

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO EN LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS CLINICO

**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DETECCIÓN DE LOS
REACTIVOS MONOCLONALES Y POLICLONALES UTILIZADOS
PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO (D) EN TÉCNICA
DE TUBO QUITO, 2013”**

LUCIA YOMARA BENALCÁZAR RUÍZ

DIRECTORA: MST. ROSA CHIRIBOGA PONCE

QUITO, 2014

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, LUCÍA YOMARA BENALCÁZAR RUÍZ, C.I.; autora del trabajo de graduación intitulado: “DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DETECCIÓN DE LOS REACTIVOS MONOCLONALES Y POLICLONALES UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO D EN TÉCNICA DE TUBO QUITO, 2013”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN BIOANÁLISIS 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.

LUCÍA YOMARA BENALCÁZAR RUÍZ C.I: 100379535-6



Quito 2014

DEDICATORIA

A Dios, a mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero dar gracias a Dios por haberme llenado de bendiciones y permitirme culminar una etapa más de mi vida, por haberme dado una gran familia de la cual me siento orgullosa y han sido un gran ejemplo para mí.

Quiero dar mis infinitas gracias a mi familia que tanto quiero y aprecio, a mis padres por haberme inculcado la responsabilidad y darme su apoyo día tras día, las metas logradas es gracias a la perseverancia que me han enseñado y por su inmenso amor, a mis hermanos por ser un ejemplo a seguir, por guiarme en el transcurso de mi vida personal y profesional. Todo esto les debo a ellos y les dedico con todo el amor, ya que son mi pilar en todas las áreas de mi vida.

De manera muy especial quiero dar las gracias a la Master Rosita Chiriboga mi directora de tesis, por haberme brindado su amistad y su confianza, mil gracias por haberme dado su apoyo incondicional, ya que la realización de esta tesis no hubiera sido posible sin su guía y supervisión. La verdad las palabras hacen falta para poder agradecerle todo lo que ha hecho por mí, por las grandes oportunidades que me han sido brindadas, por su amistad, consejos personales, laborales, conocimientos académicos y enseñanzas. Mil gracias querida Rosita, le quiero mucho y le llevo dentro de mi corazón.

Así mismo un especial agradecimiento al Dr Mario Grijalva y al Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la PUCE, por haberme permitido realizar mi trabajo de disertación de tesis en tan prestigioso lugar , por hacerme parte de su equipo de trabajo y realizar mis primeras experiencias laborales. A las personas que trabajan en el CIEI por ser un ejemplo de superación y de responsabilidad profesional.

A mis amigos y amigas por ser los compañeros de cada experiencia y momentos compartidos por las aventuras realizadas juntos, por ser un apoyo grande para mantenerme en donde estoy gracias por su sincera amistad que me ha sido brindada.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINA
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Justificación.....	3
1.1 Planteamiento del problema	5
1.2 Objetivos.....	7
1.2.1 Objetivo general.....	7
1.2.2 Objetivos específicos	7
1.2.3 Limitación del estudio.. ..	7
CAPÍTULO II.....	8
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	8
2. Antecedentes.....	8
2.1. Sistema Rh.....	9
2.1.1 Nomenclatura del sistema Rh.....	10

2.1.2	Fenotipos del sistema Rh.....	11
2.1.3	Antígenos del sistema Rh.....	12
2.2	D débil.....	12
2.2.1	D débil secundario a la presencia del antígeno C.....	13
2.3.	Antígeno D parcial.....	14
2.3.1	Clasificación del fenotipo D parcial.....	15
2.4	Antígeno D elevado.....	15
2.5	Anticuerpos del sistema Rh.....	16
2.6	Reactivos para determinación del antígeno (D).....	16
2.7	Producción de reactivos para detección del antígeno D y sus variantes.	17
2.7.1	Reactivos Policlonales.	19
2.7.2	Reactivos Monoclonales.	19
2.7.3	Reactivos Blends	19
2.7.4	Reactivos en gel.....	20
2.8	Control de calidad de los reactivos anti-D.....	20
CAPÍTULO III.....		21
MARCO METODOLÓGICO.....		21
3.	Materiales y métodos.....	21
3.1	Tipo de Estudio.....	21
3.2	Tipo de Muestreo.....	21
3.3	Tamaño de Muestra.....	21
3.4	Criterios de inclusión.....	22
3.5	Criterios de exclusión.....	22
3.6	Operacionalización de variables	22

3.6.1	Variable dependiente.....	22
3.6.2	Variable independiente.....	22
3.7	Control de calidad.....	22
3.8	Análisis estadístico.....	22
3.9	Procedimiento.....	24
3.9.1	Fase uno.....	24
3.9.2	Fase dos.....	24
3.9.3	Fase tres.....	25
3.9.4	Fase cuatro.....	26
3.9.5	Fase cinco.....	26
CAPÍTULO IV.....		27
4.	Marco conceptual	27
CAPÍTULO V.....		29
5.	RESULTADOS	29
5.1	ESTUDIO PILOTO.....	29
5.2	POBLACIÓN ANALIZADA.....	32
6.	DISCUSIÓN	43
7.	CONCLUSIONES.....	47
8.	RECOMENDACIONES	48
9.	BIBLIOGRAFÍA.	49
10.	ANEXOS.....	53

Anexo 1: Ejemplo de la información que posee el inserto para el análisis de la composición, precauciones, proceso de detección y reporte de resultados.....	53
Anexo 2. Aidez: Tiempo esperado en que se inicie la aglutinación	56
Anexo 3: Título mínimo de potencia aceptada por AABB, 2012 y Escobedo 2012.....	57
Anexo 4: Afinidad: Valoración de la cantidad de aglutinación que se observe.	58
Anexo 5: Protocolo de estudio en tubo (Universal).....	59
Anexo 6: Parámetros que deben medirse de acuerdo a Dra. Elena Franco.....	60
Anexo 7: Procesos del Estudio	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Nomenclatura del sistema Rh.....	10
Tabla 2: Determinación de los genotipos Rh más probables y fenotipos de acuerdo con las pruebas efectuadas en los cinco reactivos principales de tipificación	11
Tabla 3: Clasificación de los individuos con fenotipo D parcial.....	15
Tabla 4: Composición de los reactivos utilizados en la caracterización de donantes.....	25
Tabla 5.1: Distribución de las casas comerciales y reactivos analizados.....	32
Tabla 5.2: Evaluación de las características físicas de los reactivos anti-D.....	33
Tabla 5.3: Composición de cada uno de los reactivos monoclonales y policlonales anti-D de acuerdo a las especificaciones de cada inserto	34
Tabla 5.4: Determinación de la avidéz de cada uno de los reactivos anti-D monoclonales y policlonales	35
Tabla 5.5: Determinación de la potencia de los reactivos policlonales y monoclonales anti-D.....	36
Tabla 5.6: Determinación de la afinidad y especificidad de los reactivos monoclonales y policlonales anti-D frente a células de fenotipo conocido Rh-Hr.....	39
Tabla 5.7: análisis del cumplimiento de los parámetros establecidos en la evaluación de la capacidad de detección de los reactivos anti-D	41

LISTAS DE FIGURAS

Grafico 1: Representación esquemática de la cantidad de antígeno D localizado en los glóbulos rojos	13
Grafico 2: Representación esquemática de la localización de epítopes del antígeno....	14
Grafico 5.1: Total de tipificaciones sanguíneas anuales realizadas por los laboratorios de referencia en el año 2013.....	29
Grafico 5.2: Tipo de metodología utilizada para la detección del antígeno D en los laboratorios de referencia	30
Grafico 5.3: Porcentaje de utilización de cada reactivo.....	30
Grafico 5.4: Respuestas a control de calidad de los reactivos en los laboratorios de referencia.....	31
Grafico 5.5: Total de reactivos analizados disponibles en el mercado.....	32

LISTA DE SIGLAS

- AABB: Asociación Americana de Bancos de Sangre
- MS-26: Líneas celulares de reactivos anti-D
- TH28: Líneas celulares de reactivos anti-D
- RUM-1: Líneas celulares de reactivos anti-D
- LDM3: Líneas celulares de reactivos anti-D
- ESD1: Líneas celulares de reactivos anti-D
- EDTA: Tetraacetato de etilendiamina
- Blend: Reactivo que contiene IgG e IgM
- EHFN: Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido
- RHT: Reacción Hemolítica Transfusional

RESUMEN

“Determinación de la Capacidad de detección de los reactivos monoclonales y policlonales utilizados para la identificación del Antígeno D en técnica de tubo Quito, 2013”.

Introducción: La correcta tipificación sanguínea es uno de los aspectos más importantes en laboratorios y Bancos de Sangre que se dedican a esta actividad y especialmente cuando se detecta el factor Rh (D), siendo este último de gran importancia por las consecuencias fatales que pueden producirse al emitir un resultado errado. El uso de reactivos adecuados y validados constituye la herramienta más efectiva para la obtención de resultados inequívocos de la presencia o ausencia del antígeno D, especialmente antes de una transfusión o en mujeres en edad fértil por la alta probabilidad de aloinmunización y/o reacciones pos transfusionales fatales. **Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo transversal mediante un muestreo aleatorio se analizaron un total de 10 reactivos disponibles en el mercado; los parámetros evaluados fueron de acuerdo a los protocolos establecidos por la Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012 y de la publicación realizada por la Dra. Franco, 2003; se evaluaron las características físico-químicas, potencia, avidéz, afinidad y especificidad; siguiendo un control de calidad en cada una de las etapas del proceso como lo recomienda el Manual Técnico (AABB, 2012).

Resultados: fueron analizados un total de 10 reactivos considerados en el mercado como monoclonales, sin embargo en el análisis de la composición se determinaron que 3 fueron policlonales, las líneas celular comunes en los reactivos monoclonales fue ESD1-LDM3; MS-26 y RUM; también se estableció la presencia de reactivos DUAL, se identificó que dos de las casas comerciales distribuye reactivos sin inserto constituyendo un problema en el momento de conocer las limitaciones, interferencia y recomendaciones realizadas por el fabricante ocasionando problemas en la detección del antígeno D parcial; la avidéz estaba dentro de los parámetros establecidos sin embargo la potencia fue >256 en los reactivos policlonales y dos duals, todos los reactivos demostraron especificidad. **Conclusiones y Recomendaciones:** Del análisis de la composición de los reactivos se determinó la presencia de potenciadores, tipo de anticuerpos y recomendaciones específicas para la detección correcta del antígeno D, por lo que es de suma importancia que las casas comerciales incluyan el inserto en cada lote de reactivos esto debe ser exigido por los usuarios; también es indispensable elaborar un protocolo de detección del antígeno D de acuerdo al reactivo adquirido esto facilitará al personal el uso adecuado del reactivo y evitar errores en la determinación del factor Rh; finalmente se recomienda establecer un control de calidad de los reactivos utilizados en la tipificación sanguínea siguiendo los protocolos establecidos por la AABB.

ABSTRACT

“Determination of the monoclonal and polyclonal detection capacity used for the identification of Antigen D by manual technique Quito 2013”

Introduction: Correct blood typing is a key aspect for Blood Banks and Laboratories that dedicate to this and, specially, when you identify Rh (D) factor, being this one so important because of the mortal consequences that it can carry when a misled result is reported. The use of right and validated reagents is the most effective tool to obtain unequivocal results of the presence or absence of Antigen D, specially before the blood transfusion or in fertile age women with high probability of alloimmunization and/or post fatal transfusion reactions. **Materials and Methods:** A transversal descriptive study was made by analyzing 10 different reagents available in the market using a random sampling; the parameters evaluated were set as established by the protocols in the American Association of Blood Banks, 2012 and Dra. Franco, 2003 published paper; physical and chemical characteristics, potency, avidity, affinity and specificity; following a quality control in each of the phases of the process as recommended in the Technical Manual (AABB, 2012). **Results:** were analyzed a total of 10 reagents considered in the market as monoclonal, however in the composition analysis it was determined that 3 of them were polyclonal, the common cell lines in the reagents were ESD1-LDM3; MS-26 and RUM; it was also established the presence of DUAL reagents, it was identified that two of the reagent in house was delivering reagents without the insert meaning a problem at the moment of knowing the limitations, interference and recommendations done by the manufacturer causing problems in the partial Antigen D detection; the avidity was between the established limits however the potency was >256 in polyclonal reagents and 2 duals, all the reagents showed specificity. **Conclusions and Recommendations:** From the composition analysis it was determined the presence of enhancers, antibody types and specific recommendations for the correct detection of Antigen D by which is very important that commercial houses include the work instructions in each one of the reagents batch which must be demanded by the users; also it is essential to elaborate a detection protocol for Antigen D according to the acquired reagent so it will help the staff to do a correct use of the reagent and mistakes of the identification of Rh factor; finally it is recommended to establish a quality control of the reagents used in blood typing according to the protocols established by the AABB.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes en los bancos de sangre y laboratorios que realizan tipificación sanguínea como parte de sus actividades constituye la correcta identificación del antígeno D, siendo de gran importancia por las consecuencias fatales que pueden producirse al emitir un resultado errado (Matos Bayeau, 2011). Por lo que la elección y uso de reactivos adecuados y validados constituye la estrategia más efectiva para la obtención de resultados inequívocos de la presencia o ausencia de este antígeno, especialmente antes de una transfusión o en mujeres en edad fértil (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

Los primeros reactivos fabricados provenían de sueros humanos previamente sensibilizados y estaban compuestos por anticuerpos de tipo IgG sumados a potenciadores que eran sustancias aditivas que aumentaban su potencia sin embargo, podían ocasionar resultados falsos positivos (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012). A partir de los años 80, se fabricaron reactivos monoclonales, estos se encontraban formados por anticuerpos específicos para un solo epítipo del antígeno D por lo que no detectarían a todas las variantes de D y por último se combinaron anticuerpos IgM monoclonal con IgG monoclonal o policlonal constituyendo estos reactivos en una de las alternativas utilizadas para la detección de todas las variantes del antígeno D (Credidio DC, 2011).

A pesar del uso de reactivos mejorados, existen errores en la tipificación del antígeno D ocasionando la presencia de personas sensibilizadas, como lo demuestra la investigación realizada por Andrea Ulloa, 2012 en la que se identificó la presencia de anticuerpos irregulares anti-D tanto en hombres como mujeres (Ulloa, 2009-2012). Estos resultados alertan al sistema nacional de sangre sobre la probabilidad de la presencia de antígeno D parciales o la escasa capacidad de detección de los reactivos anti-D distribuidos en Quito.

Es por esta razón, que se propuso en este estudio la determinación de la capacidad de detección de los reactivos anti-D metodología en tubo; por ser los reactivos utilizados en laboratorios y algunos bancos de sangre, el análisis de los datos obtenidos permitió

conocer las principales dificultades a las que se enfrentan los usuarios en el momento de la tipificación del antígeno D.

Es importante considerar que para una adecuada tipificación sanguínea existen aspectos inherentes al paciente, al analista de laboratorio, a la metodología utilizada y a los reactivos como lo mencionan los expertos en control de calidad tanto en Chile como España (Escobedo A, 2012) (Franco, 2003) a (Arturo Almonacid, Anabalón Soto, Celis Morales, & Ramírez Muñoz, 2012).

Lo más importante es considerar que en el inserto es la información que debe conocer el analista de laboratorio ya que en este instrumento se expresa la composición del reactivo, unión a potenciadores, tiempos de espera, limitaciones en la detección, cuidados y opciones en el diagnóstico final (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012) (Franco, 2003), sin embargo esto es subestimado por los laboratoristas y casas comerciales quienes distribuyen reactivos sin inserto, siendo uno de las fuentes de error para la obtención de resultados confiables. También es necesario evaluar las características de los reactivos como la apariencia física, parámetros como potencia, avidéz y especificidad de los anticuerpos que lo forman (Franco, 2003) (Escobedo A, 2012).

En el presente estudio se obtuvo resultados de potencia que demostraron la capacidad de detección y afinidad del anticuerpo en títulos altos de diluciones con reactivos policlonales, monoclonales y dual, demostrándose que los potenciadores incluidos en cada reactivo cumplían su función de enlace entre antígeno-anticuerpo; sin embargo la recomendación es no utilizar estos reactivos en casos de patologías como anemias hemolíticas, en presencia de aglutininas frías y factor roleaux; así también con los reactivos dual (IgG&IgM) cuya avidéz es considerada óptima y de acuerdo a AABB, 2012, en base a su protocolo de detección considerado como “universal” se recomienda confirmar todos los resultados negativos con la prueba de coombs indirecto para corroborar la presencia o ausencia del antígeno D débil (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

Por lo tanto, es indispensable que en Hemocentros, bancos de sangre, laboratorios clínicos y servicios de medicina transfusional, se implemente una validación de los reactivos utilizados en la detección de grupo sanguíneo y factor Rh, pruebas básicas para una persona y/o paciente por el riesgo de requerir una transfusión sanguínea en cualquier momento de su vida.

1. JUSTIFICACIÓN

La correcta tipificación sanguínea es uno de los aspectos más importantes en laboratorios y Bancos de Sangre que emiten resultados de grupos sanguíneos, no solo del sistema ABO sino del factor Rh (D), siendo este último de gran importancia por las consecuencias fatales que puede producir un resultado errado (Matos Bayeau, 2011).

Para determinar si una persona es Rh (D) positiva o (D) negativa depende de la presencia o ausencia del antígeno D; la capacidad para determinar este antígeno depende del reactivo escogido (Matos Bayeau, 2011). Un estudio realizado en Chile 2012, evaluó los reactivos anti-D con células de distinto fenotipo Rh y células comerciales determinando que los reactivos utilizados tenían parámetros adecuados en relación a su composición, potencia, especificidad y avidéz (Escobedo A, 2012). Este estudio fue la base para la implementación de una certificación formal de la calidad de los reactivos en los laboratorios de Banco de Sangre, en Chile.

