

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO CLÍNICO

“IDENTIFICACIÓN DEL FENOTIPO RH-HR EN PAREJAS QUE ACUDEN A LA UNIDAD
DE FERTILIDAD Y ESTERILIDAD CLÍNICA CONCEBIR EN QUITO, 2013”

JAIME EDUARDO SOJO LAFAURIE

DIRECTORA: MST. ROSA CHIRIBOGA PONCE.

QUITO, 2014

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, JAIME EDUARDO SOJO LAFAURIE, C.I. 175576675-3; autor del trabajo de graduación intitulado: "IDENTIFICACIÓN DEL FENOTIPO RH-HR EN PAREJAS QUE ACUDEN A LA UNIDAD DE FERTILIDAD Y ESTERILIDAD CLÍNICA CONCEBIR EN QUITO, 2013", previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis:

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

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



JAIME EDUARDO SOJO LAFAURIE. CI. 175576675-3

DEDICATORIA

A mis padres, a mis tíos, y por supuesto a mi esposa, todos ellos quienes día a día me apoyaron en todas las decisiones que he tomado siempre brindándome su amor incondicional, su experiencia y sus consejos; a ellos dedico mi amor a mi profesión, porque ellos lo hicieron posible.

Jaime Eduardo Sojo Lafaurie

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios porque siempre me ha mostrado el camino para salir adelante; en segundo lugar a cada uno de los que son parte de mi familia a mi padre Jaime Alberto Sojo, mi madre, Adriana Lucia Lafaurie, y mis segundos padres, mis tíos, Verne Kayser y Denise Lafaurie; a mis hermanos por siempre haberme dado su fuerza y apoyo incondicional que me han ayudado y llevado hasta donde estoy ahora. A mi directora de tesis MHP. Rosa Chiriboga, Persona que admiro por su gran conocimiento y dedicación hacia los estudiantes.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO I.....	8
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	10
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.3 OBJETIVOS	14
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
CAPÍTULO II.....	15
2.1 MARCO TEÓRICO	15
2.1.1 ANTECEDENTES.....	15
2.1.2 SISTEMA DE ANTIGENO Rh-Hr.....	16
2.1.3 HERENCIA DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS	22
2.1.4 DESARROLLO INMUNOLÓGICO DE ANTI-RH-HR.....	23
2.1.5 SIGNIFICADO CLÍNICO DEL SISTEMA RH.....	25
2.1.6 ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO	25
2.1.7 TÉCNICAS UTILIZADAS EN IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DEL SISTEMA RH.....	27
2.2 MARCO CONCEPTUAL	28
CAPITULO III.....	30
3.1 MARCO METODOLÓGICO	30
3.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1.1.1 Tipo de Estudio.....	30
3.1.1.2 Tipo de Muestreo.....	30
3.1.1.3 Tamaño de Muestra.....	30
3.1.1.4 Criterios de Inclusión	31
3.1.1.5 Criterios de Exclusión	31
3.1.1.7 Análisis Estadístico.....	31
3.2 MATERIALES Y PROCESOS	33
3.2.1 MATERIALES.....	33
3.2.2 REACTIVOS.....	33
3.2.3 PROCESOS.....	34
3.2.3.1 Toma de muestra.....	34
3.2.4 CONTROL DE CALIDAD.....	34

3.2.4.1 Prueba de Aidez.....	34
3.2.4.2 Prueba de Afinidad	35
3.2.4.3 Prueba de Potencia.....	35
3.2.4.4 Prueba de Especificidad	35
3.2.4.5 Reactivo Anti-D	35
3.2.4.6 Reactivo Anti-E	35
3.2.4.7 Reactivo Anti-e.....	36
3.2.4.8 Reactivo Anti-C.....	36
3.2.4.9 Reactivo Anti-c.....	36
CAPÍTULO IV	39
4.1 RESULTADOS.....	39
4.2 DISCUSIÓN	47
4.3 CONCLUSIONES	50
4.4 RECOMENDACIONES	51
5 ANEXOS.....	52
6 BIBLIOGRAFIA.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1. Combinación de las diferentes terminologías del sistema Rh

Tabla N° 2. Operacionalización de las Variables

Tabla N° 3. Posibles genotipos y cigocidad de acuerdo a la identificación fenotípica

Tabla N° 4.1 Total de Fenotipos Rh clasificados de acuerdo al grupo sanguíneo.

Tabla N° 4.2 Presencia de antígeno c y e en personas con factor RhD positivo.

Tabla N° 4.3 Presencia de antígenos C y E en personas con factor RhD negativo.

Tabla N° 4.4 Probabilidad de isoinmunización de acuerdo a los genotipos que pueda heredar la descendencia

Tabla N° 4.5 Cruce realizados para determinar los posibles antígenos causantes de isoinmunización.

Tabla N° 4.6 Posibles antígenos causantes de incompatibilidad

Tabla N° 4.7 Control de Calidad del Reactivo Anti-D

Tabla N° 4.8 Control de Calidad del Reactivo Anti-E

Tabla N° 4.9 Control de Calidad del Reactivo Anti-e

Tabla N° 4.10 Control de Calidad del Reactivo Anti-C

Tabla N° 4.11 Control de Calidad del Reactivo Anti-c

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N°1. Organización Genómica del locus RH humano

Gráfico N° 2. Diagrama de representación de los 10 exones de los genes RHD y RHCE

Gráfico N° 4.1 Frecuencia de mujeres que no tienen hijos vs multiparas

Gráfico N°4.2 Frecuencia de fenotipos del sistema Rh del total de parejas que intervinieron en el estudio.

Gráfico N° 4.3 Total de fenotipos detectados en relación al género

Gráfico N° 4.4: Probabilidad de Isoinmunización materno-fetal

ANEXOS

Anexo 1: Formulario de Consentimiento Informado

Anexo 2: Protocolo de Control de Calidad de Reactivos. Sueros Rh

Anexo 3: Resultados de Control de Calidad de los Reactivos

Anexo 4: Encuestas

Anexo 5: Temperatura Incubadora

Anexo 6: Temperatura Refrigeradora

Anexo 7: Procesos del Estudio

Anexo 8: Propaganda de campaña

RESUMEN

“Identificación del fenotipo Rh-Hr en parejas que acuden a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir en Quito, 2013”

Introducción.- El estudio de la variabilidad fenotípica del sistema Rh ha permitido establecer los principales fenotipos existentes en la población de estudio así como la probabilidad de producirse una incompatibilidad materno-fetal, sin embargo el antígeno estudiado por mucho tiempo fue el D y sus variantes. Las diferentes patologías como la enfermedad hemolítica del recién nacido, las reacciones de hipersensibilidad en transfusiones sanguíneas y las anemias hemolíticas autoinmunes, han despertado un gran interés en los diferentes grupos sanguíneos, en especial los más inmunogénicos. Actualmente se han reportado inmunizaciones ocasionadas por el resto de antígenos denominados CE/ce, diferentes entre el padre y la madre. Este estudio tuvo el objetivo de determinar la probabilidad de que se presente un riesgo de inmunización fetal mediante la identificación del fenotipo Rh-Hr en parejas. **Materiales y Métodos.-** Es un estudio descriptivo, de corte transversal que se buscó determinar la frecuencia de fenotipos Rh en un grupo característico donde se analizaron 192 parejas (384 personas) que acudieron a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir en Quito, durante el año 2013. De las cuales se realizó tipificación sanguínea para el sistema ABO, la identificación del fenotipo Rh, mediante la técnica de aglutinación en tubo y a través del fenotipo determinar los posibles genotipos de cada pareja. **Resultados.-** Los fenotipos de mayor frecuencia fueron 27.6% CcDee, seguido del 17.97% CcDEe, el 15.89% a ccDee, el 15.62% a CCDee, 9.38% a ccDEe, 5,21% a CcDEE, 4.95% a ccDEE, 2,34 % a CCDEe y 0.78% a ccdee, se estableció que 42 parejas tienen la probabilidad de desarrollo de aloinmunización por la existencia de diferentes antígenos del sistema Rh y de acuerdo a las leyes de herencia Mendeliana el niño heredará un haplotipo paterno diferente al que posee la madre, esta afirmación se corroboró al determinar que las mujeres presentan un fenotipo CcDEe en el 28.12% del total, en comparación al masculino que solo tiene una prevalencia del 7.8%. **Conclusiones y Recomendaciones.** Los hallazgos encontrados en este estudio alertan a los laboratorios privados y públicos dedicados a la tipificación sanguínea, que se incluya la detección de los fenotipos del Rh especialmente en mujeres sean estas portadoras o no del antígeno D, esto ayudará a alertar sobre la posibilidad de aloinmunización y de esta manera realizar un seguimiento adecuado en un embarazo.

ABSTRACT

“Identification of the phenotype Rh-Hr in couples that went to the Concebir fertility and sterility clinic in Quito, 2013 .”

Introduction: The study of the phenotypic variability of the Rh system has allowed us to determine the principal causes maternal-fetal incompatibility; however most of these studies have focused on the D antigen and its variations. The different pathologies such as hemophilia in newborns, hyper sensitivity in blood transfusions and autoimmune hemolytic anemia has raised interest in the different blood groups, especially the immunogenic. Currently, there have been reports of the immunizations caused by the differences in the rest of the antigens, called CE/ce, between the mother and the father. This study will allow us to determine the risk of fetal immunizations by identifying the Rh-Hr phenotype in couples. **Methods and Materials:** It is a descriptive and cross-sectional study which seeks to determine the frequency of Rh phenotypes in a characteristic group of 192 couples (384 persons) which went to the fertility and sterility clinic Concebir in Quito during 2013. These couples were blood typed using the ABO system and the Rh phenotype was isolated using tube agglutination techniques. **Results:** The spectrum of phenotypes was: CcDee- 27.6%, CcDEe 17.97%, 15.89% to ccDee, CCDee 15.62%, 9.38% to ccDEe, 5.21% to CcDEE, ccDEE 4.95%, 2.34% to CCDEe, and 0.78% ccdee, was established that 42 couples have the probability of development of alloimmunization by the existence of different antigens of the Rh system and according to the laws of Mendelian inheritance, the child will inherit a different haplotype that has the mother, this statement was corroborated by determining that women have a CcDEe phenotype in 28.12% of the total, compared to men who only has a prevalence of 7.8%. **Conclusions and Recommendations.** The findings in this study alert the public and private laboratories for blood typing, detection of Rh phenotypes included women especially are these carriers or not of the D antigen, this will help to alert you to the possibility of alloimmunization and thus proper monitoring in pregnancy.

