpos o fracciones del complemento, que podrían reaccionar con la antiglobulina humana incluida en el gel, produciendo falsos positivos. Como control se realizará una prueba de antiglobulina directa (PAD), según se indica:

1. Marque el microtubo correspondiente de la tarjeta ID-Card "LISS/Coombs" con el nombre o número del paciente o el donante.
2. Quite el papel de aluminio de todos los microtubos que vaya a utilizar.
3. Pipetee en un microtubo 50 µl de la suspensión de eritrocitos (0,8% en ID-Diluent 2).
4. Centrifugue la tarjeta ID-Card durante 10 minutos en la ID-Centrifuge.
5. Lea y registre los resultados.

- Si la prueba PAD da un resultado negativo, se puede determinar el antígeno.
- Si la prueba PAD es positiva, lave los eritrocitos con suspensión salina isotónica o ID-Diluent 2 templada, u otras técnicas recomendadas, y después prepare la suspensión de eritrocitos con ID-Diluent 2. Seguidamente repita la prueba PAD.
- Si la prueba PAD se negativiza, ya se puede iniciar la determinación del antígeno.
- Si sigue siendo positiva, debe eluirse el autoanticuerpo mediante técnicas recomendadas antes de realizar la determinación del antígeno.

LIMITACIONES

- a) Las tarjetas ID-Card que muestren burbujas de aire en el gel o gotas en la parte superior de los microtubos y/o de la lámina de sellado, deben ser centrifugadas antes de usarse.
- b) Se sabe que algunos fármacos dan lugar a reacciones positivas en las pruebas que incluyen la antiglobulina humana.
- c) También se ha referido que algunos estados patológicos pueden provocar reacciones positivas en este tipo de pruebas.
- d) Los eritrocitos que hayan pasado a ser poliglutinables debido a la exposición de un criptotipígeno, por ejemplo antígeno T, tanto *in vivo* como *in vitro*, pueden reaccionar con todos los antisueros humanos. Estas reacciones deben investigarse adicionalmente.
- e) La contaminación de los materiales empleados, bacteriana o de otro tipo, puede provocar falsos positivos o falsos negativos.
- f) Los restos de fibrina en la suspensión de eritrocitos pueden atrapar los hemáties no aglutinados, de modo que aparezca una fina línea rosada en la parte superior del gel mientras que la mayoría de los eritrocitos se encuentran en el fondo del microtubo tras el centrifugado.
- g) Es esencial atenerse estrictamente a los procedimientos y equipos recomendados. El equipo debe comprobarse periódicamente según la normativa de prácticas de laboratorio correctas (GLP).
- h) El empleo de soluciones de suspensión distintas al ID-Diluent 2 puede modificar las reacciones.
- i) Las suspensiones de eritrocitos demasiado concentradas o demasiado diluidas pueden dar lugar a resultados aberrantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mollison, P.L., Engelbriet, G.P., Contreras, M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed. 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
2. Lapiere, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test: A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1996; 109-113.
3. Technical Manual: 11th ed. 1983; American Association of Blood Banks.

PRODUCTOS

ID-Anti-Co ^a	(Id-n°: 08900)	1 x 0,5 ml	REF 007440
ID-Anti-Js ^a	(Id-n°: 08840)	1 x 0,5 ml	REF 007400
ID-Anti-Js ^b	(Id-n°: 08860)	1 x 0,5 ml	REF 007390
ID-Anti-Wt ^a	(Id-n°: 09060)	1 x 0,5 ml	REF 007430
ID-Anti-Di ^a	(Id-n°: 09080)	1 x 0,5 ml	REF 007420
ID-Anti-Vel	(Id-n°: 09140)	1 x 0,5 ml	REF 007430
ID-Anti-Vi ^a	(Id-n°: 08840)	1 x 0,5 ml	REF 007450
ID-Anti-Xg ^a	(Id-n°: 08960)	1 x 0,5 ml	REF 007460
ID-Anti-U	(Id-n°: 08980)	1 x 0,5 ml	REF 007470

Se garantiza que estos productos se comportarán según lo descrito en la etiqueta y en la hoja de instrucciones. El fabricante declina toda responsabilidad en caso de que los productos se utilicen o vendan para cualquier otro uso diferente de los allí descritos.

Cambios en la versión 05.12 están sombreadas en gris.

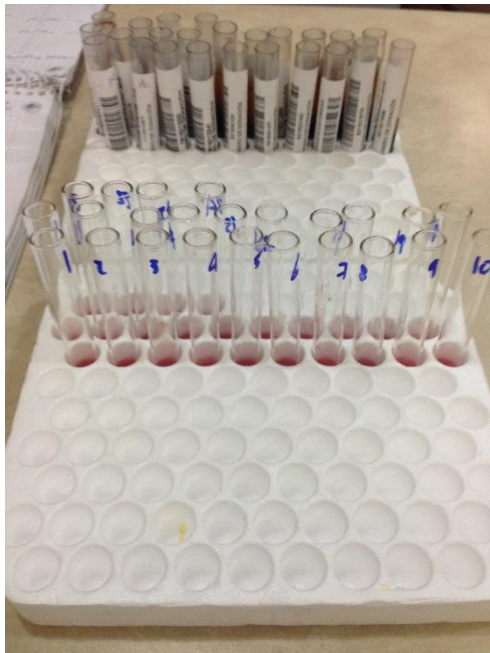


DiaMed GmbH
Pra Rond 23
1785 Cressier FR
Suiza



Fuente BIO-RAD

Anexo 5. Procesamiento de muestras



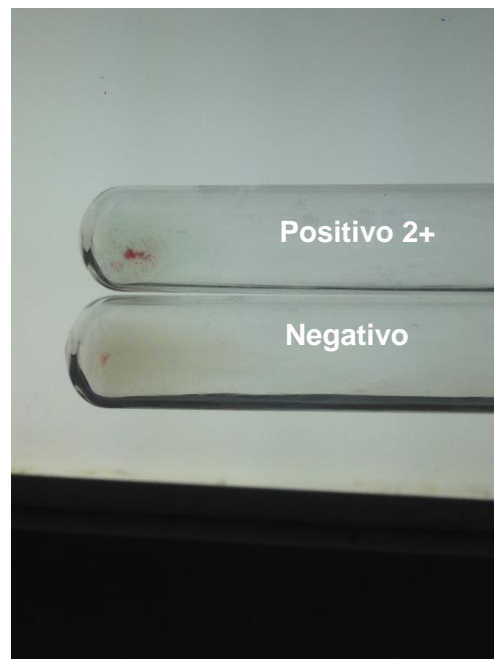
Rotulación y preparado de muestras



Periodo de incubación: 30 min - 37°C



Determinación de antígeno Di^a



Determinación de anticuerpo anti-Di^a

Anexo 6. Control de calidad de reactivos Anti-Di^a