La demanda por la calidad y seguridad en los resultados de laboratorios es una normativa solicitada por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador para la acreditación y funcionamiento de los laboratorios (Ministerio de Salud Pública). La normativa “Guías de buenas prácticas de laboratorio” hace referencia que deben realizarse los exámenes de una manera correcta para ello se requiere la metodología adecuada, reactivos en buen estado, y personal capacitado; además de mantener un control de calidad de todas las fases del proceso de análisis (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2012). Una de las exigencias del MSP es la obtención del registro sanitario del país reglamentación que se está comenzando aplicar de forma rigurosa. (Ministerio de Salud Pública, 2001). Del análisis realizado en las bases de datos del ARCSA se identificó 10 registros de reactivos para detección de grupo sanguíneo tanto para técnica manual como automatizada (Agencia nacional de regulación, Control y Vigilancia Sanitaria, 2014).

En el artículo denominado: “El control de la calidad de los análisis inmunohematológicos en la Región de las Américas” hace referencia a la calidad de los reactivos y señala que a pesar de adquirir reactivos que cumplan con las exigencias técnicas, estos deben ser evaluados y sometidos a controles diarios (Franco, 2003). Estos parámetros de evaluación son: composición, apariencia, reactividad, especificidad y avidéz (Franco, 2003).

Uno de los principales motivos para la evaluación de estos parámetros constituye la obtención y producción de los reactivos anti-D, lo que puede darse por medio de la

inmunización intencional en personas voluntarias e inmunocompetentes, de tal manera que se genere anticuerpo anti-D en proporciones adecuadas; otra forma de obtención del anti-D es de mujeres sensibilizadas durante el período de gestación de forma natural, siendo estos dos procesos una práctica común en la obtención de reactivos considerados policlonales (Mautor, 2005).

Por otro lado los reactivos monoclonales son obtenidos a partir de clones de células, lo que permite obtener anticuerpos anti-D que reconocen epítopes específicos del antígeno D. (Mautor, 2005). También se producen reactivos anti-D modificados químicamente, estos contienen albúmina bovina como potenciador de la reacción, que en algunos casos favorece la detección de antígenos débiles y en otros puede producir la presencia de resultados falsos positivos (Gonzales, 2000).

La composición de los reactivos anti-D determina la eficacia en la detección de antígenos D débiles, aspecto que debe ser comunicado a los usuarios en el inserto adjunto al reactivo; a pesar de que constituye un documento que debe ser entregado por las casas comerciales, los reactivos hemoclasificadores son vendidos sin insertos, esto imposibilita el reconocimiento de la composición que posee cada reactivo, debido a ello se determina que todos los reactivos son monoclonales; sin embargo, al analizar el inserto se establece que son policlonales (Reagents, 2013).

Por esta razón, los reactivos anti-D utilizados en laboratorios y/o Bancos de Sangre deben ser sometidos a un control de calidad antes de su utilización con la finalidad de establecer la capacidad de detección que garantice una tipificación inequívoca del factor Rh. (Reagents, 2013).

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falta de una determinación eficaz del antígeno-D puede ser causa de una inmunización indeseable y problemas transfusionales posteriores (Begoña Laiz Marro, 2004); esto se debe a su capacidad inmunogénica y su relación con la enfermedad hemolítica del recién nacido y anemia hemolítica autoinmune (Credidio DC, 2011). Por esta razón es de suma importancia su efectiva determinación ya que puedan obtenerse discrepancias durante las determinaciones rutinarias de laboratorio (Credidio DC, 2011). El estudio realizado en donantes de sangre en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, determinó la presencia de aloanticuerpos anti-D tanto a nivel de hombres como mujeres, en los 4 años de estudio se detectó 208 (35%) donantes aloinmunizados por este antígeno de un total de 587 positivos para diferentes aloanticuerpos, corroborando así la necesidad de determinar la capacidad de detección del reactivo anti-D como una de las posibles causas de esta aloinmunización. (Ulloa, 2009-2012).

Los anticuerpos anti-D que son utilizados en la fabricación de reactivos hemoclasificadores provienen de personas inmunizadas previamente y se caracterizan por ser de tipo IgG, conocidos como “incompletos” y denominados así por no producir aglutinación y requerir de potenciadores para que se produzca una reacción de aglutinación (Martín González Odalys, 2000). El uso de los potenciadores ocasiona que los eritrocitos sensibilizados in vivo como en el caso de pacientes con anemia hemolítica autoinmune produzcan resultados falsos positivos o negativos, y en muchas ocasiones pacientes Rh (D) parciales sean tipificados como (D) negativos; al ser donante, los derivados sanguíneos obtenidos podrían ser transfundidos a pacientes Rh (D) negativo y ocasionar una reacción postransfusional grave. Así también en el caso de poseer un Rh (D) parcial, al tener contacto con eritrocitos (D) positivos completos crean anticuerpos anti-D al reconocer los eritrocitos transfundidos como ajenos, debido a que la carencia de uno o más epítopes es suficiente para inmunizarlos (González et al, 2000).

En el año 2000, se probó la efectividad de un reactivo químicamente modificado, este reactivo lo obtuvieron al cambiar la configuración molecular de la inmunoglobulina G (IgG), logrando de esta manera una mayor accesibilidad a los sitios antigénicos presentes en los eritrocitos con antígeno débiles, con esta modificación se detectaron fácilmente este tipo de antígenos obteniendo una correcta tipificación en las personas portadoras de antígenos D débiles (Martín González, Díaz Hernández, & García Alonso, 2000). Se estima que entre el 30-85% de las personas que son Rh negativas han sido inmunizadas

tras una transfusión sanguínea ocasionada por errores al ser tipificadas, dando como resultado reacciones hemolíticas fatales (Matos Bayeau, 2011).

Desde 1999 se ha implementado el uso de columnas de gel que han mejorado considerablemente la determinación de los grupos sanguíneos, sin embargo su costo y el uso de equipos sofisticados han impedido que su utilización se generalice especialmente a nivel de laboratorios y Bancos de Sangre pequeños (aquellos que tamizan menos de 1.000 donantes anuales). A pesar de que en el país existe la tecnología de gel, esta ha sido solamente implementada en instituciones de alta complejidad, no así a nivel de laboratorios privados o de baja complejidad.

Se conoce que el Instituto de Higiene Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI) realizaba el control de los reactivos que ingresan al país, desde el año 2012 fue dividido y se creó la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria ARCSA (Ministerio de Salud Pública). Sin embargo, la actividad del antiguo INSPI se limitaba a los permisos y registro sanitarios, pero no realizaban la validación de la efectividad de los mismos. De acuerdo a las especificaciones dadas por la AABB, 2012 y Dra. Franco, 2003, los reactivos utilizados en la detección del antígeno D deben especificar en el inserto que los acompaña, la composición e identificar los clones y líneas celulares por numeraciones tal como fue descrito por Köhler y Milstein en 1975 (Pujol, (sf)) (Kohler G, 1975). Además indicar las limitaciones en la detección, pues existen reactivos considerados monoclonales que no detectan el antígeno D parcial; de esta manera los laboratorios y Bancos de Sangre tendrían una información que les permita poseer un algoritmo establecido para la determinación del antígeno D y sus variantes de acuerdo al tipo de pacientes que acuden a sus instalaciones.

En el estudio piloto realizado previamente a la investigación se pudo constatar la presencia de reactivos que mencionan ser monoclonales pero que no indican su composición, por lo que se solicitó a las casas comerciales los respectivos insertos en los que se constató que son policlonales de acuerdo a las especificaciones mencionadas en el artículo de Mautor 2005 y Köhler y Milestein en 1975 (Mautor, 2005) (Kohler G, 1975). Esto demostró que los reactivos introducidos al país requieren un control de calidad que demuestre su efectividad en la detección del antígeno D.

Formulación de la pregunta ¿Cuál es el aporte de la evaluación de los reactivos anti-D para determinar la capacidad de detección del antígeno D y sus variantes?

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de detección de los reactivos monoclonales y policlonales utilizados para la detección del antígeno D en técnica de tubo.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las características físicas de los reactivos monoclonales y policlonales que detectan el antígeno D.
- Establecer la composición de los reactivos anti-D, de acuerdo a la información proporcionada por el fabricante.
- Determinar la potencia y avidéz del reactivo anti-D monoclonal frente a células de diferentes fenotipos de Rh-Hr.
- Determinar la potencia y avidéz del reactivo anti-D policlonal frente a células de diferentes fenotipos de Rh-Hr.
- Establecer la especificidad de los reactivos monoclonales y policlonales frente a fenotipos Rh-Hr.
- Correlacionar las características y parámetros evaluados en cada uno de los reactivos para establecer su capacidad de detección.

1.1.3 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Una de las limitaciones del estudio constituye obtener la información requerida para los respectivos análisis de las variables propuestas, el acceso limitado de insertos e información detallada de los kits por parte de las casas comerciales que distribuyen los reactivos anti-D. Otra limitación es la imposibilidad de encontrar una sangre tipificada como D parcial entre la población, debido a la falta de detección y reactivos para este diagnóstico disponibles en el mercado.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

1. ANTECEDENTES

En 1946, Stratton determinó la existencia de hematíes con poca reactividad con los antisueros comerciales anti-D, diferentes de las fuertes reacciones producidas con células (D) completas, por lo que se les denominó como Du (D débil). Este descubrimiento facilitó el entendimiento de la presencia de aloinmunización en individuos D positivos, es decir que empezaron a identificar personas que carecen de ciertas fracciones que forman el antígeno D. (Argall, 1998).

Estudios posteriores permitieron establecer que el antígeno Rh (D) expresa una gran variabilidad fenotípica, por lo que los reactivos utilizados para su hemotipificación deben ser elegidos de acuerdo a su capacidad de detección determinada por su composición (Hernández Díaz, Bencomo Hernández, & Rivero Jimenez, 2000).

La investigación realizada por Hernández en el año 2000, evaluó reactivos de anticuerpos monoclonales mediante la medición de parámetros como composición, avidéz, titulación y capacidad de reacción con fenotipos D-débiles se encontró que la mayoría de reactivos IgM/IgG detectan de manera efectiva los fenotipos D débiles, no así los de tipo IgG que no detectan los fenotipos D^u, concluyendo que existe la necesidad de continuar el estudio de los aspectos que contribuyen a una falta de especificidad de anticuerpos anti-D ya que de estos depende la detección de antígenos D. (Hernández Díaz, Bencomo Hernández, & Rivero Jimenez, 2000).

Un estudio realizado en Cuba sobre la incidencia de variantes de D determinó, que en dos pacientes con anemia drepanocítica presentaban variantes del antígenos D (Bencomo A, 1991); el análisis de resultados en este estudio demostró que el 0,37% posee variantes del D (Beckers EAM, 1994) (Roubinet, 1996). Köhler y Milstein desde el año 1975, encontraron una nueva forma de producción de reactivos hemoclasificadores a través de hibridomas para conseguir anticuerpos monoclonales humanos (Kohler G, 1975). La inmunización pos-parto de mujeres Rh negativas ha disminuido la cantidad de mujeres inmunizadas naturalmente; es por esta razón que existe una disminución considerable en la obtención de reactivos policlonales humanos (González, 1992). Por otro lado la producción de anticuerpos anti-D resultó difícil de realizar debido a que el

antígeno D es poco antigénico a nivel de roedores por lo que la producción de hibridomas no produce los anticuerpos necesarios para elaborar el reactivo (Rivero Jiménez, 2000).

La investigación de la incidencia del antígeno D débil o D parcial ha sido objeto de varios estudios, pues de la correcta tipificación depende la presencia o ausencia de aloinmunización en personas que presentan este tipo de antígeno. Así, en el estudio realizado en Cuba en el 2011, detectaron el antígeno D a través del uso de anticuerpos anti-D policlonales, siendo común en población de raza negra (12,5%), en mestizos (6,1%) y en blancos (1,3%). Sin embargo, al emplear anticuerpos monoclonales anti-D establecieron que todos los D débil detectados en individuos de raza blanca fueron clasificados como Rh D positivo, así también disminuyó la frecuencia en mestizos al 0,05% y en negros al 0,06% (Bencomo-Hernández Antonio A., 2011). Por lo tanto, los reactivos de tipo monoclonal o policlonal son claves en la detección inequívoca del antígeno D débil o parcial.

Del estudio realizado por Judd en el año 2006 sobre la evaluación de tres reactivos anti-D de diferentes fabricantes estadounidenses y de composición ya sea IgM, IgG y/o dual (IgM/IgG), los resultados obtenidos en pruebas directas en tubo fueron fuertemente positivas en pacientes con anti-D débil; además, al ser probados en tecnología gel encontraron una correlación con los resultados en tubo. Sin embargo, existieron discrepancias en individuos que expresaban el fenotipo D parcial tipo D^{VI}, por lo que los investigadores concluyen que debido a la diferencia entre el rendimiento de los reactivos, los conflictos entre centros de tipificación y servicios de transfusión son inevitables (Judd, 2006).

2.1 SISTEMA RH

El sistema Rh fue descubierto al inyectar eritrocitos del mono *Macacus rhesus* a conejos y cobayos, obteniendo un suero que aglutinaba con el 85% de los eritrocitos de humanos, de ahí se derivó su denominación a Rh (Baptista-González, 2004). En esos años se clasificaron dos tipos de Rh: de aquellas personas que aglutinaban se catalogaron como Rh positivos y los que no exhibían aglutinación como Rh negativos. En la actualidad se conoce que el sistema Rh es muy complejo y no se trata solamente de dos antígenos, ya que se han descubierto aproximadamente 50, en estudios moleculares se han determinado la existencia de unos 170 alelos (Baptista-González, 2004), estableciéndose que la estructura genómica es muy polimórfica (Storry JR, 2011).

Luego del descubrimiento de las bases moleculares del locus Rh se ha puesto más énfasis en la presencia de diferentes fenotipos Rh (D) incluidos los D parcial y D débil. Siendo estos últimos los más problemáticos en ser detectados por los reactivos comerciales, esto debido a que carecen de un fragmento de la proteína que les impide expresarse y ser detectada (Muñiz Dias, 2010). Esto ocasiona que las personas que posean este fenotipo al contacto con un antígeno Rh (D) completo sufren una aloinmunización importante con el desarrollo de un anticuerpo anti-D ocasionando graves consecuencias, es por esto la necesidad de contar con reactivos adecuados para su detección (Muñiz Dias, 2010).

2.1.1 NOMENCLATURA DEL SISTEMA RH

La herencia del sistema Rh fue explicada por tres mecanismos así: 1943, Fisher y Race formularon la hipótesis de la existencia de tres loci o genes separados pero ligados en haplotipos dando lugar a tres grupos CDe, CDE para los sujetos Rh(D) positivos y cde Rh(D) negativos. Weiner en 1951 enunció la existencia de un solo gen con alelos de varios antígeno Rh, y en 1990 Colins y colaboradores realizaron la secuenciación de los genes del Rh divididos en dos RhD y RHCE llegando así a la explicación del polimorfismo del sistema Rh (Batista-Jimenes, 2005). De estos descubrimientos se fue creando la terminología de los genes y proteínas de este sistema así la letra “R” se refiere a la presencia del antígeno D (RhD, R⁰, R¹, R² y R^z) mientras que la letra “r” siempre se referirá a la ausencia del antígeno (Batista-Jimenes, 2005). Así también, el número “1” o la marca (´) se refiere a la presencia del antígeno C; el “2” y la marca (´´) es indicativo de la existencia del antígeno E y a la presencia de los haplotido C y E se los identificó con las letras finales del alfabeto Y, Z. (Tabla 1).

Tabla 1. Nomenclatura del Sistema Rh.

Gen	Antígeno	Gen	Antígeno
R ⁰	cDe	r	cde
R ¹	Cde	r´	Cde
R ²	cDE	r´´	cdE
R ^z	CDE	r ^y	CdE

Fuente: AABB, 2012

2.1.2 FENOTIPOS DEL SISTEMA RH

La detección de los fenotipos del sistema Rh se realiza mediante la utilización de antisueros como: anti-D; anti-C; anti-c; anti-E y anti-e. Esta detección permite establecer los probables genotipos que son característicos de cada grupo étnico, así en europeos es común el fenotipo D, C, e, c con un probable genotipo CDe/ce es decir R¹r (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012). En contraste la población africana presenta un fenotipo D, C, e con un probable genotipo R¹R⁰. No existen estudios en relación al fenotipo Ecuatoriano. En la siguiente tabla se puede apreciar las diferentes combinaciones de acuerdo a la tipificación fenotípica con antisueros anti-C; anti-c; anti-E y anti-e (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012). (Tabla 2).

Tabla 2. Determinación de los genotipos Rh más probables y fenotipos de acuerdo con las pruebas efectuadas en los cinco reactivos principales de tipificación.