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

El estudio de la variabilidad fenotípica del sistema Rh ha permitido establecer los principales fenotipos existentes en la población de estudio así como la probabilidad de producirse una incompatibilidad materno-fetal, sin embargo el antígeno estudiado por mucho tiempo fue el D y sus variantes. (Navarrete, 2012)

El sistema Rh comprende alrededor 49 antígenos eritrocitarios de membrana con alta complejidad y polimorfismo, siendo los más estudiados D, C, c, E y e. Cuando estos antígenos están presentes sobre la membrana eritrocitaria del feto, y la madre no los posee, se desencadena una respuesta inmune, que ataca directamente a los hematíes del embrión provocando anemias severas de tipo hemolítico. (Baptista H. , 2005) Además de la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), existen también las denominadas reacciones de hipersensibilidad en transfusiones sanguíneas y las anemias hemolíticas autoinmunes, esto ha despertado un gran interés en la determinación de fenotipos de los diferentes grupos sanguíneos, en especial los más inmunogénicos como los del Rh. Actualmente se han reportado inmunizaciones y EHRN ocasionadas por antígenos eritrocitarios CE/ce, diferentes entre el padre y la madre. (Omeñaca, 2008)

La isoinmunización materno-fetal es causada por un traspaso placentario de Inmunoglobulinas de tipo G (IgG). Se ha determinado que los anticuerpos involucrados son los correspondientes al sistema Rh y sus fenotipos, dentro de los cuales se encuentran en su gran mayoría anti- D, seguida de anti-C, anti-c, anti-E, y anti-e. (Baptista, 2005)

Una de las formas de prevención constituye un diagnóstico oportuno de una isoinmunización, que se logra a través de la detección de antígenos eritrocitarios de los padres en este caso los relacionados principalmente con el sistema Rh, que indican la existencia de una posible incompatibilidad sanguínea con el feto. (Insunza, 2011). Una de las limitaciones en esta determinación es que aún no existen tratamientos profilácticos para la aloinmunización por antígenos C,c,E,e, debido a que no son los más estudiados en las poblaciones, sin embargo han sido reportados varios casos de enfermedad hemolítica del recién nacido (Ramón.Almuna & Rodrigo, 2009).

Otro aspecto importante constituye los lineamientos establecidos en la ley de Maternidad Gratuita en el Ecuador, documento en el que se estipula un número de pruebas obligatorias para el seguimiento y cuidado de todas las mujeres embarazadas, sin embargo en

hospitales públicos, bancos de sangre y laboratorios clínicos solamente se realiza una confirmación y fenotipificación de pacientes con factor de Rh(d) negativo. El presente estudio es un aporte para visualizar la importancia de detección de fenotipos Rh en parejas, por la aloinmunización como en el caso de requerir transfusiones sanguíneas.

Finalmente, se debería continuar con esta investigación en la población en general y especialmente a nivel de donantes de sangre por ser un aspecto relevante para el Sistema Nacional de Bancos de Sangre.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El estudio de la variabilidad fenotípica del sistema Rh ha permitido establecer las principales causas de incompatibilidad materno-fetal, sin embargo el antígeno estudiado por mucho tiempo ha sido el “D” y sus variantes. Actualmente se han reportado inmunizaciones ocasionadas por el resto de antígenos del sistema denominado CE/ce, diferentes entre el padre y la madre. (Insunza, 2011)

Así, los antígenos de tipo E, a pesar de ser considerados poco comunes dentro de ciertas poblaciones juegan un papel importante en la producción de enfermedades hemolíticas. Lo mismo ocurre a nivel de otros antígenos (Cce) ya que estos pueden desencadenar la lisis de los eritrocitos fetales por la acción de los anticuerpos producidos y la activación del complemento, por ello al conocer el fenotipo materno y paterno se podría prevenir y alertar el inicio de una enfermedad hemolítica en el recién nacido. (Yoshida, 2011)

Una de las forma de prevención constituye un diagnóstico oportuno de una isoimmunización, que se logra a través de la detección de antígenos eritrocitarios de los padres relacionados principalmente con el sistema Rh, que indican la existencia de una posible incompatibilidad sanguínea con el feto. (Baptista H. , 2005).

El estudio realizado por Dajak S, 2013 menciona la importancia del conocimiento de los fenotipos del sistema Rh para prevenir aloimmunización en transfusiones, especialmente en mujeres que podrían posteriormente ocasionar una severa enfermedad hemolítica del recién nacido. Esta práctica ha permitido prevenir en un 40% los casos de Eritroblastosis fetal por el sistema RhCE. (Dajak, 2013)

De la investigación realizada por Ulloa, 2012 en Quito, se determinó la presencia de aloimmunización en mujeres en edad fértil encontrándose un 4,8% de anti-C y 29,46% anti-E, estos datos revelan la necesidad de realizar un estudio de los fenotipos del sistema Rh que ayude a prevenir una aloimmunización en mujeres, por el riesgo durante el embarazo de que el feto tenga antígenos en sus eritrocitos incompatibles con los de la madre.

En nuestro país no existe información de frecuencia de los fenotipos del sistema Rh-Hr en parejas, es por ello que el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, clínicas de fertilidad y laboratorios clínicos deben conocer la distribución de estos antígenos del sistema Rh para prevenir una posible Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido, citopenias y abortos inesperados por incompatibilidad de antígenos eritrocitarios, así como disminuir las tasas de mortalidad y morbilidad infantil por isoimmunización perinatal en el país, ofreciendo a

parejas pruebas de tipificación sanguínea, factor Rh y la fenotipificación Rh. (Navarrete, 2012).

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Ecuador existe el programa de “Maternidad Gratuita y atención a la infancia” donde se realiza un seguimiento a las mujeres embarazadas este control se basa en exámenes clínicos y de laboratorio como biometría hemática, química sanguínea, exámenes de HIV, y tipo de sangre pero no fenotipos del Rh (Ministerio de Salud Pública, 2006). Por lo que se desconoce si existen casos de anemia hemolítica a causa antígenos del sistema Rh, por lo que es necesario realizar un análisis al respecto.

El sistema Rh-Hr es un complejo de aproximadamente 49 antígenos eritrocitarios de membrana con alta complejidad y polimorfismo, siendo los más estudiados D, d, C, c, E y e, por su alta importancia. (Cotorruelo, 2006). Cuando estos antígenos están presentes sobre la membrana eritrocitaria del feto, y la madre no los posee, se desencadena una respuesta inmune, que ataca directamente a los hematíes del embrión provocando anemias severas de tipo hemolítico. (Insunza, 2011).

La isoinmunización materno-fetal es causada por un traspaso placentario de Inmunoglobulinas de tipo G (IgG). Se ha determinado que los anticuerpos involucrados son los correspondientes al sistema Rh y sus fenotipos, dentro de los cuales se encuentran en su gran mayoría anti- D, seguida de anti-C, anti-c, anti-E, y anti-e. (Baptista, 2005)

El estudio realizado en Estados Unidos revela que existen 68 casos de incompatibilidad por cada 1.000 nacidos vivos, y que la isoinmunización por Rh está asociada en 1,5% de los embarazos, la escasa detección de estos fenotipos representa un riesgo a corto plazo. (Molina, 2009) Los anticuerpos irregulares han sido detectados en un 0,3% de las mujeres embarazadas y estos pueden causar anemia fetal. (Yoshida, 2011) En Latinoamérica no existen estudios acertados sobre la incidencia real de estos fenotipos. (Molina, 2009)

La investigación de Alcaraz (2007) enfatiza la importancia de la detección de los antígenos que causan reacciones hemolíticas severas, pues en los bancos de sangre de México se limitan a proporcionar sangre compatible para el ABO y Rh a pesar de los avances en inmunohematología, ignorando la identificación de estos fenotipos. En el estudio se determinó que los fenotipos CDe/CDe y CDE/cDe son los más prevalentes para la población con Rh positivo, para los Rh negativos fue el cde/cde. (Alcaraz, 2007)

Los bancos de sangre en el país realizan la tipificación del grupo sanguíneo y el factor Rh; en el caso de obtener un Rh negativo se procede a efectuar la fenotipificación, de tal manera que cada laboratorio dispone de esta información en cuanto al Rh negativo. Al laboratorio clínico público o privado se tipifica grupo sanguíneo y factor Rh, y este sea

positivo o negativo no es sujeto a fenotipificación, lo mismo ocurre en los laboratorios anexos a clínicas de fertilización.

La falta de información en mujeres y sus parejas, sobre todo en multíparas, conlleva un mayor riesgo para el feto sin dejar de lado las complicaciones que puede presentar la madre por una posible isoinmunización materno-fetal

Ante esta situación en el país, Las clínicas de fertilidad y laboratorios adjuntos se plantean la necesidad de determinar los fenotipos del sistema Rh en parejas ya que a nivel de clínicas de fertilización o laboratorios relacionados no se realiza este procedimiento, que posibilita prevenir una posible enfermedad hemolítica del recién nacido. (Baptista, 2001).

¿Cuál es la distribución fenotípica del sistema Rh-Hr en parejas que asisten a la unidad Fertilidad & Esterilidad Clínica Concebir en Quito?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el fenotipo Rh-Hr en parejas que acuden a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir en Quito.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la distribución de fenotipos de los antígenos D, d, C, c, E y e, en parejas que asisten a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir en Quito.
- Determinar la presencia de antígenos c y e con factor Rh positivas en parejas que asisten a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir.
- Identificar la presencia de antígenos E y C con factor Rh negativo en parejas que asisten a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir.
- Establecer si la presencia de los antígenos Cc y Ee tienen la posibilidad de producir una enfermedad hemolítica del recién nacido en las parejas analizadas.

Limitaciones del estudio: una de las principales limitaciones del estudio constituyó el no encontrar parejas con grupo sanguíneo Rh (d) negativo.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 ANTECEDENTES

La Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir es un centro dirigido a proporcionar diagnóstico de problemas ginecológicos, ayuda y tratamiento. Del total de parejas atendidas en este centro existe un 10% de parejas en que no se logra identificar un factor causal de abortos espontáneos, dificultad para concebir o enfermedades posnatales. (Concebir, 2011)

El Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos (INEC) realizó un análisis de causas de mortalidad fetal en el Ecuador en el año 2013, dentro de los cuales se encontró que de 1099 muertes fetales 10 fueron a causa de incompatibilidades de grupos sanguíneos entre ellos los fenotipos Rh. (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2014)

En Cuenca un estudio realizado en 24 neonatos encontraron que el 100% presentaba antígeno C, el 45.83% correspondería al c, el E en un 50% y el e en un 87.5% dando como fenotipo de mayor frecuencia los antígenos C y e. (Tello & Pardo, 2012)

En Ecuador el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito realizó un estudio de 22 casos de sensibilización materno-fetal de los cuales se encontró 4 (18%) anti-D, 2 (9%) anti-E y 2 (9%) anti-c, y 14 (63.6%) se determinaron otras causas. (Cañizares, 2002). Por otro lado una investigación revela que a nivel de donantes de sangre, los anticuerpos anti-Rh son los más frecuentes, los cuales son considerados de alta significancia clínica porque causan reacciones pos transfusionales tardías. (Ulloa, 2012)

En Colombia un estudio en 1995, indica que los fenotipos CCDEE y CcDEE provienen de la raza indígena, los fenotipos CCdee, Ccdee y ccDee se deben al aporte de raza negra; el fenotipo ccddEe viene de la raza blanca y el fenotipo ccdEE no fue encontrado. (Díaz, 1995) Mientras que un estudio en el 2009, registró que el 69,7% de los bancos de sangre tipifican el antígeno D y que en el 40,8% de estos se realiza fenotipificación del Rh. (Mora, 2010).

En países como Costa Rica determinaron la existencia de diferentes fenotipos en RhD negativos, así el 92,4% correspondieron al fenotipo ccdee y el 7,6% presentaron el antígeno E o C. (Navarrete, 2012) Por otro lado, la distribución fenotípica de donantes vs pacientes en un estudio realizado en México fue de CCDee, CcDEe, CcDee y cinco variantes más con baja frecuencia ccDEe, CCDEe, CcDEE, CCDEE y ccDee para los Rh positivo; y para el Rh negativo el fenotipo ccdee, fue el de mayor incidencia. (Alcaraz, 2007) A través de estos estudios se pudo establecer una variación importante de fenotipos del Rh, muchos de los cuales podrían ocasionar una reacción hemolítica al enfrentarse con el anticuerpo correspondiente.

En México se describe un caso de una mujer de 26 años, múltipara con embarazo gemelar previo, dos cesáreas, sin antecedentes de transfusiones, y sin antecedentes de Enfermedad Hemolítica en sus partos anteriores, la hija de 6 días de nacida presenta ictericia neonatal causada por anticuerpos anti-c y anti-E en el suero de la madre y pegados en los eritrocitos del recién nacido, El padre, al ser c positivo y E positivo, heredó al recién nacido el gen correspondiente. (Bonilla, 2011)

Otro estudio realizado en Hong Kong presenta un caso de una mujer de 36 años con dos embarazos previos y sin antecedentes transfusiones y con fenotipo CCDee cuyo feto desarrollo anemia severa causada por anticuerpos contra el antígeno E presente en el feto. (William, 2003).

2.1.2 SISTEMA DE ANTIGENO Rh-Hr

El sistema de antígenos Rh es un conjunto de antígenos eritrocitarios productos de dos genes localizados en el cromosoma 1, ubicados en la región p 36.13-p34.3 que codifican los polipéptidos no glucosilados del brazo corto del cromosoma 1, denominados RHD y RHCE. (Baptista H. , 2005). Estos antígenos Rh-Hr están conformados por 3 pares de alelos, de los cuales se puede generar 8 haplotipos y estos a su vez se emparejan formando genotipos de los cuales solo 18 fenotipos pueden ser identificados por serología. (Daniels & Bromilow, 2010).

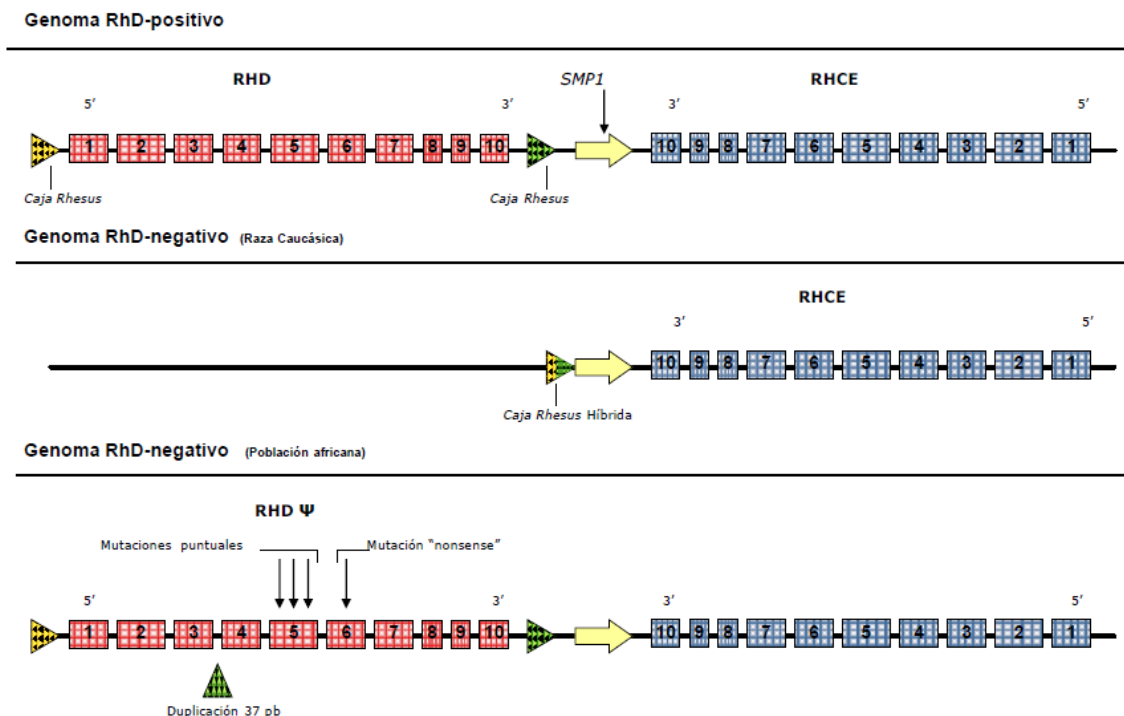
El sistema Rh es considerado uno de los más complejos, se han descrito un total de 50 antígenos y a nivel molecular un total de 170 alelos de tal manera que la estructura genómica es polimórfica. (Buelvas, Muñoz-Díaz, & León, 2014) Uno de los antígenos más importantes debido a su gran acción inmunogenica es el antígeno D, siendo capaz de

causar reacciones hemolíticas fatales por transfusiones o enfermedad hemolítica en el feto o recién nacido por isoimmunización. (Daniels & Bromilow, 2010).

2.1.2.1 Gen RHD

El gen RHD está formado por dos regiones de 9Kb y un 98,6% de homología que corresponde a la denominada “caja Rhesus”, la delección de esta caja da lugar al fenotipo RHD negativo, debido al entrecruzamiento desigual de esta caja por una mala alineación de los haplotipos. (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014) Los individuos que presentan el fenotipo RhD positivo pueden ser homocigotos o hemicigotos mientras que los que exhiben el fenotipo RhD negativo deben ser siempre homocigotos, sin embargo algunos individuos con fenotipo RhD negativo de ciertas regiones caucásicas mantienen secuencias propias del gen RHD dando lugar a discordancias entre fenotipo y genotipo dando lugar a la variante alélica RHD Ψ o pseudogen. (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014)

Grafico N°1. Organización Genómica del locus RH humano



Fuente: Eduardo Muñiz Díaz, 2014

Existen numerosas variantes para el antígeno D, muchas de estas causadas por mutaciones del gen RHD, y se han determinado dos: **D débil** que comprende todos los antígenos que se expresan débilmente, lo cual está asociado a una sustitución de aminoácidos en la membrana o el citosol; y los **D parciales** que se expresan de forma normal. Este antígeno puede generar anticuerpos de tipo IgG, IgM y raramente IgA. (Dean, 2005). (Roback, Grossman, Harris, & Hillyer, 2011)

Los antígenos D parciales suelen presentar entre 110.000 – 202.000 sitios por célula, mientras que un D débil presenta entre 10.000 – 30.000, por esta razón los especímenes con D parcial pueden ser detectados en una reacción con IgG anti-D y ser clasificados como RhD positivos, mientras que los D débiles deben ser sometidos a la prueba de antiglobulina. Otras variantes muestran expresión del antígeno D solo cuando se unen a la glicoproteína asociada a Rh. (Scott, 2004) (Roback, Grossman, Harris, & Hillyer, 2011)

Las personas con un fenotipo D débil pueden desarrollar anticuerpos anti-D llevando al paciente a un cuadro de Anemia Hemolítica Autoinmune, esto es dado por las diferencias de nucleótidos del alelo y aminoácidos afectados. Para identificar las variantes D deben utilizarse técnicas especializadas y no métodos serológicos. (Dean, 2005). (Roback, Grossman, Harris, & Hillyer, 2011).

2.1.2.2 Gen RHCE

Además del antígeno D, existe cuatro antígenos denominados C,c,E,e considerados de importancia clínica porque inducen la producción de aloanticuerpos capaces de producir reacciones hemolíticas, estos constituyen dos pares de antígenos C/c y E/e, relacionados estrechamente con el antígeno D. (Buelvas, Muñoz-Díaz, & León, 2014)

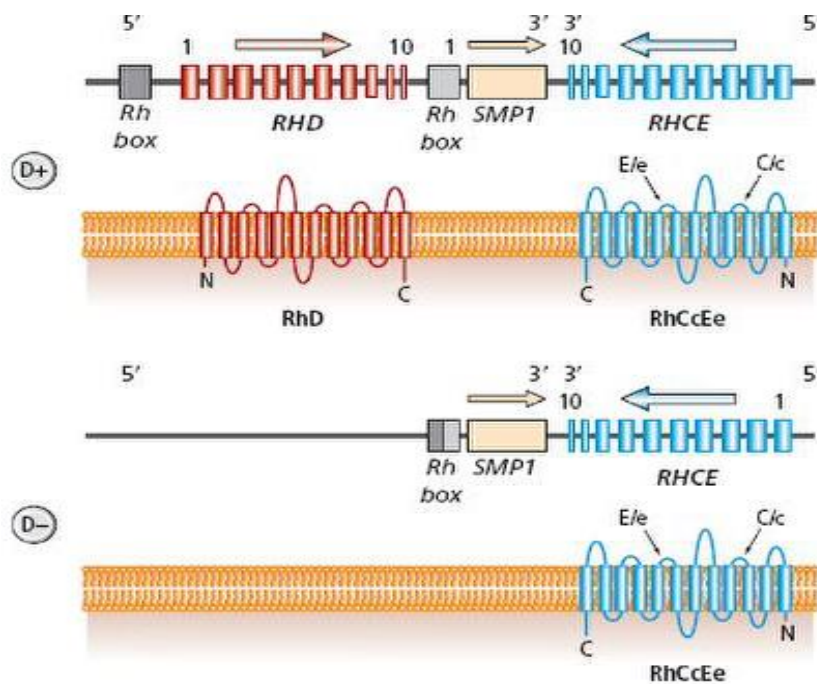
Se han descrito tres formas alélicas de este gen: RHce, RHcE, RHCE, la diferencia entre los alelos que codifican para el antígeno C del c(minus) son 6 nucleótidos (4 AAs), en cambio los alelos RHE y RHe se diferencian en un nucleótido. Los fenotipos Rh son producidos en pares por los haplotipos, el producto de estos genes puede ser de dos tipos, homocigotos (D,D; C,C; E,E) o heterocigotos (D,d, c,C; e,E). (Buelvas, Muñoz-Díaz, & León, 2014)