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Fenotipo	Genotipo probable	Genotipo alternativo
Rh Positivo							
+	+	0	+	+	D,C,c,e	R ¹ r Dce/Ce	R ¹ R ⁰ DCe/Dce R ⁰ r ⁺ DCe/ce
+	+	0	0	+	D,C,e	R ¹ R ¹ DCe/DCe	R ¹ r ⁺ DCe/Ce R ¹ r ⁻ DCe/Ce
+	+	+	+	+	D,C,c,E,e	R ¹ R ² DCe/DcE	R ² r ⁺ DcE/Ce R ² r ⁻ DCEce R ⁰ R ² Dce/DCE
+	0	0	+	+	D,c,e	R ⁰ r Dce/ce	R ⁰ R ⁰ Dce/Dce
+	0	+	+	+	D,c,E,e	R ² r DcE/ce	R ² R ⁰ DcE/Dce R ⁰ r ⁺ Dce/Ce
+	0	+	+	0	D,c,E	R ² R ² DcE/DcE	R ² r ⁻ DcE/Ce
+	+	+	0	+	D,C,E,e	R ¹ R ² DCe/DCE	R ² r ⁺ DCE/Ce
+	+	+	+	0	D,C,c,E	R ² R ² DcE/DCE	R ² r ⁺ DCE/Ce
+	+	+	0	0	D,C,E	R ² R ² DCE/DCE	R ² r ⁺ DCE/CE

Tabla 2. Determinación de los genotipos Rh más probables y fenotipos de acuerdo con las pruebas efectuadas en los cinco reactivos principales de tipificación. (Continuación)

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Fenotipo	Genotipo probable	Genotipo alternativo
Rh Negativo							
0	0	0	+	+	c,e	.rr .ce/ce	N/A
0	+	0	+	+	C,c,e	r'r Ce/ce	N/A
0	0	+	+	+	.c,E,e	.r'r Ce/ce	N/A
0	+	+	+	+	C,c,E,e	.r'r'' Ce/cE	N/A

N/A : No aplica

Fuente: AABB, 2012.

2.1.3 ANTÍGENOS DEL SISTEMA RH

El antígeno D es el segundo en importancia para la determinación del grupo sanguíneo por las severas reacciones hemolíticas que puede ocasionar tanto en el feto como en pacientes que reciban sangre incompatible; por lo tanto su correcta identificación es imprescindible (Gargiulo, 2005). Este antígeno está presente en el 85% de las personas de raza blanca 95% a nivel de raza negra. Se estima que de cada 100 personas, existe una con fenotipo Rh negativo (Gargiulo, 2005). Los antígenos del sistema se dividen en dos: D débil y D parcial.

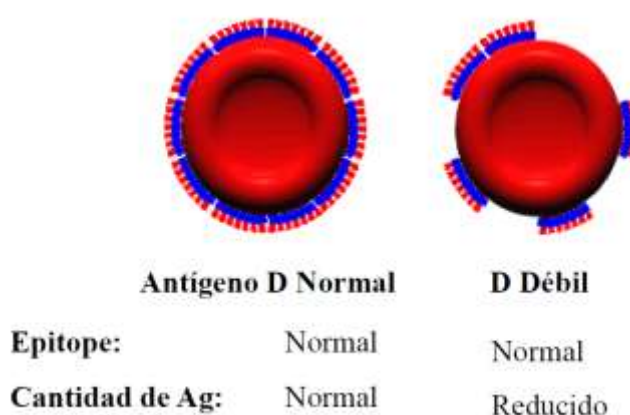
2.2 D DÉBIL

Se caracteriza por presentar sitios antigénicos en menor cantidad que el antígeno D normal (Gráfico 1), por lo que para su detección se requiere la prueba de antiglobulina humana (Coombs) (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

Antiguamente fue conocido como D^u y su detección estaba relacionada directamente con el tipo de reactivo utilizado. La denominación de D^u fue cambiada porque la diferencia no era cualitativa sino cuantitativa y en 1949 Stratton propuso su cambio a D débil. (Baptista-González, 2004) (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

El antígeno D débil se produce por una mutación a nivel de nucleótido RHD la que afecta la expresión del antígeno en la membrana del eritrocito reduciendo de esta manera el número de sitios antigénicos (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012). Existen varios tipos de D débil clasificados como “tipo 1 al 73”, siendo los más común los tipos 1, 2 y 3 especialmente en la población europea los tipos 2 y 3 representan el 90% (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

Gráfico 1: Representación esquemática de la cantidad de antígeno D localizado en los glóbulos rojos.



Fuente: Manual de Inmunohematología, 2002

Al no ser detectado, la persona es considerado erróneamente como Rh (D) negativo al convertirse en donante voluntario de sangre, su sangre será utilizada para personas (D) negativas, este error puede ocasionar la muerte del receptor. Esto se debe a que pacientes carentes del antígeno D (Rh negativos) desarrollan una respuesta inmune denominada “aloimmunización” al recibir sangre D positiva; una de las consecuencias es la destrucción masiva de los eritrocitos transfundidos junto con los propios produciéndose una hemólisis intravascular que puede terminar con la vida del receptor. (Baptista-González, 2004).

2.2.1 D DÉBIL SECUNDARIO A LA PRESENCIA DEL ANTÍGENO C

Se ha determinado que el “fenotipo D débil puede aparecer cuando el antígeno Ce (r’) está presente en la posición trans del gen RHD (R⁰r’)” (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

Es por esta razón que los reactivos anti-D deben identificar los eritrocitos que expresan fenotípicamente los antígenos Ce. Así, cuando existe una mayor expresión del antígeno

D débil secundario a Ce puede ser considerado como Rh (D) negativo ($rr',r'r'$) debido a una falta de detección de los reactivos anti-D por la baja expresión del antígeno D, este tipo de fenotipo se denomina D_{el} . (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012)

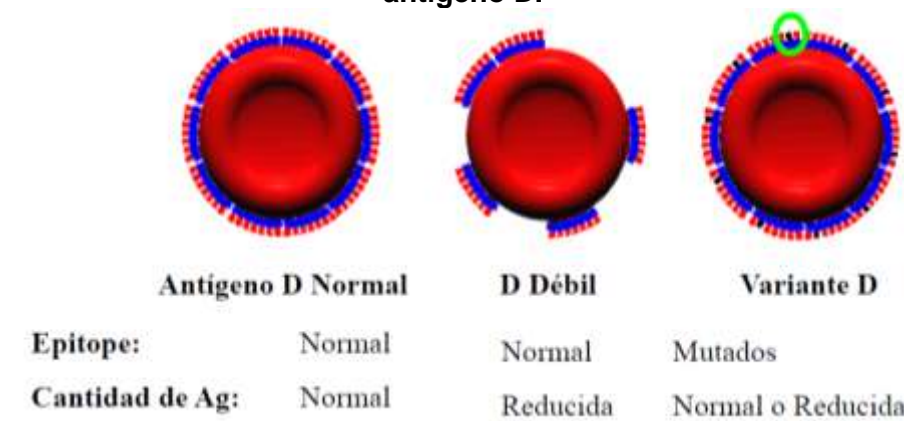
Las personas que poseen glóbulos rojos D_{el} se caracterizan por poseer niveles bajos del antígeno D imperceptibles para los reactivos anti-D utilizados de forma rutinaria, este tipo de antígenos es común en la población asiática. Para la detección de D_{el} es necesario utilizar técnicas moleculares (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

2.3 ANTÍGENO D PARCIAL

Por otro lado, existen individuos que presentan un fenotipo D parcial los que se caracterizan por producir una reacción positiva fuerte al unirse con el anticuerpo-D presente en los reactivos; sin embargo, al recibir sangre o estar en contacto con eritrocitos Rh (D) completos sufren una aloinmunización, es decir, se sensibilizan y forman anticuerpos anti-D. (Baptista-González, 2004) (Muñiz Dias, 2010).

Al realizar los estudios moleculares determinaron que estos individuos se caracterizaban por la ausencia de uno o más epítopes que forman parte del complejo antígeno D (Gráfico 2), explicándose la capacidad de producir anticuerpos anti-D ante la presencia de epítopes faltantes (Gargiulo, 2005).

Gráfico 2: Representación esquemática de la localización de epítopes del antígeno D.



Fuente: Manual de Inmunohematología, 2002

Para la tipificación de estos pacientes se debe tener en consideración el uso de un reactivo adecuado, ya que una identificación errónea del D parcial podría conducir a una hemólisis intravascular en el caso de transfusión sanguínea o a una enfermedad hemolítica del recién nacido (Begoña Laiz Marro, 2004) (Gargiulo, 2005) (Muñiz Dias, 2010). Además la pérdida de un epítipo puede dar origen a nuevos antígenos como por ejemplo el D^{VI}.

2.3.1 CLASIFICACIÓN DEL FENOTIPO D PARCIAL

La clasificación de estos fenotipos se realizó en base al comportamiento aglutinante que presentaron los glóbulos rojos al ser empatados con sueros de individuos D-negativos (Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación de los individuos con fenotipo D parcial.

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

La tabla muestra los criterios de clasificación de los fenotipos D parcial.

Fuente: Gargiulo (2005), Sistema Rh, lo que hay que saber.

2.4 ANTÍGENO D ELEVADO.

Este tipo de antígeno se produce cuando existe un reemplazo de las porciones de RHCE por RHD ocasionando una expresión fenotípica fuerte, es por esta razón que los eritrocitos de individuos que poseen este tipo de antígeno reaccionan fuertemente con reactivos anti-D imposibilitando su identificación como “D elevado” (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

Las personas que poseen este antígeno generalmente carecen de antígenos C/c y E/e y producen anticuerpos anti-Rh, por lo que al recibir sangre incompatible generan reacciones transfusionales importantes (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012). La forma de detectarlo es mediante pruebas moleculares y tipificación de C,c,E,e ya que los métodos convencionales los clasifican como Rh (D) positivos.

2.5 ANTICUERPOS DEL SISTEMA RH

Los anticuerpos del sistema Rh tienen una gran importancia por ser “anticuerpos inmunes”, es decir que su presencia está dada por una respuesta inmune a una aloimmunización (Credidio DC, 2011); esto ocurre cuando la persona es expuesta directamente a los antígenos D produciendo anticuerpos contra los mismos desencadenando reacciones hemolíticas que pueden ocasionar la muerte.

El anticuerpo producido se denomina anti-D que es de naturaleza IgG en individuos aloimmunizados siendo común su detección en mujeres de fenotipo Rh negativo, especialmente en aquellas que se encuentran embarazadas de fetos Rh positivo o Rh (D). Este anticuerpo, generalmente es detectado en la fase de anti-globulina humana o Coombs (GCIAMT, 2007-2009).

2.6 REACTIVOS PARA DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO (D)

De acuerdo a Gargiulo, 2005 y Muñiz Días, 2010 se recomienda que la identificación del fenotipo D^{VI} se realice con reactivos que presenten las características requeridas para su correcta detección, así para realizar la determinación del factor Rh en donantes y recién nacidos que se sospeche estén sensibilizados se debería utilizar un reactivo policlonal-IgG o IgM salino o IgG químicamente modificado (GCIAMT, 2007-2009).

En el caso de pacientes y mujeres embarazadas se recomienda el uso de un reactivo anti-D monoclonal que reaccione con antígenos D débiles en tubo y no en fase antiglobulínica, esto permitirá que sean tipificados como verdaderos negativos (GCIAMT, 2007-2009), por lo que en caso de transfusiones sanguíneas puedan ser considerados como Rh negativos (Gargiulo, 2005) (Muñiz Dias, 2010) (Baptista-González, 2004).

Actualmente se han introducido nuevas metodologías para la detección de anti-D basados en el uso de reactivos monoclonales, policlonales, columnas de gel y microesferas (Rivero Jiménez, 2000). Sin embargo, la elaboración y control de calidad de estos reactivos es clave en la detección de fracciones débiles del antígeno D. Sin un

correcto monitoreo no se podrá determinar si estos reactivos son los más adecuados. (Martín González Odalys, 2000) (Rivero Jiménez, 2000).

Los bancos de sangre a nivel mundial han determinado la presencia de discrepancias durante la determinación del antígeno D, es por esta razón que utilizan anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado compuesto por IgM, IgG o IgM+IgG (Swati Kulkarni, 2013). Del estudio realizado por Swati Kulkarni y colaboradores, determinaron un aumento de personas con presencia de antígenos D variantes de difícil detección y confirmación; encontrando 60 variantes de este antígeno que dificulta su diagnóstico por medios serológicos, constituyendo uno de los aspectos más importante en el momento de la detección de D negativo en mujeres en edad fértil y receptores que deben recibir sangre Rh (D) negativa (Swati Kulkarni, 2013).

La discrepancia entre la determinación de los antígenos D parcial y débil surge en la utilización de diferentes reactivos de variadas sensibilidad y especificidad, es decir que las variantes de D parcial pueden producir reacciones fuertes o débiles de aglutinación resultando imposible diferenciarlos de los D completos, este error en la determinación del sistema Rh produce la aloinmunización de la persona que recibe sangre D completa y su consecuente reacción postransfusional, es por esta razón que se ha introducido la determinación del Rh por medios moleculares que permitan distinguir los diferentes tipos de D parcial. (Polin H, 2007).

Otra estrategia para una adecuada detección de las variantes del antígeno D y sus discrepancias es la utilización de reactivos monoclonales de la línea células LHM 70/45 (Swati Kulkarni, 2013); también se recomienda el uso de dos reactivos anti-D de la línea celular mencionada anteriormente y LHM 76/59 y LHM 76/55, el inconveniente constituye la disponibilidad de estos reactivos en cada país (Swati Kulkarni, 2013).

2.7 PRODUCCIÓN DE REACTIVOS PARA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO D Y SUS VARIANTES

La naturaleza de las inmunoglobulinas anti-D que forman parte de la composición de los reactivos utilizados para la detección del antígeno D pueden ser IgG o IgM, policlonales o monoclonales. Estas inmunoglobulinas determinan los diferentes medios de reacción, así en las IgG provenientes de humanos pueden ser utilizadas en test antiglobulínico indirecto y los eritrocitos no requieren de un tratamiento pre-enzimático para potenciar su reacción (Gargiulo, 2005). Tomando en consideración estos aspectos de composición de

los reactivos anti-D y la variedad que existe en el mercado es necesario seguir las instrucciones del fabricante; actualmente se ha determinado que existen 40 líneas diferentes de células utilizadas para la producción de reactivos monoclonales (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

Para la producción de reactivos anti-D policlonales se obtiene pools de donantes inmunizados previamente y cada uno de ellos reacciona de forma diferente de acuerdo a su respuesta inmune por lo que no son “perfectos” (Mautor, 2005); debido a esta imperfección el fenotipo D^{VI} a considerado D parcial no es detectado por este tipo de reactivos presentando la mayoría de veces reacciones débiles o negativas. (Mautor, 2005).

En contraste con los reactivos anti-D monoclonales los hematíes R^oHar reaccionan de forma positiva siendo clasificados como Rh (D) positivos, cuando con reactivos policlonales son comúnmente clasificados como Rh (D) negativos o cómo débil reactivos. Estos resultados demuestran las discrepancias que se presentan durante la detección del antígeno D, constituyendo un riesgo en los bancos de sangre por la posibilidad de reacciones postransfusionales con un desenlace fatal.

Desde el año 1982 que se crearon los reactivos monoclonales se estableció la diversidad y complejidad de los epítopes presentes en los antígenos D, estos reactivos son obtenidos mediante tratamiento a linfocitos transformados con virus Epstein-Barr (Mautor, 2005). También existen reactivos combinados Policlonales/Monoclonales (Blends) compuestos por IgM, siendo utilizados en pruebas salinas y detectan antígenos D normales; en estos reactivos la cantidad de IgG policlonal es controlada para evitar que la reacción de la IgM frente a un D débil no cause un bloqueo debido al exceso de anticuerpos (prozona), este efecto es común en todos los reactivos por ese motivo se debe evitar el aumento en los tiempos de incubación (Gargiulo, 2005) (Mautor, 2005)

De las investigaciones realizadas se ha determinado que los reactivos monoclonales no pueden detectar todas las variantes de D, debido a que sus componentes están dirigidos hacia limitados epítopes del antígeno por lo que su especificidad es limitada (Escobedo A, 2012). Un gran porcentaje de estos reactivos no detecta el fenotipo D parcial, especialmente el D^{VI}, estos resultados han ocasionado que sea difícil la elección de un reactivo específico y sensible; en conclusión los investigadores han determinado que los reactivos tanto policlonales como monoclonales no son mejores ni peores por lo que no

existe un reactivo anti-D perfecto o infalible con capacidad de detectar todas las variantes de D (Gargiulo, 2005) (Escobedo A, 2012).

2.7.1 REACTIVOS POLICLONALES

Para la determinación del antígeno D se utiliza antisueros que son obtenidos de la inmunización de seres humanos altamente sensibilizados, de esta manera se obtiene los “reactivos hemoclasificadores policlonaes” para la determinación del antígeno-D. (Rivero Jiménez, 2000) (Mautor, 2005). Una vez que el título de anticuerpos ha alcanzado un valor superior a 1/64 es suficiente para extraer suero mediante un procedimiento denominado plasmaferesis; generalmente se obtienen anticuerpos de tipo IgG que requieren potenciadores o el test de antiglobulina humana para detectar antígenos D débiles, este tipo de producción de anti-D debe ser mencionado en las instrucciones del fabricante para conocimiento de los usuarios (Escobedo A, 2012).

2.7.2 REACTIVOS MONOCLONALES

En los años 1975 Köhler y Milstein produjeron in vitro anticuerpos que se caracterizaron por reconocer el epítoto del antígeno específico denominado anticuerpos monoclonales, existen actualmente de primera y de segunda generación, la diferencia radica en que los de primera generación se obtienen a partir de células mielomatosas (células tumorales inmortales) y los de segunda generación son a partir de biología molecular y ADN recombinante (Pujol, (sf)) (Kohler G, 1975).

El ADN recombinante es obtenido por la inmortalización de los genes de las inmunoglobulinas, al contrario de los de primera generación que es por la inmortalización de células productoras de anticuerpos (Pujol, (sf)). Actualmente existe una gran variedad de reactivos monoclonales, se ha determinado un total de “40 líneas celulares diferentes” (Escobedo A, 2012) (Mautor, 2005).