Cuando se combinan los genes mencionados se producen los fenotipos para los diferentes sujetos, generalmente para los Rh positivos CCDEE, CCDEe, CCDee, CcDEE, CcDEe,

CcDee, ccDEE, ccDEe y ccDee, y para Rh negativo CCdEE, CCdEe, CCdee, CcdEE, CcdEe, Ccdee, ccdEE, ccdEe y ccdee. (Baptista H. , 2005)

Los antígenos eritrocitarios Rh son proteínas que contienen alrededor de 417 aminoácidos, los cuales solo exhiben cadenas cortas en el exterior de la membrana del hematíe. Los mecanismos genéticos de este sistema se revelaron en 1943, cuando Fisher y Race propusieron la existencia de tres genes separados pero estrechamente ligados en haplotipos en el mismo cromosoma y heredados en grupos de tres. (Baptista H. , 2005). Los genes que controlan los fenotipos del sistema Rh, (RHD que codifican el D/d, RHCE que codifica C/c y E/e) contienen 10 exones y comparten alrededor del 94% de su secuencia con todos los intrones y exones. No es usual que estos genes se presenten homólogos debido a que se encuentran en orientación opuesta en el cromosoma; es decir, en la configuración de cola a cola (5'RHD3' - 3'RHCE5'), la cadena codificante de RHD puede convertirse en la hebra de RHCE no codificante, y viceversa. Figura N° 2. (Daniels & Bromilow, 2010)

Gráfico N° 2. Diagrama de representación de los 10 exones de los genes RHD y RHCE



Fuente: (Daniels & Bromilow, 2010)

2.1.2.3 Antígenos compuestos ce y CE.

La expresión de los antígenos “ce” ocurren cuando se encuentran en una misma proteína como Rhce o antígeno “f” presente en los individuos de fenotipo R_0/R_0 (Dce/Dce), no se expresan juntos cuando se localizan en proteínas separadas, por ejemplo en el fenotipo R_1/R_2 (DCe/DcE) (Buelvas, Muñoz-Díaz, & León, 2014). La presencia de antígenos “ce” en el 90% de individuos RhD negativos se debe a la delección del gen RHD que generalmente está acompañado del alelo RHCE.

Algunos individuos caucásicos poseen frecuencias propias del gen RHD que produce proteína RhD “truncadas” sin expresión en los eritrocitos, esto ocasiona que existan resultados discrepantes entre el fenotipo y genotipo uno de los más comunes es el pseudogen RHD o RHD Ψ presente en más del 66% de individuos de raza negra, los que exhiben en su genotipo un antígeno C o E (mayúsculas) (Buelvas, Muñoz-Díaz, & León, 2014)

El antígeno CE fue descrito luego de detectarse el anticuerpo anti-CE considerado como de formación natural, y su expresión se debe a que están localizados en la misma proteína como es el caso de individuos R_2/r_y (CDE/dCE) (Buelvas, Muñoz-Díaz, & León, 2014). Una de las indicaciones en transfusiones sanguíneas consiste en transfundir sangre Rh d negativa con fenotipo “r” (cde); y no debe ser utilizada sangre con fenotipo C o E, especialmente en mujeres en edad fértil y gestantes para evitar una aloinmunización innecesaria.

Otro aspecto a ser considerado en la expresión de los antígenos C o E en individuos tipificados como Rh d negativos, constituye la existencia de una variante del antígeno D denominada DEL, estos individuos expresan un mínima cantidad del antígeno D y son erróneamente tipificados como d negativos con fenotipo $r'(dCe)$ ó $r''(dcE)$ (Buelvas, Muñoz-Díaz, & León, 2014). Estos alelos “DEL” son productos de mutación puntual, cambio de sentido, delecciones o inserciones de nucleótidos; estos son comunes en la población asiática.

2.1.2.4 Terminología de los antígenos del sistema Rh

La terminología de los genes y proteínas del sistema Rh se relacionó con la teoría vigente en su tiempo sobre la herencia de este sistema. La nomenclatura de Fisher-Race denominó los antígenos por separado y los haplotipos resultantes se expresaban por la suma de tres letras CDE/cde; en cambio la de Weiner propuso una letra por cada haplotipo considerando las R mayúsculas para los que expresaban fenotipo RHD positivo y r minúscula para los RHD negativos, sumado a un número, letra o símbolo dependiendo de los fenotipos C,c,E,e; así por ejemplo CDE/cde = R^z /r; y por último Rosenfield construyó un lenguaje basado en numeración, los número positivos indican la presencia de un antígeno y la ausencia está determinado por el signo negativo (Buevas, Muñiz-Díaz, & León, 2014) En la actualidad se utiliza la nomenclatura de Fisher en escritura y la de Weiner en language oral.

Adicionalmente, la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea agregó la terminación numérica para los antígenos del Rh, basándose en la nomenclatura descrita por Rosenfield como se observa en la Tabla 1. (Del Peon, 2002)

Tabla N°1. Combinación de las diferentes terminologías del sistema Rh

Fisher/Race	Wiener Rh-Hr	Rosenfield/ISBT*
CDe	R ₁	RH 1, 2, 5
cde	r	RH 4, 5
DcE	R ₂	RH 1, 3, 4
cDe	R ₀	RH 3, 4
dcE	r ^o	RH 3, 4
Cde	r ^o	RH 2, 5
CDE	R _z	RH 1, 2, 3
CdE	r _y	RH 2, 3

**Propuesta numérica de la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea para los antígenos del sistema Rh (004)*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	17	18	19	20	21	22	23
D	C	E	c	e	f	Ce	C ^w	CX	V	E ^w	G	Hr ₀	Hr	hr ^s	VS	C ^s	CE	D ^w

Fuente: (Baptista H. , 2005)

Para identificar un genotipo a partir de la obtención serológica de fenotipos Rh, se debe determinar los antígenos posibles (C, c, D, E, e). Cuando es Rh negativo, se acepta que

es homocigoto para dd. Si no se identifica los fenotipos C y E se escribe como cc y ee y si no se encuentra c y e se registra CC y EE. Del mismo modo podemos obtener pares heterocigotos cuando obtenemos C y c entonces se anota C primero y segundo c (Cc), igualmente para E y e se registra Ee. No existe el antígeno d, la letra d significa la ausencia de D y se emplea para definir al fenotipo. (Baptista H. , 2005).

2.1.3 HERENCIA DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS

Los grupos sanguíneos son caracteres heredados y transmitidos de generación en generación, su estudio y detección ha sido un aporte en los estudios antropológicos. Los sistemas de grupos sanguíneos han sido considerados como polimórficos por presentar variantes alélicas (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014). Las investigaciones han demostrado que los sistemas Rh, ABO, MN son altamente polimórficos que otros sistemas como el KIDD, Duffy y Colton.

Se ha determinado que cada persona va a presentar dos alelos, uno heredado del padre y otro de la madre, así por ejemplo: en el caso del sistema KIDD los alelos JKA y JKB van a ser transmitidos ya se da forma homocigota o heterocigota dependiendo de las combinaciones que se produzcan; así si un individuo presenta fenotípicamente el antígeno Jk^a , existe la probabilidad de que heredo el alelo JKA de cada progenitor en doble dosis, caso contrario, si expresaría el fenotipo Jk^a y Jk^b se trataría de un individuo heterocigoto (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014).

Dentro de los patrones de herencia de los sistemas sanguíneos se encuentran el del “ligamiento total”, patrón característico del sistema RHD y RHCE, esto se debe a que estos antígenos son heredados como una unidad formando un haplotido, la distancia entre los loci es tan pequeña que no se recombinan independientemente. Sin embargo mediante estudios de genética molecular, se determinó que la expresión de los antígenos eritrocitarios puede ser modificado por los genes que codifican y producen proteínas diferentes; este proceso puede ocurrir por el denominado “efecto de posición”; efecto que ocasiona un cambio en la expresión de un determinado antígeno, ocasionado ya sea cuando los alelos se encuentran en posición “cis”=atracción, o se localizan, cada uno de ellos en cromosomas homólogos se consideran en posición “trans”= repulsión (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014). Este efecto ocurre con la expresión del antígeno D, cuando el haplotipo dCe se encuentra en posición trans en relación al que codifica para D, se produce una baja expresión de D dando como resultado un fenotipo D débil, por ejemplo cuando se produce cuando está presente el genotipo DcE/dCe ó Dce/dCe. En cambio, cuando se hereda el haplotipo dce o dcE en posición cis, la expresión de antígeno D es normal.

La expresión fenotípica del antígeno Ce se presenta cuando el gen C y e (minus) se encuentran en posición cis como en los genotipos dCe/dce o DCe/DcE, al encontrarse en posición trans no se produce este compuesto antigénico. Otro antígeno constituye el ce denominado también antígeno "f" el se forma cuando los antígenos c y e se encuentran en posición cis dando lugar a los genotipos dce/Dce y Dce, la particularidad de estos antígenos es producir la formación de anticuerpos potentes relacionados con la enfermedad hemolítica del recién nacido (Fung, 2014).

El grupo sanguíneo viene heredado de nuestros padres por dos alelos distintos de los genes RHD y RHCE. Una persona con antígeno D positivo puede tener un alelo RhD positivo y otro negativo o ambos positivos (Dd o DD). Una persona que presenta dd significa que no expresa el gen RHD. Los fenotipos RhCE (Cc, cc, Ee, ee) son heredados de la misma manera. (Baptista H. , 2005)

2.1.4 DESARROLLO INMUNOLÓGICO DE ANTI-RH-HR

Los anticuerpos relacionados con el sistema Rh son generalmente de clase IgG (IgG1 y/o IgG3) y la mayoría no fijan complemento. Como regla general el anti-D suele siempre estar acompañado del anti-C y en menor porcentaje del anti-e. (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014)

La presencia de anticuerpos anti-D generalmente ocurre cuando una persona ha sido inmunizada al recibir sangre de tipo RhD diferente, este puede ocurrir durante el embarazo, estos anticuerpos generalmente de tipo IgG pueden ser identificados en los bancos de sangre o laboratorios clínicos, mediante la prueba de anti globulina humana (Coombs) o por otros potenciadores con alto contenido de proteínas (albúmina) o baja fuerza iónica o polietilenglicol (PEG). Estas inmunoglobulinas reaccionan con mayor potencia cuando las células contienen células homocigotas. (Alcaraz, 2007) (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014)

Es demostrado que durante la gestación los anticuerpos que se producen de tipo anti-Rh son cuatro: IgM, IgG, IgA e IgD. En el primer trimestre del embarazo, los anticuerpos de tipo IgG atraviesan la placenta lentamente y en pequeñas cantidades, mientras que IgM no lo hace por su gran tamaño, pero esto solo es significativo cuando los anticuerpos anti-Rh se encuentran en altas concentraciones. La transferencia de anticuerpos debe comenzar entre 10 y 12 semanas de gestación donde la madre pasa sus anticuerpos al feto. (Lopez, 2000) (Roback, Grossman, Harris, & Hillyer, 2011)

Existen cuatro subclases de inmunoglobulinas G, la IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, las IgG2 e IgG4 no disminuyen el tiempo de vida eritrocitario debido a que la unión a los receptores FC de los macrófagos es baja o nula y no activan el sistema de complemento. (Swarz, 2006)

La IgG1 pasa a la circulación transplacentaria alrededor de la semana 18 de gestación aproximadamente, pero esta sigue teniendo poca acción hemolítica, pero cuando esta se acumula dentro de la placenta es cuando causa los casos más graves de enfermedad hemolítica. Mientras que la IgG3 inicia su traspaso a la semana 28 y a diferencia de las otras es la de más alto poder hemolítico. (Arévalo, 2009). Los anticuerpos anti-c y E también han sido considerados causantes de enfermedad hemolítica del recién nacido, siendo reconocido el anti-E como el más frecuente (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014)

Cuando una mujer embarazada tiene diferente fenotipo que el feto, puede padecer de una enfermedad hemolítica que ataca directamente al feto por el paso transplacentario de los anticuerpos maternos, a esto se le llama Enfermedad hemolítica del recién nacido. El anti-D es el más frecuente en esta enfermedad ya que se encuentra relacionado en la mitad de los casos, seguido del anti-E que como ya se mencionó antes ya se ha identificado en más o menos un tercio de la población. (Insunza, 2011) En contraste, los anticuerpos anti-e son muy raros porque son muy pocas las personas que carecen del antígeno "e", si se presentan son considerados como auto anticuerpos (Baptista H. , 2005).