Se ha implementado nuevos reactivos monoclonales que son obtenidos por clones MAD-2 y FOM-1 mejorando la tipificación del sistema Rh, estos productos han sido seleccionados para realizar una correcta tipificación sanguínea (Rivero Jiménez, 2000).

2.7.3 REACTIVOS BLENDS

También se pudo combinar dos anticuerpos IgM/IgG formando reactivos conocidos como combinados, duales o blends: policlonaal/monoclonal o Blends que son utilizados en pruebas salinas para detección de D completo gracias al complemento IgM (Escobedo A, 2012).

2.7.4 REACTIVOS EN GEL

Actualmente se ha incluido un test de gel con mayor sensibilidad y superior al test convencional de tubo (AABB, 2012); esta metodología aumenta la sensibilidad y ha permitido discriminar de forma objetiva los antígenos D. Esto ocurre debido a dos mecanismos: la presencia del gel y, el medio antiglobulínico, impidiendo de esta manera que la reacción de la IgM con D débil no cause bloqueo por el efecto prozona por el control de la cantidad de IgG policlonal humana en la prueba (AABB, 2012).

2.8 CONTROL DE CALIDAD DE LOS REACTIVOS ANTI-D

En el mercado existe pocos reactivos para determinar el antígeno D, por lo que autores como Dueñas, AABB y estándares de Bancos de Sangre de la OMS/OPS recomiendan un estricto control de calidad (AABB, 2012) (Organización Panamericana de la Salud, 2005). Además de los parámetros a ser medidos en los reactivos existen otros dentro de la fase analítica como: contaminación bacteriana de las muestras al ser guardadas inadecuadamente, tiempos de incubación no controlados, hematíes auto-sensibilizados como en el caso de anemias hemolíticas y otros factores inherentes al paciente; este aspecto debe ser controlado mediante el uso de protocolos de trabajos y POEs establecidos en cada institución, es decir el algoritmo de detección (Dueñas, 2003).

Dueñas menciona que el uso de reactivos “dual” mezcla de monoclonales y policlonales pueden ocasionar resultados falsos positivos debido a la alta concentración de proteínas en el medio que son preparados (Dueñas, 2003). Por lo tanto, una de las recomendaciones consiste en leer cuidadosa y detenidamente el inserto proporcionado por el fabricante para obtener resultados confiables, conocer la temperatura de almacenamiento, fecha de vencimiento y revisar la actividad del anti-D con células de fenotipos conocidos (Dueñas, 2003). Un requisito de la FDA menciona que los fabricantes deben indicar la reactividad con hematíes parciales, debido a que los reactivos que contienen IgM anti-D reaccionan en pruebas directas con casi todos los tipos de D parciales excepto el D^{VI}, siendo esta la causa de aloinmunización en poblaciones en las que es prevalente este tipo de D parcial.

Otro aspecto a considerarse es la limitación de la evaluación de los reactivos debido a la imposibilidad de encontrar sangre D parciales, especialmente en poblaciones como la ecuatoriana que se desconoce la prevalencia. Ante esta limitante AABB recomienda el uso de células comerciales (AABB, 2012).

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Se trató de un estudio descriptivo transversal llevado a cabo en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la PUCE durante el mes de enero a diciembre del 2013 en la ciudad de Quito.

3.2 TIPO DE MUESTREO: Se utilizó un muestreo aleatorio simple.

3.3 TAMAÑO DE MUESTRA

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

$$n = \frac{10}{1 + (0.05)^2(10 - 1)/(1.96)^2(0.50)(0.50)}$$

$$n = \frac{10}{1 + (0,0025)(9)/(3.84)(0.25)}$$

$$n = \frac{10}{1 + (0,0225)/(0,96)}$$

$$n = 10/1,023$$

$$n = 9,7=10$$

Dónde:

n= tamaño de la muestra =?

N= tamaño conocido de la población=10

e = error alfa= 0,05

z²= nivel de confianza 95% = (1,96)²

p= probabilidad de detección inequívoca =0,50

q= probabilidad de no detección= 0,50

Decisión: Se utilizó la fórmula para estudios cualitativos de población finita, determinándose con un nivel de confianza del 95% y un error alfa del 5% una muestra de 10 reactivos hemoclasificadores anti-D.

3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN: reactivos utilizados para detección del antígeno D en laboratorios de referencia.

3.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: reactivos utilizados para detección del antígeno D en laboratorios privados y públicos pequeños.

3.6 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.6.1 VARIABLE DEPENDIENTE: detección del antígeno D.

3.6.2 VARIABLES INDEPENDIENTES: características y capacidad de detección de los reactivos monoclonales y policlonales.

3.7 CONTROL DE CALIDAD

Todo el proceso analítico fue tomado del artículo Dra Elena Franco y Escobedo (Franco, 2003) (Escobedo A, 2012) para el control de calidad de reactivos anti-D. Adicionalmente, el uso de células comerciales de fenotipo conocido permitió mantener una seguridad en el proceso de detección ya que las células humanas fueron tipificadas en laboratorios privados y certificados.

Para el control de las células panel utilizadas en la validación de los reactivos anti-D se utilizó una dilución del reactivo anti-D 1/16 de acuerdo a lo sugerido por el Manual AABB, 2012 (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó estadística descriptiva analizada en el programa SPSS V.20. El principal objetivo de este estudio fue analizar las diferentes variables que determinan la detección del antígeno D y presentar los resultados de forma descriptiva, lo que permitiría proporcionar información clara y consistente a las autoridades pertinentes.

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

<u>VARIABLE DEPENDIENTE</u>	DEFINICIÓN	DIMENSIONES/ CATEGORÍA	INDICADORES	INSTRUMENTO DE MEDIDA/ MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Reactivos que detectan Anti-D	Son reactivos que se obtienen de la inmunización de seres humanos que han sido altamente sensibilizados. Composición de los reactivos de acuerdo a la información en insertos de cada casa comercial determina su clasificación	Cualitativa	Monoclonales y Policlonales	Lectura del Inserto que viene con los reactivos Anexo 1: ejemplo de insertos
<u>VARIABLES INDEPENDIENTES</u>				
Avidez	Tiempo mínimo en que una vez mezclados el reactivo y la suspensión de hematíes se produce la aglutinación	Cualitativo	Tiempo que se demora en aparecer la aglutinación.	Correlacionará los tiempos con los especificados en AABB 2012. Anexo 2
Potencia	Es la reacción de aglutinación que se observará y se cuantificará en relación a la última dilución.	Semi-cuantitativo	Título de la última dilución que presenta aglutinación	Basado en la tabla propuesta en el Manual Técnico de la AABB 2012, Escobedo 2012 Anexo 3
Afinidad	Es el poder de atracción de los grupos químicos para unirse al antígeno y aglutinar	Semi-cuantitativo	Observación del botón resultado de la aglutinación: (+): 10% aglutinados (++): 30% aglutinados (+++): 80% aglutinados (++++): 100% aglutinados (-): ausencia de aglutinación	Clasificación de aglutinación de acuerdo al Manual Técnico AABB 2012. Anexo 4
Especificidad	Es el grado que tiene el antígeno al unirse a un anticuerpo específico. Observación cualitativa de la reacción de aglutinación con células (D) positivas CE, ce y células (D) negativas ce; Ce;Ec	Cualitativo	Aglutina No Aglutina	Células de panel conocidas para la detección del antígeno D

3.9 PROCEDIMIENTO

El estudio se llevó a cabo en cinco fases:

3.9.1 FASE UNA

Durante esta fase se realizó el estudio piloto donde se eligieron los laboratorios y reactivos para la tipificación del factor D.

ESTUDIO PILOTO

- a) Selección de los lugares en los que se realiza tipificación sanguínea:
- ✓ Se escogió lugares referentes de tipificación sanguínea, las características validadas fue el número de personas que acuden a estos lugares y la utilización de técnica manual.
 - ✓ Se realizó una encuesta telefónica estructurada la que consto de cuatro preguntas para la selección como laboratorios de referencia:
 - 1) ¿Cuántos donantes/pacientes acuden anualmente a realizarse pruebas de tipificación sanguínea?
 - 2) ¿Qué tipo de metodología es utilizada en su centro para la detección del antígeno D?
 - 3) ¿Cuál es la casa comercial en la que usted adquiere los reactivos anti-D?
 - 4) ¿Realiza usted control de calidad a los reactivos utilizados para tipificación sanguínea, utiliza controles internos, analiza el inserto y recibe capacitación del uso de los reactivos por parte de la casa comercial?
- b) Selección de Reactivos
- ✓ Se escogió los reactivos comúnmente utilizados en laboratorios escogidos como de referencia de tipificación anti-D (7 bancos de sangre y 5 laboratorios en Quito), siendo escogidos bajo el criterio que el total de personas anuales tipificadas sea ≥ 1.000 .
 - ✓ Se seleccionó los reactivos utilizados en técnica manual de tubo.

3.9.2 FASE DOS

Una vez adquiridos los reactivos se inició el análisis de los siguientes parámetros, fecha de caducidad, lote, registro sanitario ecuatoriano, temperatura de almacenamiento e inserto de cada uno de los reactivos de acuerdo a los criterios que exige la AABB, 2012; y recomendaciones de la Dra. Elena Franco en relación al control de calidad (Franco, 2003) (Anexo 6).

3.9.3 FASE TRES

En esta fase se inició el control de calidad analítica iniciándose con el análisis crítico del inserto; determinación de la composición y su clasificación siguiendo los lineamientos mencionados en el artículo escrito por Mautor. (Mautor, 2005)

Para determinar la potencia, avidéz, afinidad de cada reactivo se siguió el siguiente proceso:

- Se utilizó células panel DIAPRO formadas por 11 diferentes tipos de fenotipos Rh siendo homocigotos y heterocigotos, siendo obtenidas de donantes únicos, procesadas comercialmente.
- Adicionalmente, se tipificaron células de donantes de sangre del Hemocentro de Cruz Roja Ecuatoriana utilizando aquellas que cumplan con los fenotipos presentes en las células comerciales.
- Reactivos anti-C, anti-E, anti-e y anti-c que cumplieron con las características físicas y composición de acuerdo a las normativas mencionadas en el AABB, 2012 (Tabla 4).

Tabla 4: Composición de los reactivos utilizados en la caracterización de donantes.

Nombre del Reactivo	DiaClon anti-C	DiaClon anti-c	DiaClon anti-E	DiaClon anti-e
Casa comercial	BIORAD	BIORAD	BIORAD	BIORAD
Aspecto	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
Fecha de Caducidad	2014-05	2015-04	2014-11	2014-04
Temperatura de Almacenamiento	2°-8°C	2°-8°C	2°-8°C	2°-8°C
Lote	E101455	E101410	E101620	E101720
Id-n°	10600	10610	10620	10630
Inserto	Si	Si	Si	Si
Composición (tipo de anticuerpo)	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal
Composición	Anticuerpo Monoclonal IgM. Línea celular MS-24	Anticuerpo Monoclonal IgM Línea celular MS-33	Anticuerpo Monoclonal IgM Línea celular MS-260	Anticuerpo Monoclonal IgM Línea celular MS-16 MS-21 MS-63
Volumen	5ml	5ml	5ml	5ml

Fuente: Casa BIO-RAD

La tabla muestra la composición de los reactivos utilizados.

3.9.4 FASE CUATRO

Control de Calidad: se aplicó el control de calidad a las células comerciales y las obtenidas de donantes mediante el uso de tarjetas de gel con anti-D enfrentándolas y observando su grado de aglutinación de acuerdo a los lineamientos mencionados en AABB (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

MEDICIÓN DE POTENCIA: para la realización de las diluciones seriadas dobladas se utilizó pipetas automáticas calibradas, tubos de vidrio nuevos y células panel comercial y proveniente de donantes. Estas células fueron lavadas y preparadas con buffer ID-Diluyente BIORAD Liss, Lote 05761.95.10; Ref: 009280 con fecha de caducidad 2015/07. La medición se realizó cuantitativamente siendo el título más alto en el que se observó aglutinación.

MEDICIÓN AVIDEZ: para medir este parámetro se utilizaron células sin lavar, para medir la velocidad de unión se usó un cronómetro de laboratorio y para visualizar el inicio de la aglutinación una lámpara invertida s/marca, la medición de la avidéz fue en segundos.

MEDICIÓN DE LA ESPECIFICIDAD: siguiendo las recomendaciones del Manual técnico de la AABB, mediante el uso de células lavadas y preparadas al 2% en buffer ID-Diluyente, se procedió a la mezcla de 50ul de células más 50ul del reactivo midiéndose la especificidad de forma cualitativa: aglutina o no aglutina.

Control de calidad de Coombs para lo cual se utilizó células control Coombs preparadas en el laboratorio siguiendo los lineamientos del AABB, 2012.

3.9.5 FASE CINCO

Se creó una base de datos de los resultados obtenidos en Excel 2010, posteriormente fueron analizados mediante estadística descriptiva en SPSS V.20.

CAPÍTULO IV

4. MARCO CONCEPTUAL

Antígenos: son moléculas extrañas al organismo capaces de producir una respuesta inmunitaria (Aires, 2012).

Anticuerpos: son inmunoglobulinas que aparecen después de una estimulación ocasionada por algún antígeno (Aires, 2012).

Anticuerpos policlonales: son sustancias que son obtenidas por una inmunización a personas o animales con antígenos que pertenecen a los grupos sanguíneos (Begoña Laiz Marro, 2004).

Anticuerpos monoclonales: son diagnosticadores obtenidos a partir de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (Begoña Laiz Marro, 2004).

Alloinmunización: se produce por incompatibilidad del sistema Rh que posteriormente desencadena una respuesta inmunitaria contra el mismo sistema (Begoña Laiz Marro, 2004).

Epítopes: son sitios de unión en donde el antígeno se liga con el anticuerpo (Rojas, 2006).

Avidez: es la estabilidad en que un anticuerpo y un antígeno homólogo se unen y reaccionan de manera rápida (Rojas, 2006).

Afinidad: es la fuerza que poseen los grupos químicos que están presentes en los sitios de combinación del anticuerpo con el antígeno para unirse (Rojas, 2006)

Especificidad: es la cualidad de un anticuerpo para reaccionar con un antígeno determinado y no con otros (Begoña Laiz Marro, 2004).

Efectividad: es el grado de detección de la prueba para lograr los resultados deseados (Begoña Laiz Marro, 2004).

Potencia: es el mayor grado de aglutinación que puede alcanzar el reactivo en la dilución de 1+. (Mautor, 2005).

Composición: son las sustancias que están presentes en una solución que le da la característica única a cada reactivo (Aires, 2012).

Sensibilización: se produce cuando una persona Rh negativa genera anticuerpos anti-D en el mismo organismo (Aires, 2012).

Células Panel: son células comerciales obtenidas de humanos preparadas y almacenadas durante 3 meses. (Baptista-González, 2004).

Fenotipo: constituye cualquier característica o rasgo particular expresado que fue heredado y lo hace único. (Gargiulo, 2005).

Gen: unidad de información corta de ADN dentro de un genoma que expresa todos los elementos contenidos de una forma regulada (Aires, 2012).

Haplotipo: es un o varios tipos de genes determinados en un cromosoma que regulan un antígeno sanguíneo. (Muñiz Dias, 2010).

CAPITULO V

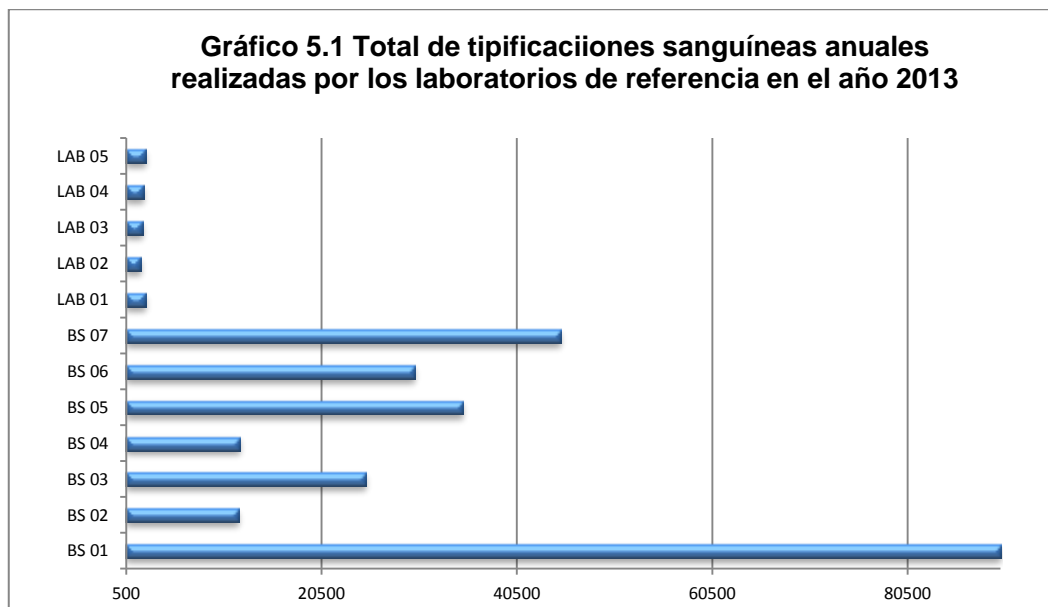
5. RESULTADOS

5.1 ESTUDIO PILOTO

De acuerdo al estudio piloto realizado los reactivos anti-D utilizados por los laboratorios seleccionados como referentes se obtuvieron los siguientes resultados:

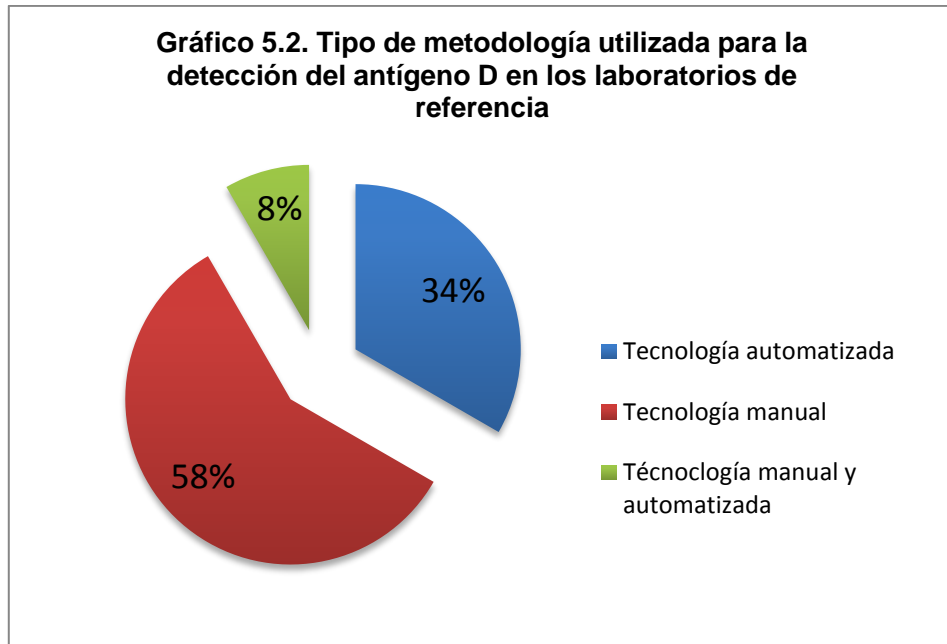
- 1) PREGUNTA N°1: ¿Cuántos donantes/pacientes acuden anualmente a realizarse pruebas de tipificación sanguínea?