Es considerado que a pesar de los avances tecnológicos en diagnóstico clínico la isoinmunización por fenotipos Rh es una causante importante de morbimortalidad neonatal, la forma más certera de evitar estas afecciones inmunológicas es la prevención. (Arias, 2008)

El identificar las variantes Rh en mujeres permite establecer su estado de sensibilización, se debe incluir siempre examen de Coombs indirecto en gestantes aunque el RhD sea positivo, ya que de esta manera podemos identificar otros anticuerpos irregulares. El correcto diagnóstico del estado de inmunización por Rh permite establecer las estrategias adecuadas para la prevención de la isoinmunización materno-fetal. (Muñoz, 2014)

2.1.5 SIGNIFICADO CLÍNICO DEL SISTEMA RH

La importancia del sistema Rh radica en que constituye uno de los grupos sanguíneos más polimórficos y complejos ubicados en la membrana eritrocitaria, este presenta antígenos que son extremadamente inmunogénicos. Este conjunto de antígenos desempeñan un rol importantísimo en la enfermedad hemolítica del recién nacido, reacciones pos transfusionales y probablemente anemias hemolíticas autoinmunes. (Domínguez A. , 2007)

Hace algunos años se estimaba que la enfermedad hemolítica del recién nacido era frecuente y grave, ya que influía considerablemente en la morbilidad perinatal. Sin embargo, había perdido importancia, debido a que en la actualidad solo uno por cada mil nacidos vivos puede presentar la patología, aunque se debe considerar que la migración e inmigración puede aumentar el número de casos. (Omeñaca, 2008)

La mayoría de los tipos de sangre están determinados por antígenos de células rojas que difieren en uno o dos aminoácidos, así el grupo sanguíneo del sistema Rh contiene el antígeno D que difiere de los antígenos C / C y E / E por 35 aminoácidos. Esta gran diferencia en aminoácidos es la razón por la cual los antígenos Rh son potentes en la estimulación de una respuesta inmune, es decir que ante la presencia de un antígeno diferente al que posee el receptor o la madre, se estimulará el desarrollo de una respuesta inmune y producción de anticuerpos de tipo IgG. (Westhoff, 2004)

La mayoría de los anticuerpos formados contra el antígeno Rh son del tipo IgG. Estos son capaces de causar hemólisis significativa por transfusiones y enfermedad hemolítica del recién nacido. Los anticuerpos Rh rara vez, o nunca, se unen al complemento, y por lo tanto, la destrucción de glóbulos rojos está mediado casi exclusivamente a través de los macrófagos en el bazo (hemólisis extravascular). Hay algunos ejemplos de aloanticuerpos Rh que se producen naturalmente y son del tipo IgM, pero son una minoría. (Dean, 2005)

2.1.6 ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO

Esta enfermedad consiste en una isoinmunización debido a que los eritrocitos fetales tienen un antígeno heredado del padre y que no lo posee la madre, estos acceden a la circulación materna, y son reconocidos como un cuerpo extraño generando la estimulación y producción de anticuerpos específicos. Estos anticuerpos de tipo IgG pasan la placenta y destruyen los hematíes, los cuales son hemolizados por macrófagos y linfocitos T y células Nk. La hemólisis conlleva a un cuadro de anemia, lo cual es característico de esta

enfermedad. (Omeñaca, 2008) Se conoce que una de las causas primarias de muerte fetal son las reacciones inmunes por isoimmunización al factor Rh. (Ovalle, 2005)

A pesar de que existe un tratamiento de profilaxis RhD para prevenir la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, aún hay incidencia de casos (Calomarde, 2012). La evaluación inmunohematológica es indispensable durante la gestación ya sea en RhD positivas como en RhD negativas, para determinar el riesgo de desarrollar la EHFRN. (Cortes & León, 2014). Así, en el año 2012, se reportó un caso de isoimmunización severa por anti-D en una mujer múltipara de 38 años de Marruecos, quien presentó siete muertes fetales anteriores por la misma causa, por lo tanto aún existe problemas de eritroblastosis fetal (Calomarde, 2012)

Existen estudios que demuestran que en 1,2% de los casos de aloimmunizaciones, un tercio de los casos son por anticuerpos capaces de producir enfermedad hemolítica materno-fetal, principalmente por anticuerpos contra antígenos D, E, c. La multiparidad y las múltiples transfusiones son los factores más predisponentes para que se presenten casos de isoimmunización eritrocitaria. (Fuenzalida, 2014). En el 2003 una mujer de 36 años sin antecedentes de transfusiones sanguíneas, y con multipartos, ambos padres con fenotipo RhD positivo, la madre desarrolló isoimmunización por anti-E debido a que su fenotipo era CCDee y el feto CcDEe (William, 2003), determinándose así incompatibilidad fuera del antígeno D.

En Costa Rica una mujer de 23 años de edad, presentó un cuadro de aborto incompleto por causas desconocidas, en la atención ambulatoria no se realizó tipificaciones de grupos sanguíneos ni de fenotipos Rh. Un Año después de lo sucedido en el 2007, la paciente se presenta nuevamente al hospital con el mismo cuadro clínico de sangrado transvaginal, y con 16 semanas de gestación, luego de realizar tipificaciones sanguíneas el laboratorio determinó que existía isoimmunización por el sistema Rh, durante la intervención del parto el neonato masculino tenía una hemoglobina de 10g y una bilirrubina indirecta de 14mg/dL. Diagnosticado como Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido. (Arias, 2008)

En la ciudad de Cuenca – Ecuador, se analizaron 24 casos clínicos de ictericia neonatal y se determinó que después de los grupos sanguíneos ABO y RhD, los antígenos C, c, E, y e, son los más inmunogénicos. El antígeno C se encuentra alrededor de un 68% en la población general, frente al 81% del antígeno c; mientras que el antígeno E tiene una

frecuencia del 27% y el e está cerca del al 98% causando un mayor riesgo de enfermedad hemolítica neonatal. (Tello & Pardo, 2012).

2.1.7 TÉCNICAS UTILIZADAS EN IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DEL SISTEMA RH

Existen metodologías para la detección de estos fenotipos, una de ellas es la determinación de los antígenos mediante aglutinación en gel, el cual consiste en el uso de tarjetas de gel que contienen una sustancia de poliacrilamida en perlas de silica, entre otros compuestos que brindan el aspecto de gel, estas tarjetas presentan en su contenido los anticuerpos que servirán como diagnóstico in vitro ya sean anti-D, anti-C, anti-c, anti-E o anti-e; (Golffed, 2014) la desventaja son los altos costos tanto de los reactivos como de los equipos que se requieren para obtener los resultados.

Otra técnica es la identificación manual en tubo que tiene la desventaja de estar basada en la apreciación del operador que observa si hay o no aglutinación del antígeno frente al anticuerpo, esta técnica utiliza células lavadas (eritrocitos al 3%) con la finalidad de eliminar partículas innecesarias y evitar interferentes o discrepancias; esto requiere de controles de calidad estrictos; también tenemos la técnica de aglutinación en micro placa la cual tiene los anticuerpos impregnados en los micropocillos, tiene una buena sensibilidad pero también se requiere el uso de equipos especiales para obtener resultados. (Valdes, 2001) (Roback, Grossman, Harris, & Hillyer, 2011)

Un estudio en el que comparan técnicas de Inmunohematología revela que para la identificación de isohemaglutininas es mejor utilizar el ensayo en tubo, pues con esta metodología lograron identificar 10 fenotipos CEce de 10, en cambio la técnica en gel detectó 9 fenotipos CEce de 10. La tipificación de RhD y ABO es igual para la técnica de aglutinación en tubo como la de gel, siempre y cuando se mantengan buenas prácticas de laboratorio. (Langston, 1999).

2.2 MARCO CONCEPTUAL

Antígeno eritrocitario: proteínas que están comprendidas por 417 aminoácidos, que extienden cadenas cortas sobre la superficie del eritrocito. (Arbelaez, 2009)

Alelo: polimorfismos alternativos de un gen en los sitios correspondientes de cromosomas homólogos y estos son los que determinan los caracteres en la herencia. (Arbelaez, 2009)

Aloantígenos: antígeno de la misma especie que se presenta en las formas alélicas codificadas en el mismo locus genético, en individuos diferentes de la misma especie. (Luna, 2005)

Aloinmunización: es la aparición de anticuerpos en un organismo que ha recibido un antígeno procedente de un individuo de la misma especie. (Cotorruelo, 2006)

Anticuerpo: inmunoglobulina producida por los linfocitos y que actúan en la respuesta inmune del individuo ante la estimulación inducida por un cuerpo extraño. (Arbelaez, 2009)

Anticuerpos anti-D: son más comunes en Rh negativas como respuesta a la estimulación del antígeno D, esto puede ocurrir por la incompatibilidad fetal o en transfusiones. (Baptista, 2005)

Anticuerpos anti- E: puro se presentan con más frecuencia que los demás debido a que este antígeno no está presente en todos los eritrocitos. (Baptista, El sistema Rh, una mirada a fondo, 2005)

Anticuerpos anti- C: son raros debido a que este antígeno casi siempre está presente en la mayoría de los eritrocitos. (Baptista, 2005)

Anticuerpos anti-c: son raros debido a que este antígeno casi siempre está presente en la mayoría de los eritrocitos, se presentan en personas D positivas. (Baptista, 2005)

Enfermedad hemolítica del recién nacido: cuadro en el cual los anticuerpos maternos cruzan la placenta y atacan a los eritrocitos fetales que presenten el antígeno en superficie. (Romero, 2007)

Fenotipo: característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento. (Navarrete, 2012)

Genotipo: genes heredados de cada uno de los progenitores y que se encuentran en los cromosomas. (Geifman-Holtzman, 2006)

Haplotipo: grupo de alelos de genes unidos, aportado por cada uno de los padres. (Arbelaez, 2009)

Hemólisis: destrucción del hematíe. Resulta de la reacción entre un anticuerpo hemolítico y el antígeno eritrocitario correspondiente, en presencia de complemento. (Luna, 2005)

Heterocigoto: situación en la cual los cromosomas homólogos poseen genes alélicos no idénticos. (Arbelaez, 2009)

Híbrido: descendiente de padres de cepas, variedades o especies diferentes.