Los laboratorios y bancos de sangre considerados como referentes fueron aquellos que realizaban más de 1.000 pruebas de tipificación anuales. (Gráfico 5.1)



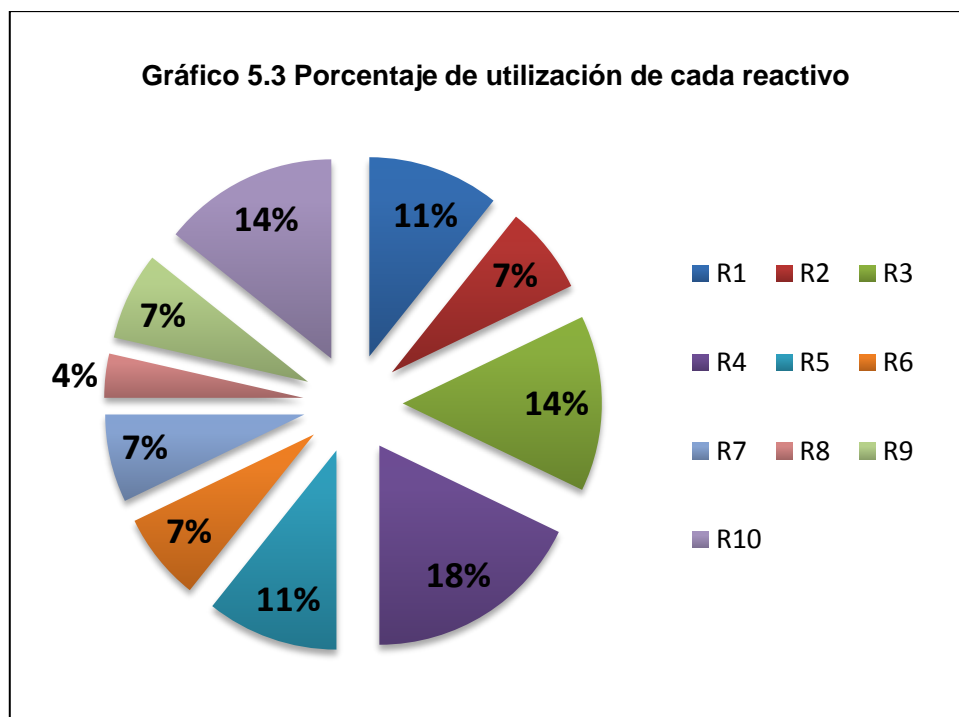
- 2) PREGUNTA N°2: ¿Qué tipo de metodología es utilizada en su centro para la detección del antígeno D?

Se analizó la técnica utilizada en cada uno de los 12 laboratorio escogidos como referentes encontrándose que el 33 % (N=4) utilizan la metodología automatizada, técnica en gel, el 8% (N°1) utiliza tanto gel como tecnología manual en tubo y el 58% (N=7) utilizan la metodología manual técnica en tubo. (Gráfico 5.2).



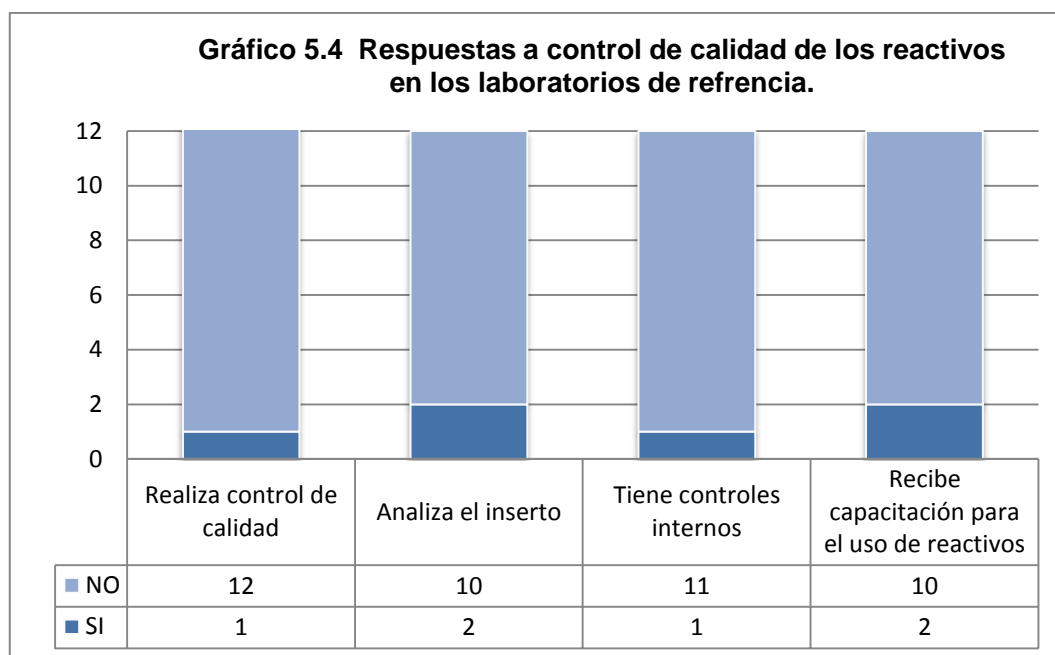
3) PREGUNTA N°3: ¿Cuál es la casa comercial en la que usted adquiere los reactivos anti-D?

Se determinó el total de reactivos anti-D utilizados en los laboratorios encuestados, 10 marcas de diferentes casas comerciales son utilizadas indistintamente en cada uno de ellos. (Gráfico 5.3)



4) PREGUNTA 4: ¿Realiza usted control de calidad a los reactivos utilizados para tipificación sanguínea, utiliza controles internos, analiza el inserto y recibe capacitación del uso de los reactivos por parte de la casa comercial?

Se estableció que el 8% (N=1) laboratorio realiza todos los procesos contemplados en un control de calidad. (Gráfico 5.4).



5.2 POBLACIÓN ANALIZADA

De acuerdo al cálculo del N se analizaron 10 reactivos anti-D disponibles en el mercado. En base a la información de cada inserto, se encontró 3 reactivos tipo policlonal y 7 tipo monoclonal; de los de tipo monoclonal 3 fueron Dual, y de tipo policlonal 2 fueron Dual. (Gráfico 5.5)



El gráfico muestra la distribución de los reactivos analizados.

Tabla 5.1 Distribución de las casas comerciales y reactivos analizados.

Casa comercial	Tipo de reactivo
Reactivo 1	Type Anti-D (IgM)
Reactivo 2	ImmuClone anti-D rapid, IgM
Reactivo 3	Anti-D IgG + IgM Monoclonal
Reactivo 4	Anti-D IgG+IgM Monoclonal
Reactivo 5	Anti-D (Rh0) monoclonal
Reactivo 6	Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend
Reactivo 7	Anti-D Blend
Reactivo 8	Anti-D IgG/IgM Blend
Reactivo 9	DiaClon Anti-D monoclonal
Reactivo 10	Anti-D IgG/IgM Blend

La tabla muestra las diferentes casas comerciales que distribuyen los reactivos monoclonales y policlonales

Se evaluó las características físicas de cada reactivo determinándose que mantienen un aspecto transparente de acuerdo a lo establecido en las normas de control de calidad del manual AABB, la etiqueta mantiene integridad y contiene la información de fecha de caducidad, volumen, temperatura de almacenamiento y lote. Sin embargo, 70% (N=7) de los reactivos, no tienen registro sanitario.

Así También el 20% (N=2) no poseen inserto, siendo uno de los instrumentos más importante, pues se debe incluir con cada reactivo para establecer los parámetros a seguirse de acuerdo al fabricante. (Tabla 5.2)

Tabla 5.2. Evaluación de las características físicas de los reactivos anti-D.

Nombre del Reactivo	Type Anti-D (IgM)	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) Monoclonal
Casa comercial	Reactivo 1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5
Aspecto	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
Fecha de Caducidad	2014/05/31	05/10/2014	01/02/2015	2014/10/10	2014/12/31
Temperatura de Almacenamiento	2°-8°C	2°-8°C	2°-8°C	2°-8°C	2°-10°C
Lote	11005	515013	740134-A2	34374	105400
Referencia	71042	66008	1700021	3440010	1443155
Reg. Sanitario Ecuatoriano	AD-0355-06-03	No	No	No	No
Inserto	Si	Si	Si	Si	Si
Tipo de reactivo de acuerdo al análisis de la composición	Policlonal Dual	Policlonal	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal Dual
Volumen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Nombre del Reactivo	Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend	DiaClon Anti-D Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend
Casa comercial	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10
Aspecto	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
Fecha de Caducidad	2014/09/31	05/01/2014	2015/04/31	2014/12/31	201/06/31
Temperatura de Almacenamiento	2°-8°C	2°-8°C	2°-8°C	2°-8°C	2°-8°C
Lote	714052	V119097	104053	11280.79.10	155013
Referencia	No	No	ARH/020	No	ARH/020
Reg. Sanitario Ecuatoriano	No	No	AD-12140706	No	AD-12140706
Inserto	No	No	Si	Si	Si
Tipo de reactivo de acuerdo al análisis de la composición	Policlonal Dual	Monoclonal Dual	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal Dual
Volumen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

La tabla muestra las características físicas de cada reactivo analizado.

Se estableció la composición de cada uno de los reactivos en base a la información descrita en los insertos, determinándose que el 30% (N=3) de los reactivos disponibles en el mercado como monoclonales de acuerdo a su descripción deben ser clasificados como policlonales. Adicionalmente, se determinó que la línea celular humanos ESD y LM3 es común en reactivos “Blend” monoclonales y un policlonal; la línea celular MS-26 productora de IgG está presente en tres reactivos monoclonales y dos reactivos contiene las dos líneas celulares MS 26 y TH-28. Cuatro reactivos contienen potenciadores químicos y todos poseen en su composición azida de sodio como preservante, y 3 contienen la línea RUM. (Tabla 5.3)

Tabla 5.3 Composición de cada uno de los reactivos monoclonales y policlonales anti-D de acuerdo a las especificaciones de cada inserto.

	Type Anti-D (IgM)	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal
Casa comercial	Reactivo1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5
Composición	Anticuerpos humanos IgM, diluidos en una solución buffer, con adición de potenciadores químicos macromoleculares, material bovino y azida de sodio (<0.1%) como agente preservante	Anticuerpos diluidos IgM en un buffer que contiene albúmina bovina, tetraacetato de etilendiamina (EDTA), y macromoléculas como potenciadores químicos. Contiene azida de sodio (0,1%), como conservante	Reactivo escasamente protéico combinado que contiene Anticuerpos humanos IgM e IgG diluidos en un tampón fosfato con cloruro de sodico (0,9%), albúmina bovina (3g%) y potenciadores macromoleculares. clon-Línea celular IgM RUM-1 IgG MS-26	Mezcla de anticuerpos IgG e IgM anti-D monoclonales humanos bajo en proteínas. Línea celular IgG MS-26, IgM RUM-1. Tampón fostatos que incluye cloruro sodico 0,99%, albúmina bovina 3%, azida sodica <0.1% y potenciadores macromoleculares.	Mezcla de anticuerpos monoclonales humanizados IgM/IgG (Blend) pertenecientes a los clones TH-28 (Secretor de IgM) Y MS-26 (Secretor de IgG), en una solución tampón conteniendo 1g/l de azida sodica como conservante
	Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend	DiaClon Anti-D monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend
Casa comercial	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10
Composición	Anti-Dduoclonal IgM e IgG Blend	No hay información	El componente principal de este reactivo es derivado del cultivo In Vitro de heterohybridoma humanos y de ratón LDM3 el cual secreta anti-D IgM y ESD1 el cual secreta Anti-D IgM. La fórmula también contiene menos del 0,1% azida y EDTA	IgG e IgM anticuerpos. Líneas celulares MS26, TH-28	El componente principal de este reactivo es derivado del cultivo In Vitro de heterohybridoma humanos y de ratón LDM3 el cual secreta anti-D IgM y ESD1 el cual secreta Anti-D IgM. La fórmula también contiene menos del 0,1% azida y EDTA

Se evaluó la avidéz de cada uno de los reactivos utilizando células panel de fenotipo conocido y células de donantes de sangre que fueron tipificadas determinándose que no existen diferencias significativas entre los reactivos probados.

Tabla 5.4. Determinación de la avidéz de cada uno de los reactivos anti-D monoclonales y policlonales.

		Nombre Codificado de los Reactivos Comerciales Evaluados									
Células Panel	Fenotipo	Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Type Anti-D (IgM)	DiaClon Anti-D monoclonal	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend
		Reactivo1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10
R1wR1	CCCwDee	5,00 segundos	5,00 segundos	6,00 segundos	5,00 segundos	7,00 segundos	7,00 segundos	6,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos
R1R1	CCDee	5,00 segundos	5,00 segundos	6,00 segundos	5,00 segundos	7,00 segundos	7,00 segundos	6,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos
R2Rz	CCDee	5,00 segundos	5,00 segundos	6,00 segundos	5,00 segundos	7,00 segundos	7,00 segundos	6,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos
Ror	ccDee	5,00 segundos	5,00 segundos	6,00 segundos	5,00 segundos	7,00 segundos	7,00 segundos	6,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos
Cédulas del Donante											
R1/R1	CDe	5,60 segundos	6,02 segundos	7,26 segundos	5,90 segundos	10,24 segundos	7,83 segundos	7,80 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos
R2/R0	cDEe	5,20 segundos	4,49 segundos	6,27 segundos	5,40 segundos	9,89 segundos	9,49 segundos	6,90 segundos	6,70 segundos	5,20 segundos	6,50 segundos
RZ/r	CcDEe	6,20 segundos	5,70 segundos	6,50 segundos	5,10 segundos	6,00 segundos	6,70 segundos	7,10 segundos	4,00 segundos	3,00 segundos	4,00 segundos
R2/r"	cDE	3,00 segundos	3,00 segundos	4,00 segundos	4,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos	5,00 segundos	4,00 segundos	3,00 segundos	4,00 segundos
R1/r	CcDe	5,89 segundos	4,83 segundos	5,35 segundos	5,37 segundos	7,71 segundos	6,28 segundos	6,54 segundos	5,99 segundos	6,29 segundos	5,41 segundos
RZ/r"	CDE/cDE	5,94 segundos	5,90 segundos	5,58 segundos	5,94 segundos	4,86 segundos	8,86 segundos	6,48 segundos	7,16 segundos	6,97 segundos	6,80 segundos
R1	CDe/CDe	4,95 segundos	5,04 segundos	5,62 segundos	5,58 segundos	8,01 segundos	7,56 segundos	6,35 segundos	5,90 segundos	6,12 segundos	5,81 segundos
RZ/R0	CDE/cDe	4,86 segundos	4,46 segundos	5,36 segundos	5,31 segundos	7,88 segundos	6,12 segundos	5,90 segundos	6,71 segundos	5,90 segundos	6,35 segundos
R0/r	CDe /Cde	5,45 segundos	3,69 segundos	5,22 segundos	5,22 segundos	8,24 segundos	5,36 segundos	6,17 segundos	5,85 segundos	5,94 segundos	5,90 segundos
R0/r''	CDe/Cde	4,99 segundos	4,55 segundos	5,54 segundos	5,18 segundos	7,38 segundos	6,26 segundos	6,20 segundos	6,30 segundos	5,63 segundos	6,39 segundos
r	cde/cde	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
r"	cEe	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
r'	Cce	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

La tabla muestra los tiempos de reacción de cada uno de los reactivos con diferentes fenotipos de células Rh-Hr.