Homocigoto: situación en la cual los cromosomas homólogos poseen genes alélicos idénticos. (Arbelaez, 2009)

Isoantígenos: antígeno que existe en formas alternativas y por tanto, induce una reacción inmunitaria cuando una forma se transfiere a miembros de la especie que carecen de los mismos. (Baptista, 2005)

Isohemaglutininas: Son los anticuerpos clase IgM que tienen afinidad hacia un grupo sanguíneo. (Animal., 2009)

Isoinmunización: producción materna de anticuerpos hacia un antígeno de membrana de los hematíes fetales, ausente en la madre (y por tanto de origen paterno), como respuesta a una sensibilización previa. (Calomarde, 2012)

Locus: localización o dirección donde se halla un gen en un cromosoma. (Bailey-Wilson, 1998)

Reactivo de anti-globulina Humana: compuesto que reacciona en forma específica con la globulina humana. (Navarrete, 2012)

Subgrupo Sanguíneo: Son las variantes de un grupo sanguíneo que se debe cambios de su estructura genética inicial. (Baptista H. , 2005)

Transfusión Sanguínea: Transfundir de un individuo a otro componentes sanguíneos. (Daniels & Bromilow, 2010)

CAPITULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1.1 Tipo de Estudio

Es un estudio descriptivo, de corte transversal que se buscó determinar la frecuencia de fenotipos Rh en un grupo característico de estudio, no hay modificación de factores ni intervención en los sujetos en estudio, las variables se miden una sola vez y la información obtenida se recogió durante los meses de Septiembre a Diciembre del año 2013.

3.1.1.2 Tipo de Muestreo

La población de estudio son el conjunto de parejas que acudieron a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir en Quito, durante los meses de Septiembre a Diciembre del 2013.

3.1.1.3 Tamaño de Muestra

Para el análisis del tamaño de la muestra se utilizó la siguiente formula:

$$n = \frac{Z^2 \alpha \times p \times q}{d^2}$$

Dónde:

n: tamaño de muestra

Z: nivel de confianza

p: proporción esperada

q: 1 – p

d: precisión del estudio 0,05 % (5%)

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,50 \times (1 - 0,50)}{0,05^2}$$

$$n = \frac{3,84 \times 0,50 \times 0,50}{0,0025}$$

Personas = 384 (192 parejas)

Se ha considerado un 50% de probabilidades de encontrar o no incompatibilidad de fenotipo Rh-Hr entre las parejas que acuden al centro y por la escasa información que existe en el país. Obteniéndose con un grado de confianza del 95% y un error alfa del 0,5 un total de las 384 personas es decir 192 parejas.

3.1.1.4 Criterios de Inclusión

Para la presente investigación se tomaron todas las muestras de sangre provenientes únicamente de parejas que acudieron a la unidad de fertilidad y esterilidad Clínica Concebir en Quito.

3.1.1.5 Criterios de Exclusión

No se aceptaron personas individuales es decir que no acudieron con su respectiva pareja en este estudio.

3.1.1.6 Control de Calidad

Los reactivos a usar fueron expuestos a pruebas de avidez, En la que se colocaron 2 gotas de eritrocitos al 3% en un tubo de ensayo de vidrio a 37°C y 2 gotas de reactivo, se mezclaron y agitaron, se anotó el tiempo de inicio de aglutinación; pruebas de Potencia, donde se depositó 2 gotas de cada dilución (1:2 hasta 1: 128) y 2 gotas de eritrocitos con fenotipos conocidos al 3% en un tubo de ensayo, se incubó a 37°C por 60 min y se anotó hasta qué dilución aglutinó; pruebas de Especificidad en donde se colocó 2 gotas de la suspensión junto con 2 gotas de cada reactivo, respectivamente y se incubó por 1 hora a 37°C, se centrifugó a 3.000 rpm por 15 segundos y se observó; y pruebas de Afinidad donde se añadió 2 gotas de la suspensión y 2 gotas de cada reactivo, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugó a 3.000 rpm por 15 segundos y se observó la aglutinación.

3.1.1.7 Análisis Estadístico

Se utilizó una estadística descriptiva analizada en SPSS V.20, pues el objetivo del estudio es la obtención, organización, presentación y descripción de información recopilada para ser publicada y difundida a nivel del sistema nacional de bancos de sangre y laboratorios anexos a clínicas de Fertilidad y Esterilidad.

Variable	Tipo de variable	Definición	Medición	Indicador	Técnica/instrumento
Fenotipo Rh	Cualitativa	Presencia o ausencia de Antígenos C, c, D, d, E, e.	Nominal	Positivo: Presencia de aglutinación. Negativo: ausencia de aglutinación Numero de padres con factor Rh negativo ó positivo/ Total de parejas analizadas.	Técnica de aglutinación en Tubo
Factor Rh vs. Antígenos c y e.	Cualitativa	Asociación que presenta el tener Rh positivo con los fenotipos c y e	Nominal	Porcentaje de fenotipos c, e en hombres Rh positivos/ Total de padres Rh positivos analizados.	Registro de datos
Factor Rh vs. Antígenos C y E.	Cualitativa	Asociación que se presenta al tener Rh negativo con los fenotipos C y E	Nominal	Porcentaje de fenotipos C, E en hombres Rh negativos/ Total de padres Rh negativos analizados.	Registro de datos
Fenotipo Rh-Hr Heredado	Cualitativa	Presencia o ausencia de riesgo que se presenta al encontrar incompatibilidad antigénica en cada pareja.	Nominal	Total de fenotipos incompatibles entre las parejas analizadas.	Registro de datos

TABLA 2: Operacionalización de las Variables

Variable Dependiente: frecuencia de fenotipos Rh-Hr.

Variables Independientes: parejas que acuden a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica CONCEBIR.

3.2 MATERIALES Y PROCESOS

3.2.1 Materiales

- Torniquete
- Cápsula Vacutainer
- Agujas Vacutainer 21G o 22G
- Tubos Vacuette con K2 EDTA 5ml.
- Torundas de Alcohol (Swap)
- Curitas Ban Dai
- Serófuga clínica CLAY ADAMS 2000 SERIES para tubos de ensayo de 5ml.
- Pipetas automáticas SUMEDIX de p100 (10-100uL), p1000 (100-1000ul) de volumen variable.
- Tubos de vidrio.
- Gradilla para tubos.
- Marcador.
- Guantes de látex.
- Puntas de pipeta automática descartables.
- Incubadora LW SCIENTIFIC de 37°C.
- Pizeta

3.2.2 Reactivos

- Antisuero anti-C monoclonal BIORAD.
- Antisuero anti-c monoclonal BIORAD.
- Antisuero anti-D monoclonal BIORAD.
- Antisuero anti-E monoclonal BIORAD
- Antisuero anti-e monoclonal BIORAD
- Antisuero anti-A monoclonal BIORAD
- Antisuero anti- B monoclonal BIORAD
- Reactivo de COOMBS BIORAD
- Glóbulos rojos en solución salina 3 - 5%.
- Solución salina 0.9 %.

3.2.3 Procesos

Se seguirán los protocolos establecidos para el proyecto tomados del manual técnico AABB (2000)

1. Enumerar los tubos: código # de cada tubo de sangre además coloque las siglas: A, B, AB, D; C; c; E; e.
2. Preparar una suspensión de eritrocitos del 3-5% en solución salina 0.9%
3. Colocar 50uL de cada reactivo en cada uno de los tubos.
4. Colocar 50uL de suspensión de eritrocitos en cada tubo
5. Agitar suavemente
6. Centrifugar 15 seg a 3000 rpm.
7. Agitar suavemente el tubo y re-suspenda el botón celular. Examine las reacciones resultantes macroscópicamente.

Para Las muestras con resultados Rh (Negativo)

8. Los tubos serán incubados durante 15 minutos a 37°C.
9. Luego de la incubación las células se lavarán tres veces en solución salina 0.9% por 1 minuto.
10. Luego de decantar totalmente la solución salina 0.9%
11. Una gota de Coombs
12. Centrifugar por 15 seg y leer.

3.2.3.1 Toma de muestra

Punción Venosa, Sangre total con K2 EDTA, Suspensión de eritrocitos lavados de cada paciente. A todas las parejas se solicitará previo a la toma el consentimiento informado. (Anexo 2)

3.2.4 Control de Calidad

3.2.4.1 Prueba de Avidez

1. Identificar la placa portaobjetos.
2. Colocar 2 gotas de sangre total con EDTA y 2 gotas del reactivo a 37°C.
3. Cronometrar desde el momento que se añade el reactivo.
4. Observar el inicio de la aglutinación con la ayuda de la lámpara de lectura y anotar el tiempo.

3.2.4.2 Prueba de Afinidad

1. Identificar los tubos.
2. Preparar una suspensión de glóbulos rojos lavados al 3%.
3. Colocar 2 gotas de la suspensión y 2 gotas de cada reactivo.
4. Incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 3.000 rpm por 15 segundos.
6. Observar la aglutinación con la ayuda de la lámpara de lectura y anotar por cruces (+) la mayor aglutinación que llega a formarse.

3.2.4.3 Prueba de Potencia

1. Identificar los tubos.
2. Preparar un suspensión de glóbulos rojos lavados al 3%
3. Preparar dilución con solución salina de cada reactivo individualmente desde 1:2 hasta 1:16
4. Incubar por 1 hora a 37°C.
5. Centrifugar a 3.000 rpm por 15 segundos.
6. Observar la aglutinación con la ayuda de la lámpara de lectura y anotar la mayor dilución a la que llega cada reactivo en su aglutinación.

3.2.4.4 Prueba de Especificidad

1. Identificar los tubos.
2. Preparar un suspensión de glóbulos rojos lavados al 3%
3. Colocar 2 gotas de la suspensión junto con 2 gotas de cada reactivo, respectivamente.
4. Incubar por 1 horas a 37°C.
5. Centrifugar a 3.000 rpm por 15 segundos.
6. Observar aglutinación en este caso, todos son específicos para el antígeno que se muestra en el reactivo.

3.2.4.5 Reactivo Anti-D

Se evaluó la avidéz, afinidad, especificidad y potencia de este reactivo utilizando células comerciales BioRad Set DiaPanel Lote 16211.45x-16311 Células R1R1 014314 (CDE/CDE) siguiendo el protocolo de la Dra Elena Franco (Franco, 2003). (Anexo 2)

3.2.4.6 Reactivo Anti-E

Se evaluó la avidéz, afinidad, especificidad y potencia de este reactivo utilizando células comerciales BioRad Set DiaPanel Lote 16211.45x-16311 Células R1R1 014314 (CDE/CDE) siguiendo el protocolo de la Dra Elena Franco (Franco, 2003). (Anexo 2)

3.2.4.7 Reactivo Anti-e

Se evaluó la avidéz, afinidad, especificidad y potencia de este reactivo utilizando células comerciales BioRad Set DiaPanel Lote 16211.45x-16311 Células r/r 127153 (Cde/cde) Siguiendo el protocolo de la Dra Elena Franco (Franco, 2003). (Anexo 2)

3.2.4.8 Reactivo Anti-C

Se evaluó la avidéz, afinidad, especificidad y potencia de este reactivo utilizando células comerciales BioRad Set DiaPanel Lote 16211.45x-16311 Células R1R1 014314 (CDE/CDE) siguiendo el protocolo de la Dra Elena Franco (Franco, 2003). (Anexo 2)

3.2.4.9 Reactivo Anti-c

Se evaluó la avidéz, afinidad, especificidad y potencia de este reactivo utilizando células comerciales BioRad Set DiaPanel Lote 16211.45x-16311 Células r/r 047504 (cde/cde) siguiendo el protocolo de la Dra Elena Franco (Franco, 2003). (Anexo 2)

3.3 Análisis de la probabilidad de inmunización en las parejas analizadas.

Para establecer la probabilidad de isoimmunización se utilizó la teoría de que el sistema Rh posee dos genes que controlan los fenotipos del sistema Rh (RHD que codifica el antígeno D y RHCE que codifica a los antígenos C/c y E/e) (Baptista H. , 2005).

Basados en esta teoría un cruce de fenotipos Rh de cada pareja individualmente, produce una probabilidad de poseer un genotipo homocigoto para un determinado alelo o heterocigoto y ser transmitido a la descendencia (Baptista H. , 2005).

La nomenclatura utilizada siguiendo esta teoría se realizó con el siguiente razonamiento: si una persona es Rh negativo se considera que es homocigoto por ser un carácter recesivo para el antígeno D y su identificación escrita es "dd", no así una persona considerada RH(D) positiva ya que está puede ser genotípicamente homocigota DD o heterocigota Dd (Baptista H. , 2005) (Buevas, Muñiz-Díaz, & León, 2014).

En el caso de los antígenos C,E, cuando existe una ausencia fenotípica de C, se anota c(minus) en cada cromosoma (c/c) asumiendo que es homocigoto, y si fenotípicamente reacciona con los anticuerpos comerciales correspondientes anti-C, anti-c, se le determina como poseedor de los antígenos C y c (minus), es decir heterocigoto, lo mismo se realizó en caso del antígeno E, hay que recordar que los antígenos CE/ce son codominantes, es decir que se expresan en los eritrocitos (Buevas, Muñiz-Díaz, & León, 2014).

Para escribir su nomenclatura se coloca C en el primero cromosoma y c (minus) en el segundo (C/c); para determinar la presencia del antígeno E y e (minus) se sigue el mismo proceso que en los antígenos C y c (minus). (Baptista H. , 2005).

De acuerdo a las leyes de Mendel se establece que si la madre es homocigota para un determinado gen y el padre es heterocigoto la probabilidad de que el niño herede los antígenos del progenitor es un 50%, caso contrario si el padre es homocigoto para un caracter diferente y la madre heterocigota, existe la probabilidad de que el feto exprese ese antígeno en un 100%, por lo tanto la madre podría desarrollar anticuerpos frente a un antígeno desconocido (Baptista H. , 2005).

La siguiente tabla indica la posibilidad la probabilidad del genotipo y la probable cigocidad.(Tabla N°2)

Tabla N°3: Posibles genotipos y cigocidad de acuerdo a la identificación fenotípica

<i>FENOTIPO</i>	<i>GENOTIPO</i>	<i>CIGOCIDAD PROBABLE</i>
CcDee	Cde/cde	Heterocigoto
	cDe/Cde	Homocigoto
	cDe/Cde	Heterocigoto
CCDEE	CDe/CDe	Homocigoto
	CDe/Cde	Heterocigoto
CCDEe	CDe/cDE	Homocigoto
	CDe/cdE	Heterocigoto
	cDE/Cde	Heterocigoto
	CDE/cde	Heterocigoto
	CDE/cDe	Homocigoto
	cDe/CdE	Heterocigoto
ccDEE	cDE/cDE	Homocigoto
	cDE/cdE	Heterocigoto
ccDee	cDe/cde	Heterocigoto
	cDe/cDe	Homocigoto
CcDEE	CDE/CDe	Homocigoto
	CDE/Cde	Heterocigoto
	cDE/CdE	Heterocigoto
CCDEe	CDE/CDe	Homocigoto
	CDE/Cde	Heterocigoto
	CDe/CdE	Heterocigoto
CCDEE	CDE/CDE	Homocigoto
	CDE/CdE	Heterocigoto

(Baptista H. , 2005)

Siendo el factor Rh(D/d) altamente polimórfico existen otras combinaciones de los antígenos relacionadas con la herencia por “ligamiento total” que ocurre debido a la distancia que existe entre los loci, bajo este criterio puede obtenerse la expresión fenotípica ce debido al “efecto de posición”, es decir que estos antígenos mantiene una posición “cis”; los que se encuentran en posición “trans” o de repulsión se heredan por separado como en el fenotipo cE ó Ce (Buelvas, Muñiz-Díaz, & León, 2014).

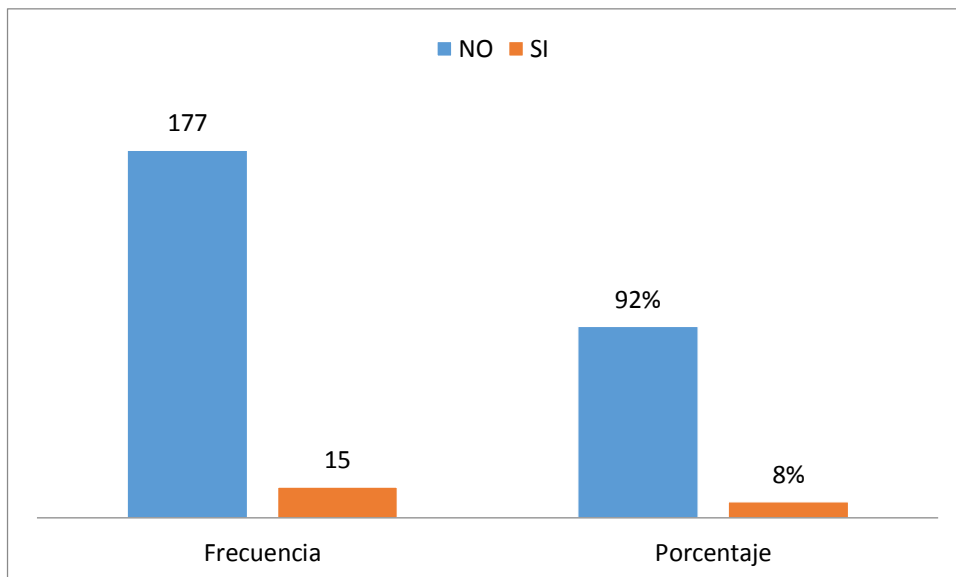
CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Población de Estudio. Se analizó un total de 192 parejas que aceptaron participar en el estudio, y firmaron el consentimiento informado aprobado por el departamento de docencia de la clínica. De las encuestas estructuradas se determinó que 177 mujeres no tenían hijos constituyendo el 92,19% y únicamente el 7,81% tenían un niño presentando todos problemas de concepción. (Gráfico N 4.1)

Únicamente 20 mujeres recibieron transfusiones sanguíneas, ninguna ha tenido trasplante de órganos.

Gráfico N°4.1: Frecuencia de mujeres que no tienen hijos vs multiparas

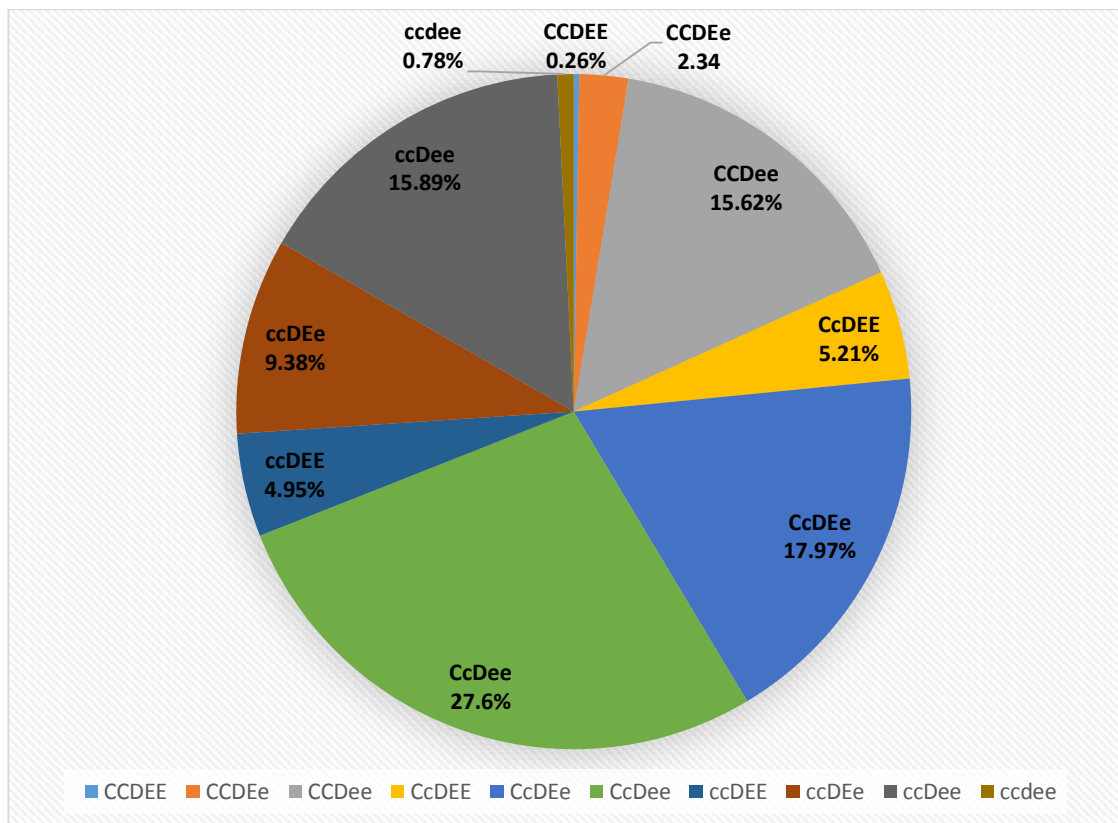


El gráfico 4.1 **Fuente:** Base de datos del autor.