Se estableció la potencia de cada uno de los reactivos determinándose que los reactivos #5, 6, 7, 8, y 10 mantiene la potencia más baja de 1/64 en relación a los demás, sin embargo de acuerdo a los valores mínimos propuestos por la AABB estarían dentro de los títulos aceptados; pero de acuerdo al estudio realizado por Escobedo 2012 debería obtenerse valores superiores a 1/64 (Escobedo A, 2012).

Los reactivos restantes mantienen potencias > 1/128 en la fase de 37°C y Coombs (antiglobulínico), a pesar de ello se mantienen en los niveles superiores a los recomendados por la AABB que es >1/32. (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Determinación de la potencia de los reactivos policlonales y monoclonales anti-D.

Nombre Comercial de los Reactivos			Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Type Anti-D (IgM)	DiaClon Anti-D monoclonal	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend
Células Panel	Fenotipo	Temperatura de reacción	Reactivo 1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10
R1wR1	CCCwDe ^e	T. Ambiente	1/64 (+/-)	1/128 (+)	1/256 (+/-)	1/512 (+/-)	1/64 (+)	1/64 (+)	1/64 (+/-)	1/64 (+)	1/256 (+/-)	1/64 (+)
		37° C	1/512 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/64 (+)	1/64 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)
		Coombs	1/512 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/64 (+)	1/64 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)
R1R1	CCDee	T. Ambiente	1/32 (+)	1/256(+)	1/128 (+/-)	1/256(+/-)	1/64 (+)	1/128(+/-)	1/64 (+/-)	1/16 (+/-)	1/256 (+/-)	1/64 (+)
		37° C	1/512 (+/-)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)	1/128(+/-)	1/64 (+)	1/32 (+)	1/256 (+)	1/64 (+)
		Coombs	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)	1/128(+/-)	1/64 (+)	1/64 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)
R2Rz	CCDee	T. Ambiente	1/64 (+/-)	1/256(+/-)	1/128 (+/-)	1/512 (+/-)	1/64 (+)	1/128(+/-)	1/64 (+/-)	1/32 (+/-)	1/128 (+/-)	1/32 (+)
		37° C	1/512 (+/-)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)	1/128(+/-)	1/64 (+)	1/32 (+)	1/128 (+/-)	1/32 (+)
		Coombs	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)	1/128(+/-)	1/64 (+)	1/32 (+)	1/512 (+)	1/32 (+)
Ror	ccDee	T. Ambiente	1/32 (+/-)	1/256(+/-)	1/64 (+/-)	1/256(+/-)	1/64(+/-)	1/64(+/-)	1/64 (+/-)	1/32 (+/-)	1/256 (+/-)	1/64 (+)
		37° C	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+/-)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/64 (+)	1/64 (+)	1/256 (+)	1/64 (+)
		Coombs	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/64 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/64 (+)

(+)= Aglutinatos muy pequeños

(+/-) Aglutinación apenas visible.

Se llevaron todas las reacciones a Coombs para establecer la presencia de variaciones en la reacción como mejor potencia o disminución así como factor Rouleaux. (Mautor, 2005).

Nombre Comercial de los Reactivos			Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Type Anti-D (IgM)	DiaClon Anti- D monoclonal	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend
Células Donantes	Fenotipo	Temperatura de reacción	Reactivo1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10
R1/R1	CDe	T. Ambiente	1/16 (+)	1/64(+)	1/64 (+/-)	1/128(+/-)	1/64(+)	1/64(+/-)	1/32(+/-)	1/16 (+/-)	1/64 (+/-)	1/32 (+/-)
		37° C	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+/-)	1/512 (+)	1/32 (+)	1/64(+/-)	1/32 (+)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/32 (+/-)
		Coombs	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/32 (+)	1/64(+/-)	1/32 (+)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/32 (+/-)
R2/R0	cDEe	T. Ambiente	1/32 (+/-)	1/128(+/-)	1/32(+/-)	1/128(+)	1/32(+/-)	1/128(+/-)	1/64 (+)	1/64 (+/-)	1/64 (+/-)	1/16 (+/-)
		37° C	1/256 (+)	1/256(+)	1/512 (+)	1/512 (+/-)	1/32 (+)	1/128(+/-)	1/64 (+)	1/64 (+)	1/128 (+)	1/16 (+)
		Coombs	1/256 (+)	1/256(+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/32 (+)	1/128(+/-)	1/64 (+)	1/64 (+)	1/128 (+)	1/16 (+)
RZ/r	CcDEe	T. Ambiente	1/512 (+/-)	1/128 (+/-)	1/512 (+/-)	1/512 (+)	1/256 (+/-)	1/256 (+/-)	1/64 (+/-)	1/128 (+/-)	1/128 (+/-)	1/32 (+/-)
		37° C	1/512 (+)	1/256 (+/-)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/256 (+)	1/256 (+)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/32 (+/-)
		Coombs	1/512 (+)	1/256(+/-)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/256 (+)	1/256 (+)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/32 (+/-)
R2/r"	cDE	T. Ambiente	1/64(+/-)	1/128(++)	1/64(+)	1/128(+)	1/32 (+/-)	1/64(+/-)	1/64 (+)	1/256 (+/-)	1/64 (+/-)	1/32 (+)
		37° C	1/64(+)	1/256(+/-)	1/64(+)	1/128(+)	1/32 (+/-)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/256 (+/-)	1/32 (+)
		Coombs	1/128(+)	1/256(+)	1/128 (+)	1/128(+)	1/32 (+/-)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/256 (+/-)	1/32 (+)
R1/r	CcDe	T. Ambiente	1/64(+/-)	1/256(+/-)	1/32(+/-)	1/128(+)	1/64 (+/-)	1/64(+/-)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/64 (+/-)	1/32 (+/-)
		37° C	1/64(+)	1/256(+/-)	1/128 (+/-)	1/256(+/-)	1/64 (+/-)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/128 (+)	1/128 (+/-)	1/32 (+/-)
		Coombs	1/128(+)	1/256(+)	1/256 (+/-)	1/256(+/-)	1/64 (+/-)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/128 (+)	1/128 (+/-)	1/32 (+/-)
RZ/r"	CDE/cDE	T. Ambiente	1/64(+)	1/512 (+)	1/16 (+)	1/64 (+/-)	1/32(+/-)	1/16 (+)	1/32 (+/-)	1/32 (+/-)	1/64 (+/-)	1/8 (+)
		37° C	1/256(+)	1/512 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/16 (+)	1/32 (+)	1/64 (+)	1/128 (+)	1/32 (+/-)
		Coombs	1/256(+)	1/512 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/32(+)	1/32 (+)	1/256 (+/-)	1/256 (+)	1/32 (+)
R1	CDe/CDe	T. Ambiente	1/64(+/-)	1/512 (+)	1/32(+/-)	1/512 (+/-)	1/32(+)	1/32(+/-)	1/16(+)	1/32 (+)	1/32 (+)	1/8 (+)
		37° C	1/128(+/-)	1/512 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/32(+/-)	1/16(+)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/8 (+)
		Coombs	1/128(+)	1/512 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/64 (+/-)	1/32(+/-)	1/32 (+)	1/256 (+/-)	1/256 (+)	1/32 (+)
RZ/R0	CDE/cDe	T. Ambiente	1/64(+/-)	1/512 (+/-)	1/256 (+/-)	1/512 (+)	1/32(+/-)	1/16 (+)	1/32 (+/-)	1/32 (+)	1/64 (+)	1/16 (+)
		37° C	1/128(+/-)	1/512 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/16 (+)	1/32 (+/-)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/16 (+)
		Coombs	1/128(+)	1/512 (+)	1/256 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/16 (+)	1/32 (+/-)	1/128 (+)	1/256 (+)	1/32 (+)
R0/r	CDe /CDe	T. Ambiente	1/128(+)	1/512 (+/-)	1/512 (+/-)	1/512 (+)	1/32(+)	1/32(+)	1/32 (+)	1/32 (+)	1/64 (+)	1/16 (+/-)
		37° C	1/128(+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/32(+)	1/32 (+)	1/64 (+)	1/128 (+/-)	1/32 (+/-)
		Coombs	1/128(+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/32(+)	1/32 (+)	1/128 (+/-)	1/256 (+/-)	1/32 (+)

Nombre Comercial de los Reactivos	Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Type Anti-D (IgM)	DiaClon Anti-D monoclonal	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend	Nombre Comercial de los Reactivos	Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	
Células Panel	Fenotipo	Temperatura de reacción	Reactivo1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10	
R0/r''	CDe/Cde	T. Ambiente	1/128(+)	1/512 (+)	1/128 (+/-)	1/512 (+)	1/32(+)	1/32(+)	1/32 (+)	1/64 (+)	1/64 (+)	1/8 (+)	
		37° C	1/256(+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/32(+)	1/32 (+)	1/128 (+/-)	1/128 (+/-)	1/16 (+)	
		Coombs	1/256(+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/512 (+)	1/32(+)	1/32(+)	1/32 (+)	1/128 (+)	1/128 (+)	1/32 (+)	
r	cde/cde	T. Ambiente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		37° C	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		Coombs	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
r''	cEe	T. Ambiente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		37° C	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		Coombs	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
r'	Cce	T. Ambiente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		37° C	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		Coombs	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
Células Donante	Fenotipo	Temperatura de reacción	Reactivo1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10	
		r	cde/cde	T. Ambiente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		37° C	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		Coombs	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
r''	cEe	T. Ambiente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		37° C	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		Coombs	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
r'	Cce	T. Ambiente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		37° C	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		Coombs	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	

La tabla muestra la potencia en diluciones de cada uno de los reactivos frente a células panel (comerciales) y de donantes de fenotipos conocidos.

Al determinar la afinidad se observa que todos los reactivos reaccionan fuertemente con cada una de las células, en cuanto a la especificidad de los reactivos frente a diferentes fenotipos del sistema Rh-Hr se estableció que eran específicos reaccionando de manera adecuada frente a cada célula del fenotipo R y una ausencia de reacción frente al tipo r. (Tabla 5.6). Esto permite establecer que los reactivos mantienen un tipo de anticuerpo-D que reconoce los antígenos D, sin embargo no se puede establecer la diferencia de reactividad entre los fenotipos tipo $R^{0(cDe)}$, $R^{1(CDe)}$, $R^{2(cDe)}$, $R^{z(CDE)}$.

Tabla 5.6. Determinación de la afinidad y especificidad de los reactivos monoclonales y policlonales anti-D frente a células de fenotipo conocido Rh-Hr.

Nombre Comercial de los Reactivos		Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Type Anti-D (IgM)	DiaClon Anti-D monoclonal	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend
Células Panel	Fenotipo	Reactivo 1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10
Células de Panel											
R1wR1	CCCwDee	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R1R1	CCDee	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R2Rz	CCDee	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
r´r	Ccddee	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
rr´	ccddEe	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
rr	ccddee	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
rr	ccddee	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Ror	ccDee	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
Células Donantes											
R1wR1	CCCwDee	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R1R1	CCDee	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R2Rz	CCDee	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
r´r	Ccddee	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
rr´	ccddEe	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
rr	ccddee	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 5.6. Determinación de la afinidad y especificidad de los reactivos monoclonales y policlonales anti-D frente a células de fenotipo conocido Rh-Hr. (Continuación)

Nombre Comercial de los Reactivos		Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Type Anti-D (IgM)	DiaClon Anti-D monoclonal	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend					
Células Panel	Fenotipo	Reactivo1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10					
Células de Donantes																
		R1/R1	R2/R0	Rz/r	R2/r''	R1/r	RZ/r''	R1	Rz/R0	R0/r	RO	R1/R2	R0/r	R2/R2	R1/r	Rz/r
R1/R1	CDe	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R2/R0	cDEe	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
RZ/r	CcDEe	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R2/r''	cDE	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R1/r	CcDe	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
RZ/r''	CDE/cDE	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R1	CDe/CDe	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
RZ/R0	CDE/cDe	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R0/r	CDe /CDe	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
R0	CDe/Cde	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
r	cde/cde	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
r''	cEe	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
r'	Cce	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

(++++) Aglutinación sólido único
 (+++) Varios aglutinatos grandes
 (++) Aglutinatos medianos
 (+) Aglutinatos muy pequeños
 (+/-) Aglutinación apenas visible

La tabla muestra el grado de aglutinación de los diferentes reactivos anti-D frente a los diferentes fenotipos del sistema Rh de las células tanto comerciales como de donantes.

Se estableció la correlación de los resultados obtenidos en cada reactivo determinándose que siete reactivos no cumplen con una de las características establecidas dentro de la evaluación de la capacidad de detección de los reactivos anti-d utilizados en este estudio.

Tabla 5.7. Análisis del cumplimiento de los parámetros establecidos en la evaluación de la capacidad de detección de los reactivos anti-D.

Parámetros	Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Type Anti-D (IgM)	DiaClon Anti-D monoclonal	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend
	Reactivo 1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10
Aspecto Físico: Turbidez	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características
Información del Reactivo: Fecha de caducidad	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características
Temperatura de Almacenamiento	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características
Lote	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características
Registro Sanitario del país (Ecuador)	Cumple con las características	No cumple con las características	No cumple con las características	No cumple con las características	No cumple con las características	No cumple con las características	No cumple con las características	Cumple con las características	No cumple con las características	Cumple con las características
Información del Volumen/ml	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características
Clasificación de acuerdo a la composición	Policlonal Dual	Policlonal	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal Dual	Policlonal Dual	Monoclonal Dual	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal Dual

Tabla 5.7. Análisis del cumplimiento de los parámetros establecidos en la evaluación de la capacidad de detección de los reactivos anti-D. (Continuación)

Parámetros	Anti-D Duoclone IgM/IgG Blend	Type Anti-D (IgM)	DiaClon Anti-D monoclonal	ImmuClone anti-D rapid, IgM	Anti-D IgG + IgM Monoclonal	Anti-D IgG/IgM Blend	Anti-D IgG+IgM Monoclonal	Anti-D (Rh0) monoclonal	Anti-D Blend	Anti-D IgG/IgM Blend
	Reactivo1	Reactivo 2	Reactivo 3	Reactivo 4	Reactivo 5	Reactivo 6	Reactivo 7	Reactivo 8	Reactivo 9	Reactivo 10
Características de anticuerpos: Potencia de acuerdo AABB,2012	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características
Características de anticuerpos: Potencia de acuerdo Escobedo,2012	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	No cumple con las características	No cumple con las características	No cumple con las características	No cumple con las características	Cumple con las características	No cumple con las características
Características de anticuerpos: Avidéz	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características
Características de anticuerpos: Afinidad	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características
Características de anticuerpos: Especificidad	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características	Cumple con las características

La tabla muestra la comparación de cada reactivo de acuerdo a criterios de cumplimiento en cada una de las variables analizadas durante el estudio.

6. DISCUSIÓN

Los reactivos hemoclasificadores anti-D son los más utilizados a nivel de banco de sangre y laboratorios del país para determinar si una persona es Rh (D) positiva o negativa (Gonzalez, Hernandez Días, & Alfonso García, 2000); por esta razón la selección del reactivo, bajo normas de calidad permite una detección inequívoca del antígeno D especialmente a nivel de receptores de sangre y mujeres embarazadas evitando de esta manera reacciones pos transfusionales fatales.

Los reactivos anti-D disponibles en Quito están compuestos ya sea por anticuerpos IgM o/y IgG policlonales y monoclonales; se ha determinado que un reactivo constituido por anticuerpos de tipo IgG, conocido como incompleto, requiere de potenciadores de reacción como la albúmina, sin embargo estos potenciadores puede ocasionar el efecto Rouleaux común en mieloma múltiple y/o cáncer provocando falsas aglutinaciones (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012); por esta razón es necesario que sea advertido al usuario mediante la información incluida en el inserto o técnica de cada reactivo; del análisis realizado existe dos casa comercial que distribuye reactivos sin inserto, esto podría ocasionar que no se tome en cuenta las precauciones para obtener resultados confiables. El estudio realizado en Chile ha determinado que para obtener resultados veraces y de calidad en la determinación del antígeno D debe realizarse una lectura crítica y minuciosa del inserto del reactivo para su completa comprensión y realización de la técnica tomando en consideración las limitaciones y precauciones durante el proceso, especialmente al encontrarse con antígenos D débiles (Arturo Almonacid, Anabalón Soto, Celis Morales, & Ramírez Muñoz, 2012).

Se ha estimado que entre el 30 a 85% de personas Rh D negativas en algún momento han recibido transfusiones Rh D positivas, ocasionando reacciones hemolíticas fatales; las causas de este error son variadas, entre ellas se encuentra una falta de control de calidad de los reactivos utilizados, aplicación errada del proceso de detección y la no utilización de control negativo. (Arturo Almonacid, Anabalón Soto, Celis Morales, & Ramírez Muñoz, 2012); es por esta razón, que se debe realizar un análisis físico de los reactivos que permita constatar su integridad, así como verificar a través de su inserto la composición y características de los anticuerpos que lo componen como: afinidad, avidéz y potencia.

También se debe tomar en consideración que existen una amplia gama de variables que influyen directamente en la detección serológica del antígeno D, una de ellas es la composición de los reactivos. Es primordial dar a conocer al usuario el tipo de inmunoglobulina que fue utilizada para la preparación, en el estudio se estableció que los reactivos considerados policlonales, estaban formados por anticuerpos humanos diluidos y estabilizados en potenciadores químicos que le otorgan la capacidad de reducir la distancia entre la inmunoglobulina y el antígeno eritrocitario favoreciendo la aglutinación y por ende aumenta su potencia; en el estudio se obtuvo una detección del antígeno hasta una dilución del reactivo de 1/512. (Escobedo A, 2012). Sin embargo, estos potenciadores en ocasiones pueden provocar una aglutinación no específica con glóbulos rojos cubiertos de IgG como ocurre en ciertas enfermedades como anemias hemolíticas, eritrocitos sensibilizados luego de una transfusión, por lo que, al utilizar este tipo de reactivos es necesario correr en paralelo un control negativo (Scott, Lesley, & Alan, 2004) y preferentemente no utilizar este reactivo en investigaciones de reacciones pos transfusionales.

Adicionalmente, estos reactivos están compuestos por IgM, una inmunoglobulina pentavalente policlonal que tiene la ventaja de producir una reacción de aglutinación prolongada favoreciendo los resultados en el parámetro de avidéz, en contraste los reactivos que contienen IgM monoclonal humana que tienen la desventaja de reaccionar pobremente, o nada con ciertas variantes de D, posiblemente constituye una de las causas de la presencia de aloinmunización en donantes masculinos (Ulloa, 2009-2012).

Los reactivos monoclonales mostraron una baja potencia $<1/128$, de acuerdo a los fabricantes no existen reactivos que puedan detectar todos los tipos de variante D y que están dirigidos hacia epítopes limitados, y por lo tanto no son perfectos o infalibles, por eso se hace énfasis en conocer el clon celular del que provienen. (Mautor, 2005).

Ante estos problemas, los investigadores han adoptado varias estrategias como proporcionar reactivos denominados "Blends"; uno de ellos fue analizado en este estudio encontrándose una potencia de 1/512, avidéz y especificidad adecuada; este reactivo se encuentra compuesto por IgM monoclonal que tiene la ventaja de detectar el antígeno D en pruebas salinas y en el caso de resultados negativos pueden ser confirmados en un test antiglobulínico (Coombs); además posee IgG policlonal humano cuidadosamente controlado para evitar un bloqueo entre las dos inmunoglobulinas (Storry JR, 2011).

La producción de reactivos anti-D monoclonales ha evolucionado de una forma acelerada, actualmente existe 40 líneas celulares diferentes cada una de ellas dirigidas a producir un anticuerpo para un determinado epítotope, siendo esto la base de la falta de detección ante antígenos D con diferentes o escasos epítotospes, como en el caso de D parcial, ya que estos anticuerpos no flanquean a todos los antígenos (Scott, Lesley, & Alan, 2004) (Mautor, 2005). Estos reactivos monoclonales mantienen la desventaja de la especificidad de un único epítotope, esto puede evitarse con el uso de mezclas de líneas celulares; los reactivos distribuidos en el país mantienen en su composición dos líneas: clon IgM RUM1-IgG MS-26 (Gonzales, 2000), sin embargo expresan una baja potencia y variable avidéz.

Algunos reactivos monoclonales pueden fallar en la aglutinación de cierto tipo de eritrocitos siendo dependientes de la técnica como pH, temperatura, es decir cualquier variación dentro del proceso afectaría la detección del antígeno D siendo esto una de las posibles causas en la disminución de la potencia observada en este estudio; así también algunos reactivos monoclonales pueden presentar reacciones cruzadas (Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012).

Además de los reactivos existen otras fuentes de error producidas por el operador quien asume que puede alterar las condiciones de la prueba al desconocer las advertencias del fabricante incluidas en el inserto no proporcionado por la casa comercial (Franco, 2003), a esto se suma el no diseñar un control "calidad propio" que facilite conocer los parámetros de cada reactivo. Por todo esto es de suma importancia que se establezcan procedimientos para la determinación inequívoca del antígeno D de forma reproducible y confiable.

También hay que tomar en consideración el denominado "factor humano" ya sea del paciente como del operador que ocasiona errores en la detección del antígeno D como es la presencia de aglutinina frías o calientes que cubren a los eritrocitos como en ciertas enfermedades; contaminación inadvertida del reactivo, glóbulos rojos poliaaglutinantes que producen resultados falsos positivos; en el caso de resultados falsos negativos pueden deberse a: omisión del reactivo en el momento de la prueba, suspensión globular demasiado concentrada (efecto prozona), glóbulos rojos con antígeno D débil y una resuspensión fuerte del aglutinado que ocasiona resultados negativos en la prueba, todos estos factores sumados a un reactivo sin inserto y sin validación ocasiona una falta de detección de antígenos D débil o parcial, consecuente ocasionando un verdadero

problema de salud pública. Para evitar estas variables durante el estudio se utilizó siempre un control negativo y positivo que consistía en células comerciales caracterizadas previamente.

7. CONCLUSIONES

- Los reactivos disponibles en Quito para la detección del antígeno D son distribuidos bajo la presentación de monoclonales, sin embargo al analizar la información del inserto fueron catalogados 3 reactivos como policlonales.
- Al evaluar las características físicas se constató que todos los reactivos presentan un aspecto transparente indicativo de que no existe contaminantes visibles que puedan mostrar un posible deterioro del reactivo.
- El análisis de la información contenida en cada etiqueta mostró que en todos los reactivos estaba impreso: fecha de caducidad, lote y temperatura de almacenamiento; sin embargo 7 de los 10 reactivos analizados no tenían registro sanitario otorgados por ARCSA de Ecuador a pesar de constituir un requisito legal para ser comercializados.
- Un aspecto importante fue la falta de insertos en dos de los reactivos que no tienen registro sanitario, esto no permite conocer el procedimiento y utilización del reactivo provocando posibles errores en su uso.
- La determinación de la avidéz demostró una variación poco significativa en los 10 reactivos, variando entre 5 a 7 segundos aproximadamente.
- Al analizar la potencia y tomando en consideración que el límite mínimo es 1/64 según la AABB, 2012 se estableció que los reactivos 1, 2, 3, 4 y 9 poseían un alto enlace aún en diluciones elevadas; de estas 2 fueron clasificados como policlonales y 1 como dual (IgG&M); de acuerdo a estos resultados estos reactivos detectan cantidades mínimas de antígeno D.
- El 100% de los reactivos mostraron especificidad durante el análisis.
- La comparación de los reactivos demostró que los reactivos policlonales mantienen una alta potencia, avidéz y especificidad; el 67% (N=2) de estos reactivos presentaron en su composición potenciadores químicos-macromoléculas y el 33% (N=1) fue duoclonal IgG&IgM.
- Los reactivos utilizados para tipificación del antígeno D sean monoclonales o policlonales muestran ser adecuados sin embargo debe alertarse al personal de laboratorio sobre la avidéz que determina el tiempo de espera antes de emitir un resultado definitivo.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda al personal de los laboratorios que realizan tipificación sanguínea, solicitar y exigir a las casas comerciales la inclusión de los insertos en los reactivos utilizados para la detección del antígeno D.
- Establecer un protocolo de trabajo en el uso de reactivo anti-D que oriente a los usuarios a evitar la presencia de errores que puedan darse durante el proceso, como tiempo de espera para observar una adecuada aglutinación, temperatura final de reporte, entre otros.
- De acuerdo al tipo de reactivo utilizado sean estos policlonales, monoclonales y/o duals establecer un algoritmo de detección para la presencia de antígenos de D.
- Establecer un control de calidad en todos los reactivos utilizados en la detección de grupos sanguíneos.
- Utilizar controles negativos (albúmina) durante cada ensayo ya que esto permitirá confirmar la presencia del fenómeno Rouleaux causante de resultados falsos positivos.
- Establecer un algoritmo de detección en casos de investigación de reacciones pos transfusionales a causa del sistema Rh, hay que tomar en cuenta la composición de los reactivos para establecer que proceso seguir durante la detección.
- Se recomienda a las instituciones y laboratorios públicos y privados del país que realizan pruebas de tipificación sanguínea solicitar al ARCSA el informe de evaluación de cada parámetro de los reactivos y el registro sanitario ecuatoriano.
- De acuerdo a los resultados del presente estudio se recomienda el uso de reactivos policlonales, monoclonales y/o duals siempre y cuando se analice correctamente el inserto y se establezca un algoritmo de detección para cada caso sea este: tipificación sanguínea en la población sana, enferma, y/o en investigación de reacciones transfusionales por el sistema Rh.
- Se recomienda que el personal de laboratorio adquiera reactivos con registro sanitario ecuatoriano.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia nacional de regulación, Control y Vigilancia Sanitaria. (2014). Base de datos- Dispositivos Médicos y Reactivos Químicos. http://www.controlsanitario.gob.ec/?page_id=2039.
- Aires, u. d. (2012). *fisiología de la sangre*. Obtenido de <http://www.fmed.uba.ar/depto/fisiologia/ua1/gu%C3%ADa%20sangre%202012.pdf>
- Argall, C. B. (1998). Presence of anti D antibody in the serum of Du patient. *J Lab Clinical Medical*, 41:895-8.
- Arturo Almonacid, A., Anabalón Soto, P., Celis Morales, M., & Ramírez Muñoz, V. (2012). Recomendaciones para la clasificación sanguínea Rh D. *Instituto de Salud Pública-Chile*, 1-8.
- Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB. (2012). Manual Técnico. *AABB*.
- Baptista-González, H. (2004). Actualidades del sistema Rh-Hr. *Medigraph*, 140(3), S37-40.
- Batista-Jimenes, H. A. (2005). El sistema Rh, una mirada a fondo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 43 (Supl 1): 3-8.
- Beckers EAM, T. P. (1994). A study of the prevalence and patterns of inheritance of partial D antigen category VI in a white donor population . *Transfusion*, 455.
- Begoña Laiz Marro, E. A. (2004). *Administración de sangre y*. Recuperado el 11 de febrero de 2013, de <http://193.145.164.73/publicaciones/documentos/V.4956-2004.pdf#page=225>
- Bencomo A, H. P. (1991). Variante D (Rho) informe de un caso. *Cubana Hemotol Inmunol Hemoter*, 98-102.
- Bencomo-Hernández Antonio A., A.-V. M.-J.-G. (2011). Desarrollo de la Inmunohematología en el Instituto de Hematología e Inmunología. *Revista Cubana*, 27(1)109-118.

- Credidio DC, P. J. (2011). Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology*, 27(1): 6-11.
- Escobedo A, R. E. (2012). Evaluación de reactivos hemoclasificadores anti-D utilizados en la rutina por los servicios. *Congreso de la sociedad de hematología-Instituto de Salud de Chile*.
- Franco, E. (2003). El control de la calidad de los análisis inmunológicos en la Región de las Américas. *Revista Panamericana de la Salud*, 2: 176-182.
- Gargiulo, D. (2005). Sistema Rh. *Sistema Rh Loque hay que saber*, (págs. 2-14). Mexico.
- Gonzales, O. M. (2000). Produccion de suero anti-D quimicamente modificado. *Laboratorios Betera*.
- González, C. B. (1992). prevención posnatal de la isoimmunización RHo (D) por la inmunoglobulina G anti-D producida en Cuba. *Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 37-41.
- Gonzalez, O., Hernandez Días, P., & Alfonso García, L. (2000). Producción de suero anti-D químicamente modificado. *Médical Revista*, 14-16.
- Hernández Díaz, P., Bencomo Hernández, A., & Rivero Jimenez, R. (2000). Evaluación de los anticuerpos monoclonales anti-D para la tipificación del sistema Rh(D) / Assessment of antigen-D monoclonal antibodies in the typification of Rh(D) system. *Revista Argentina de transfusión*, 26(2):143-53.
- Judd, W. M. (2006). Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells. *Immunohematol.*, 22(1):37.
- Kohler G, M. C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256-495.
- Martín González Odalys, H. D. (2000). Producción de suero anti-D quimicamente modificado. *Laboratorios Bethesta*.
- Martín González, O., Díaz Hernández, P., & García Alonso, L. (2000). Producción de suero anti-D químicamente modificado. *Scielo*, 15-20.

- Matos Bayeau, A. A. (2011). Phases for the implementation of the polycations technique in the Provincial Blood Bank from Santiago de Cuba . *Medisan*, 15(3):287.
- Mautor, D. (2005). Reactivos utilizados en la rutina de banco de sangre. 1.
- Ministerio de Salud Pública. (2001). <http://www.ecomint.com.ec/sanita.htm>. Obtenido de MSP: <http://www.ecomint.com.ec/sanita.htm>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2012). Guía de Buenas Prácticas de Laboratorio. *Registro Oficial*.
- Ministerio de Salud Pública. (s.f.). Disposición Ministerial. N° 00002393.
- Muñiz Dias, E. (2010). Grupos sanguíneos eritrocitarios. En E. Muñiz Días.
- Polin H, D. M. (2007). Effective molecular RHD typing strategy for blood donations. *Transfusion*, 47: 1350-5.
- Pujol, R. M. ((sf)). ANTICUERPOS MONOCLONALES DE PRIMERA Y SEGUNDA APLICACIONES BIOMEDICAS. http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_2673.pdf solo disponible en este sitio, 1-16.
- Reagents, S. (19 de 09 de 2013). *Sanquin*. Obtenido de <http://www.sanquinreagents.com>
- Rivero Jiménez, R. (2000). Anticuerpos Monoclonales anti-Rh antecedentes y estado actual. *Revista Cubana de Hematología*, 16 (1) 30-7.
- Rojas, E. (2006). *Inmunología*. Mexico: Médica Panamericana S.A.
- Roubinet, A. P. (1996). Frequency of partial D phenotypes in the south western region of France. *Transf Clin Biol*, 247.
- Scott, M., Lesley, G., & Alan, R. (2004). Anticuerpos anti-Rh(D) humanos modificados. *National Blood*.
- Storry JR, C. L. (2011). International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and Blood. *Vox Sang*, 101:77-82.
- Swati Kulkarni, V. K. (2013). A simple diagnostic strategy for RhD typing in discrepant cases in the Indian population. *Blood Transfus*, 11: 37-42.

Ulloa, A. (2009-2012). Análisis retrospectivo de la frecuencia y tipo de anticuerpos irregulares en donantes voluntarios de sangre en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatorina-Quito.

10. ANEXOS

Anexo 1: Ejemplo de la información que posee el inserto para el análisis de la composición, precauciones, proceso de detección y reporte de resultados.

IgG/IgM Reactivo para la detección de antígeno D (Rho)

SIGNIFICACION CLINICA

Las observaciones de Levine y Stetson en 1939 y de Landsteiner y Wiener en 1940 establecieron las bases para el conocimiento actual de la importancia clínica en la detección de los anticuerpos anti-D.

Aproximadamente el 15% de los individuos de raza blanca y el 8% de los individuos de raza negra carecen del antígeno D y son fácilmente estimulados cuando reciben este antígeno, ya sea por transfusión o durante el parto, produciendo anti-D. Algunos individuos presentan una disminución cuantitativa en la expresión de su antígeno D, llamados D débiles (antigua- mente D^U). Otros, en cambio, presentan una variación cualitativa en la expresión de dicho antígeno, denominados como D parcial. Dentro de este grupo se encuentra la categoría D^{VI}, caracterizada por poseer una mínima cantidad de epitopes. El antígeno D es altamente inmunogénico siendo responsable de severas reacciones post-transfusionales y de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Existen más de 40 antígenos diferentes identificados dentro del sistema Rh. Sin embargo, es el antígeno (D) el que posee mayor importancia en la clínica después del sistema ABO.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Los glóbulos rojos del paciente se ponen en contacto con suero anti-D (anti-Rho). Si existe en la superficie del eritrocito el antígeno correspondiente, se producirá una aglutinación visible macroscópicamente.

El componente IgM anti-D del reactivo produce aglutinación directa de los glóbulos rojos portadores del antígeno D normal. En la mayoría de los casos los D débiles no se aglutinan directamente con este reactivo.

El componente IgG anti-D del reactivo puede detectar las variantes débiles (detecta D^{VI}) mediante la prueba indirecta con anti-globulina.

REACTIVO PROVISTO

Anti-D (Rho): mezcla de anticuerpos monoclonales humanizados IgM/IgG (Blend) perteneciente a los clones TH-28 (secretor de IgM) y MS-26 (secretor de IgG), en una solución tamponada conteniendo 1 g/l de azida sódica como conservante.

REACTIVOS NO PROVISTOS

De acuerdo a la técnica empleada puede requerirse adicionalmente:

- Solución fisiológica.
- **Suero Anti-humano (poliespecífico)**
- Buffer PBS pH 7,0 ± 0,2.
- Solución salina de baja fuerza iónica (LISS).

INSTRUCCIONES PARA SU USO

El reactivo se provee listo para usar. No debe diluirse.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El Reactivo provisto es estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar. Períodos prolongados de almacenamiento a temperaturas fuera de este rango pueden acelerar la pérdida de la actividad del reactivo.

Evitar los cambios térmicos repetidos y limitar a lo estrictamente necesario la exposición a temperatura ambiente del reactivo.

En estas condiciones de uso y conservación, el reactivo, después de su apertura, es estable hasta la fecha de expiración indicada en la caja.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Desechar el reactivo cuando se observe contaminación del mismo. Si bien la azida de sodio se adiciona como bacteriostático, se recomienda inspeccionar el reactivo visualmente antes de usarlo. No debe utilizarse si presenta turbidez. El reactivo no debe utilizarse si presenta precipitados o partículas.

MUESTRA

Glóbulos rojos o sangre entera

a) Recolección: obtener la sangre en forma aséptica con o sin anticoagulante. Puede analizarse sangre obtenida por punción digital para la técnica en placa. Para evitar la coagulación de la sangre al utilizar esta técnica, se la debe mezclar rápidamente con el reactivo.

b) Aditivos: pueden emplearse como anticoagulantes: heparina, EDTA, ACD (ácido cítrico, citrato, dextrosa), CPD (citrato, fosfato, dextrosa) o CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrosa, adenina). Puede utilizarse Anticoagulante

c) Sustancias interferentes conocidas:

- Los glóbulos rojos recubiertos con inmunoglobulinas o fracciones del complemento pueden dar reacciones falsamente positivas. Cuando se sospecha esta situación deberá realizarse una Prueba de Antiglobulina Directa.

- La hemólisis marcada interfiere.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: las muestras deberán ser analizadas lo antes posible, evitando de esta manera falsos positivos o negativos derivados de la conservación incorrecta o de contaminación bacteriana. Si el análisis no se puede realizar en el momento, las muestras se deben conservar refrigeradas (2-10°C). Si se utilizó EDTA o heparina para su obtención, la tipificación debe llevarse a cabo dentro de las 48 horas. Las muestras obtenidas con ACD, CPD o CPDA-1, pueden ser ensayadas hasta los 35 días de extraída. Si se emplean coágulos, deberá efectuarse la tipificación dentro de los 7 días de obtenida la muestra. Si los glóbulos rojos son almacenados por períodos prolongados pueden observarse reacciones débiles. Para los ensayos con sangre de cordón, los glóbulos rojos deben lavarse previamente con solución fisiológica.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

Dependiendo de la técnica a utilizar, podrán ser necesarios:

- Centrífuga
- Tubos de hemólisis
- Placa de vidrio
- Palillos mezcladores descartables

PRECAUCIONES

Este reactivo es para uso "in vitro" y está estrictamente reservado para uso profesional por personal calificado con comprobada competencia en Inmunoematología. No utilizar el reactivo fuera de la fecha de vencimiento. La azida sódica es tóxica. R22: nocivo por ingestión. La azida puede reaccionar con las cañerías de plomo o cobre generando compuestos explosivos. Al eliminar el reactivo, se debe dejar correr grandes cantidades de agua.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

El reactivo y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

PROCEDIMIENTO

Este reactivo ha sido estandarizado según los procedimientos detallados a continuación; su desempeño en el uso mediante otras técnicas no puede ser garantizado.

I- TECNICA EN PLACA

Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 40-50% en plasma/suero autólogos, PBS pH 7,0 ± 0,2 o solución fisiológica. También puede emplearse sangre entera.

1) Colocar una gota de Anti-D (Rho) sobre una placa de vidrio limpia y rotulada.

2) Agregar al lado una gota de la suspensión de glóbulos rojos a probar. Debe mantenerse la relación antisuero: células en todos los ensayos.

3) Mezclar el antisuero y los glóbulos rojos con un palillo descartable en un área de 2 cm de diámetro y balancear constantemente la placa durante 2 minutos.

Observar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa. Si el período de observación es mayor a 2 minutos, efectos de la evaporación del reactivo pueden conducir a resultados equivocados (débilmente positivos).

Algunas muestras D débiles o D parcial pueden no aglutinar cuando se utiliza la técnica en placa. Ante resultados indeterminados o negativos deben confirmarse utilizando la técnica en tubo.

Las técnicas en placa no están aconsejadas para la detección de muestras D débil o D parcial.

II- TECNICA EN TUBO

Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 3-5% en plasma o suero autólogos, PBS pH 7,0 ± 0,2, LISS 1,5-2% o en solución fisiológica.

1) Colocar una gota de Anti-D (Rho) en un tubo de hemólisis rotulado.

2) Agregar una gota de la suspensión de glóbulos rojos a probar.

3) Mezclar y centrifugar 20 segundos a 1.000 g.

4) Agitar el tubo para despegar las células y examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa.

Las reacciones aparentemente negativas deben incubarse a 37°C durante 15-30 minutos, luego centrifugar y volver a leer como se describió en 4). Las muestras que aún en estas condiciones resulten negativas deben ser investigadas respecto al antígeno D débil. Efectuando la técnica en tubo, en caso de resultado indeterminado o negativo, se puede continuar con el paso 4 de la prueba antiglobulina indirecta para D débil.

III- PRUEBA ANTIGLOBULINA INDIRECTA PARA D DEBIL

Preparar una suspensión al 3-5% de glóbulos rojos en plasma o suero autólogos, o solución fisiológica.

- 1) Colocar una gota de Anti-D (Rho) en un tubo de hemólisis rotulado.
- 2) Agregar una gota de la suspensión de glóbulos rojos.
- 3) Mezclar e incubar a 37°C durante 15-30 minutos.
- 4) Lavar las células 3-4 veces con solución fisiológica o PBS pH 7,0 ± 0,2 descartando perfectamente la solución salina residual o sobrenadante y resuspender las células luego de cada lavado.
- 5) Agregar 2 gotas de **Suero Anti-humano (poliespecífico)**, mezclar y centrifugar 20 segundos a 1000 g.
- 6) Agitar ligeramente el tubo para despegar las células y examinar macroscópicamente presencia o ausencia de aglutinación. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa.

Nota: las muestras que dan positivo el test de Coombs directo no pueden ser analizadas por la prueba antiglobulina indirecta.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La observación de aglutinación (con cualquiera de las técnicas empleadas) indica presencia del antígeno D; la reacción es positiva y el individuo será clasificado como Rh positivo.

La aglutinación de los glóbulos rojos en estudio con el reactivo anti-D por la prueba antiglobulina indirecta para D débil, indica que los glóbulos pertenecen a la variedad D débil (siempre que los glóbulos rojos resulten Coombs directo negativo).

La no aglutinación con el reactivo Anti-D en la prueba antiglobulina indirecta para D débil indica ausencia del corresponsivo. Será clasificado como Rh negativo.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de los reactivos es esencial y debe realizarse al comienzo de cada jornada de trabajo, con cada serie de determinaciones de grupo Rh y con pruebas individuales. Como mínimo deberían emplearse: glóbulos rojos R1r como control positivo y glóbulos rojos rr como control negativo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA. La determinación no puede efectuarse sobre glóbulos rojos que dan lugar a test de Coombs directo positivo.

Pueden obtenerse resultados más rápidos y mejor visualización precalentando la placa a 45-50°C.

Los resultados anormales pueden ser consecuencia de:

- Contaminación bacteriana o química de las muestras, de los reactivos o del material.
- Medicación o patología del paciente que provoque reacción cruzada.
- Preparación de los glóbulos rojos diferente a la recomendada.
- Agitación insuficiente que provoque una resuspensión incompleta de los glóbulos rojos.
- Agitación demasiado fuerte que disgregue los aglutinados.
- Demoras en la lectura.

PRESENTACION

- 1 x 10 ml (Cód. 1443155).

BIBLIOGRAFIA

- Levine P., Stetson R.E. - "An unusual case of intragroup agglutination" - J. Amer. Med. Assoc. 113:126-127, 1939.
- White WD, Issitt CH, McGuire D. - "Evaluation of the use of albumin controls in Rh phenotyping" - Transfusion 14:67-71; 1974.
- Race, R.R. and Sanger, R. - "Blood Groups in Man" - 6th ed. Oxford Blackwell Scientific Publications, pág. 178, 1975.
- Moore B.P.L. - Serological and immunological methods of the Canadian Red Cross Blood Transfusion Service, 8th ed. Toronto, Hunter Rose 1980.
- Garraty G. et al. - "Spontaneous agglutination of red cells with a positive direct antiglobulin test in various media" - Transfusion 24:214-217, 1984.
- Issitt P.D. Applied Blood Group Serology 3rd ed., Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, Chapter 10, 1985.
- Guidelines for compatibility testing in hospital blood banks. Clin. Lab. Haem. 9:333-341, 1987.
- Tippett P. - "Sub-Divisions of the Rh (D) antigen" - Med. Lab. Sci. 45:88-93, 1988.
- Widmann F.K. ed Technical Manual 10th ed. Washington DC, American Association of Blood Banks, Chapter 11, 1990.
- Walker R.H., ed. Technical Manual, 11th ed. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, Chapter 11, 1993.
- Jones J., Scott M.L., Voak D. - "Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors" - Transfusion Medicine 5:171-184, 1995.
- Vengelen V., ed. Technical manual. 13th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1999.

Anexo 2. Aidez: Tiempo esperado en que se inicie la aglutinación

<i>Antisuero/Reactivo</i>	<i>Células/Eritrocitos</i>	<i>Título Mínimo</i>	<i>Tiempo de inicio de aglutinación/seg</i>
<i>Anti-A</i>	<i>A1</i>	<i>256</i>	<i>Hasta 15</i>
	<i>A2</i>	<i>128</i>	<i>Hasta 20</i>
	<i>A1B</i>	<i>128</i>	<i>Hasta 15</i>
	<i>A2B</i>	<i>8</i>	<i>Hasta 30</i>
<i>Anti-B</i>	<i>B</i>	<i>256</i>	<i>Hasta 15</i>
	<i>A1B</i>	<i>64</i>	<i>Hasta 15</i>
	<i>A2B</i>	<i>128</i>	<i>Hasta 15</i>
<i>Anti-AB</i>	<i>A1</i>	<i>256</i>	<i>Hasta 15</i>
	<i>A2</i>	<i>64</i>	<i>Hasta 20</i>
	<i>B</i>	<i>256</i>	<i>Hasta 15</i>
<i>Anti-D</i>	<i>R1R2 CDE/CDE</i>	<i>64</i>	<i>Hasta 10</i>
	<i>R1r CDE/cde</i>	<i>64</i>	<i>Hasta 10</i>

Fuente: Manual técnico de AABB (2012)

Anexo 3: Título mínimo de potencia aceptada por AABB, 2012 y Escobedo 2012







Antisuero	Grupo sanguíneo	Título mínimo
Anti-A	A1	256
	A2	128
	A1B	128
	A2B	8
Anti-B	B	256
	A1B	64
	A2B	128
Anti-AB	A1	256
	A2	64
	B	256
Anti-A1 Lectina	A1	64
	A1B	64
Anti-H Lectina	A2	8
Coombs	E+	32
Anti-Rh	R1R2	64

Fuente: Manual técnico de AABB (2012)

	SHC IgM	SHC IgM/IgG	Diaclone IgM/IgG	GrupoBios IgM/IgG	Bioclone Rh1	Seraclone IgM	Seraclone Blend
Células Donante							
R ₁ r	128	128	32	128	64	64	128
R ₁ R ₁	256	128	64	64	64	64	128
R ₂ r	128	128	64	64	32	64	64
R ₁ R ₂	64	64	64	64	64	64	64
R ₂ R ₂	256	256	64	64	128	64	128
R ₀ r	256	64	32	64	128	128	64
.rr	0	0	0	0	0	0	0
.r'r	0	0	0	0	0	0	0
Células Panel							
R _z R1	256	128	64	32	128	128	64
R ₀ r	256	64	32	64	128	128	64
R ₁ R ₁	256	128	64	32	128	64	128
R ₂ R ₂	128	128	64	32	128	128	64
.rr	0	0	0	0	0	0	0
.r'r	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Escobedo, 2012

Anexo 4: Afinidad: valoración de la cantidad de aglutinación que se observe.

<p>4+</p> 	<p>Aglutinación completa de todas las células: 100%</p>
<p>3+</p> 	<p>Aglutinación de la mayoría de células: 80%</p>
<p>2+</p> 	<p>Aglutinación a simple vista: 30%</p>
<p>1+</p> 	<p>Positividad débil: 10%</p>
<p>Negativo</p> 	<p>No se observa aglutinación</p>
<p>L</p> 	<p>Lisis de glóbulos rojos (hemolisis)</p>

Fuente: Manual Técnico AABB, 2012.

Anexo 5: Protocolo de estudio en tubo (Universal)

- Determinación del Rh (Anti-D)

Determinar la presencia del antígeno Rho (D) o la ausencia, en la membrana del eritrocito, por el método del tubo.

Técnica:

1. Preparar una suspensión de eritrocitos problema entre 2-5% en SSI lavados previamente 3 veces
2. Marcar 2 tubos de la siguiente manera: Anti-D (Rh) y TRh (testigo de Rh)
3. Colocar una gota de suspensión de eritrocitos problema en cada uno de los tubos
4. Agregar una gota de reactivo Anti-D al tubo marcado con Anti-D
5. Agregar 2 gotas de albúmina al tubo de TRh
6. Centrifugar durante 60 seg. A 3400 RPM
7. Observar la presencia o ausencia de aglutinación
8. Registrar resultados

Interpretación:

Grupo sanguíneo	Anti-Rh	TRh
Rh positivo	+	-
Rh negativo	-	-

- Variedad Du

Determinar la presencia del antígeno D débil en la membrana del eritrocito

Cuando la determinación del Rh resulte negativo se procede a realizar la técnica para D débil rectificando antes la técnica de Rh.

Técnica:

1. Incubar los tubos Rh y TRh durante 60 min. A 37 grados.
2. Después centrifugar a 3400 RPM durante 60 seg. Observar la presencia o ausencia de aglutinación. En caso de aglutinación se reporta como Rh positivo
3. Si resulta negativo la aglutinación, lavar 3 veces y agregar dos gotas de suero de Coombs, centrifugar 30 seg a 3400 RPM. Observar la presencia o ausencia de aglutinación. En caso de existir aglutinación reportar como Rh positivo débil.
4. Si resulta negativo se reporta como Rh negativo.

(Asociación Americana de Bancos de Sangre AABB, 2012)

Anexo 6: Parámetros que deben medirse de acuerdo a Dra. Elena Franco.

CUADRO 4. Control de calidad de los reactivos. Sueros ABO

Parámetros que se deben controlar	Requisitos cualitativos	Frecuencia de los controles
Apariencia	Ausencia de hemólisis, precipitación, partículas, o formación de gel detectables mediante examen visual	Cada nuevo lote
Reactividad y especificidad	Ausencia de hemólisis inmune, formación de <i>rouleaux</i> o fenómeno de prozona Reacciones claras con los hematíes portadores del antígeno correspondiente Ausencia de reacciones falsas	Cada nuevo lote
Potencia	El suero no diluido debe producir una reacción de 3+ a 4+ en medio salino con hematíes al 3% a temperatura ambiente. Su titulación debe ser de 1/128 para al anti-A, anti-B, y anti-AB con hematíes A ₁ y B, y de 1/64 con hematíes A ₂ y A ₂ B	Cada nuevo lote

CUADRO 5. Control de calidad de los reactivos. Sueros Rh

Parámetros que se deben controlar	Requisitos cualitativos	Frecuencia de los controles
Apariencia	Lo mismo que para los sueros ABO Lo mismo que para los sueros ABO	Diaria Diaria
Reactividad y especificidad	El suero sin diluir debe dar una reacción de 3+ a 4+ en el test diseñado para cada suero	
Potencia	Titulación de 1/16 para anti-D, anti-C, anti-E, anti-c, anti-e y anti-CDE, utilizando hematíes R ₁ r, R ₂ r, r' r, o r* r	Cada nuevo lote

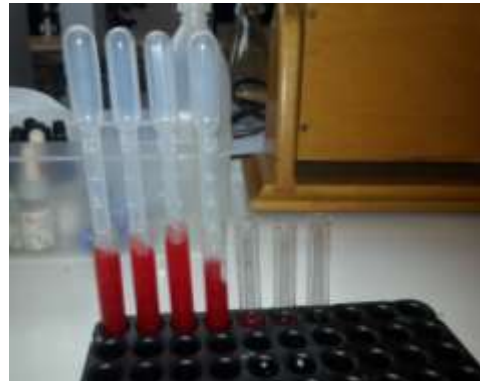
Fuente: Elena Franco, 2003

Anexo 7: Procesos del Estudio

Grafica N°1 Células de panel



Grafica N°2. Realización de diluciones al 2% de células de donantes de sangre tipificadas



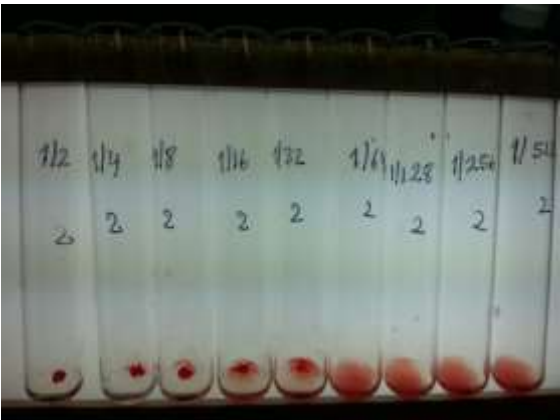
Grafica N° 3 Tipificación de Ccdee en Células obtenidas de donantes de Sangre.



Grafica N° 4 Realización de diluciones seriadas dobladas



Grafica N° 5 Medición de Potencia a Temperatura ambiente



Grafica N° 6 Medición de Potencia a 37°C.



Grafica N° 7 Lavado de luego de incubación a 37°C



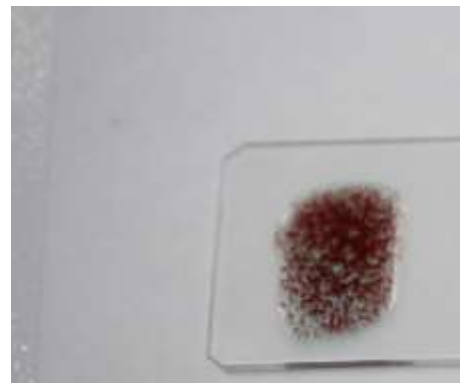
Grafica N° 8 Medición de la Potencia: Prueba de Coombs junto con Control Positivo



Grafica N° 9 Medición de especificidad con el uso de células Panel y donantes de sangre



Grafica N° 10 Medición de Aidez



Fuente: base de datos fotográficos del autor de la disertación.