El gráfico muestra la distribución porcentual de mujeres múltiparas frente a las que no han concebido.

4.1.2 Distribución de los fenotipos del Sistema Rh. Se estableció que el 27.6% de los fenotipos identificados corresponde al CcDee, el 17.97% a CcDEE, el 15.89% a ccDee, el 15.62% a CCDee, 9.38% a ccDEE, 5,21% a CcDEE, 4.95% a ccDEE, 2,34 % a CCDEe, 0.78% a ccdee y CCDEE 0.26%. (Gráfico N°4.2)

Gráfico N° 4.2: Frecuencia de fenotipos del sistema Rh del total de parejas que intervinieron en el estudio.



El grafico 4.2 **Fuente:** Base de datos del autor.

El gráfico muestra la distribución de los fenotipos entre las parejas estudiadas siendo el Cde/cDe el de mayor frecuencia.

4.1.3 Frecuencia de Fenotipos de acuerdo al género. Del análisis realizado se encontró que el grupo dominante en mujeres fue el CcDEe con un 28.12% en comparación al masculino que tiene 7.8%, Mientras que en el sexo masculino domino el fenotipo CcDee con 34.89% frente a 20.31% del sexo opuesto. (Gráfico N°4.3).

Gráfico N°4.3: Total de fenotipos detectados en relación al género

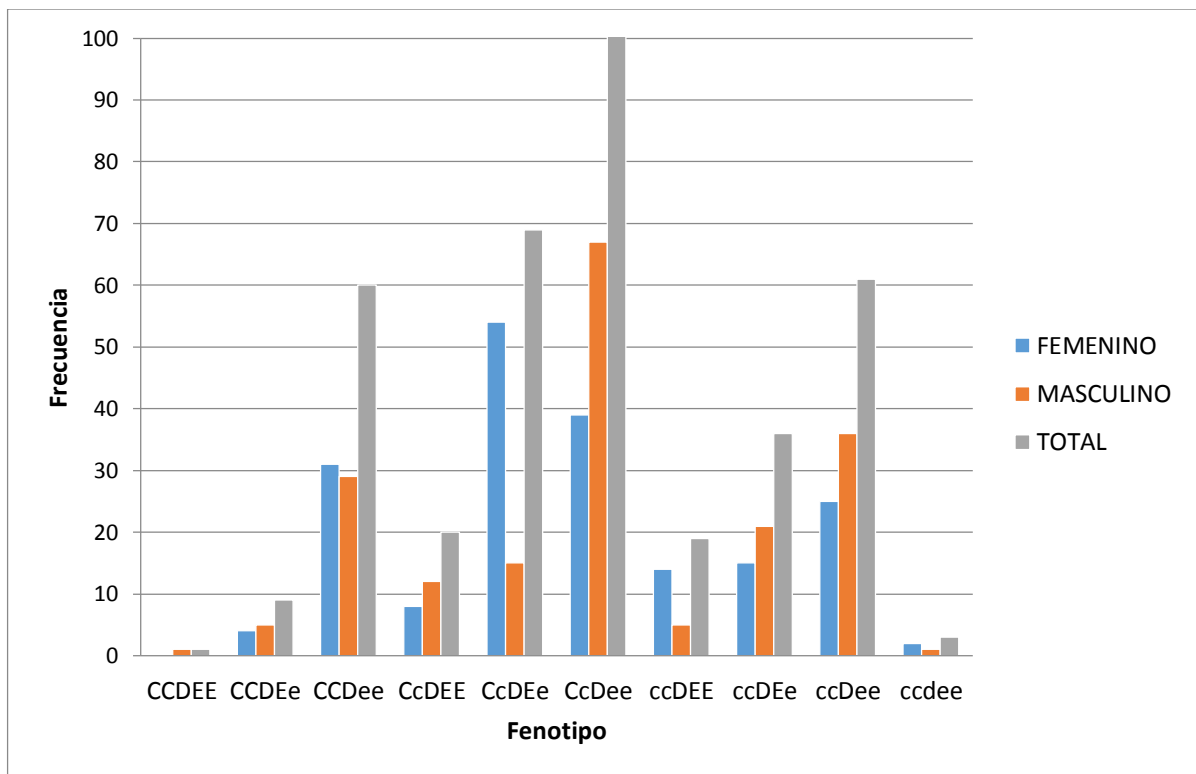


Gráfico 4.3 muestra la distribución de los fenotipos identificándose el CcDee como el de mayor frecuencia especialmente en el género masculino, mientras que para el sexo femenino el más común fue el fenotipo CcDEe. **Fuente:** Base de datos del autor

4.1.4 Fenotipos del Rh de acuerdo al grupo sanguíneo ABO.

Los datos demuestran que el fenotipo CcDee se encuentra en mayor frecuencia distribuido en todos los grupos sanguíneos, para el grupo sanguíneo O con un total de 273 personas, el CcDee se encuentra en un 28.20%, seguido de CcDEE con 17.22%, CCDee 16.48%, el resto en menor porcentaje. Para el grupo sanguíneo A con un total de 72 personas, el CcDee se encuentra en un 26.38%, seguido de CcDEE con 23.61%, CCDee y ccDee 15.27%, el resto en menor porcentaje. El grupo sanguíneo B con un total de 32 personas, el CcDee y ccDee se encuentran en un 25%, seguido de CcDEE con 15.62%, ccDEE con 12.5%, el resto en menor porcentaje. Y por último grupo sanguíneo AB con un total de 7 personas, el CcDee y el ccDEE fueron los predominantes con un 28.57%. (Tabla N°4.7)

Tabla N° 4.1 Total de Fenotipos y posibles genotipos del sistema Rh clasificados de acuerdo al grupo sanguíneo.

Fenotipos del Sistema Rh

GRUPOS SANGUÍNEOS	CCDEE	CCDEe	CCDee	CcDEE	CcDEe	CcDee	ccDEE	ccDEe	ccDee	ccde e
A	1	0	11	5	17	19	4	3	11	1
AB	0	0	1	1	0	2	0	2	1	0
B	0	0	3	1	5	8	3	4	8	0
O	0	9	45	13	47	77	12	27	41	2
TOTAL	1	9	60	20	69	106	19	36	61	3

La frecuencia de fenotipos Rh de acuerdo al tipo sanguíneo, donde podemos observar que el Fenotipo CcDee es el más frecuente con 106 casos, seguido del CcDEE con 69 y CCDee con 60.

Fuente: Base de datos del autor

4.1.5 Frecuencia de antígeno c y e en personas con factor RHD positivo. Se determinó que existe la presencia de los antígenos c y e en un 89,50% y 81,62% respectivamente en personas con fenotipo RH D positivo (Tabla N°4.2).

Tabla N° 4.2 Presencia de antígeno c y e en personas con factor RHD positivo.

FENOTIPO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
c	341	89.50
e	311	81.62

La tabla muestra la frecuencia de la presencia de los antígenos c y e minúscula en parejas incluidas en el estudio.

Fuente: Base de datos del autor

4.1.6 Frecuencia del antígeno C y E en personas con factor RHD negativo: Se determinó ausencia de los antígenos C y E respectivamente en personas con fenotipo RH D negativos (Tabla N°4.3).

Tabla N° 4.3 Presencia de antígenos C y E en personas con factor RhD negativo.

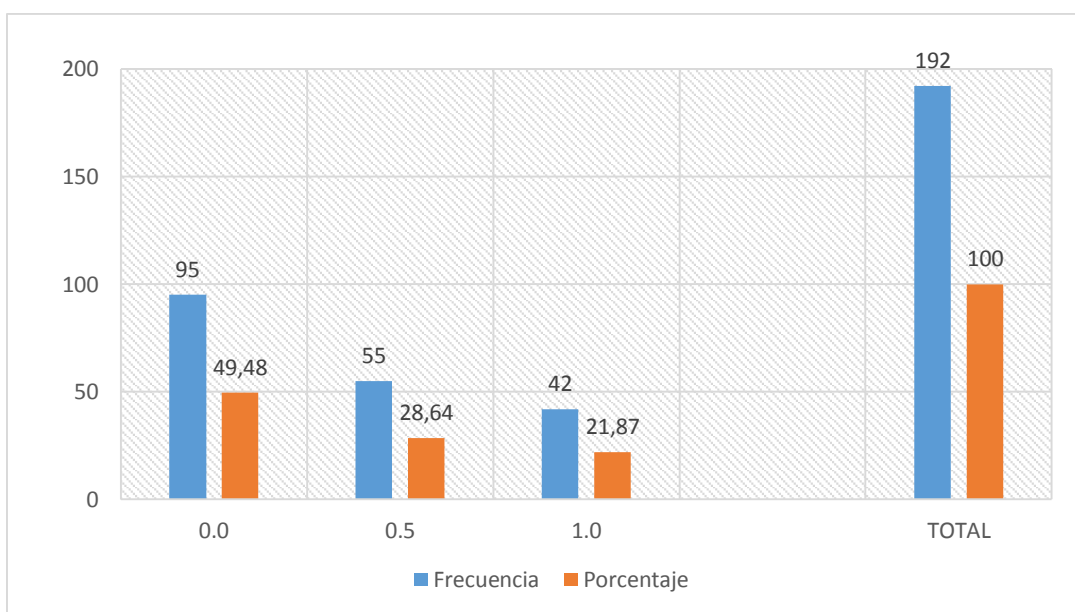
	Frecuencia	Porcentaje
C	0	0
c	3	100
E	0	0
e	3	100
Total	3	100

Se obtuvo un 0.78% de RhD negativos, equivalente a 3 personas de un total de 384, de los cuales solo se pudo encontrar el fenotipo ccdee.

Fuente: Base de datos del autor

4.1.7 Probabilidad de Isoinmunización materno-fetal: El análisis comparativo de los fenotipos expresados y sus posibles genotipos entre parejas se detectó que existen 42 parejas que presentan un riesgo del 100% de probabilidad de sufrir problemas de incompatibilidad, 55 parejas tienen un riesgo del 50% y 95 parejas no presentan riesgo debido a que la madre tiene todos los antígenos del sistema Rh, de acuerdo a las leyes de herencia de Mendel (Gráfico N° 4.4) (Tabla N°4.4)

Gráfico N° 4.4: Probabilidad de Isoinmunización materno-fetal



El 49,48% de las mujeres analizadas no corren ningún riesgo de isoimmunización materno-fetal frente al fenotipo de su pareja, sin embargo el 28,64% tienen un 50% de probabilidad, el 21,87 tienen un 100% de probabilidad de presentar isoimmunización. Fuente: Base de datos del autor

Tabla 4.4 Probabilidad de isoimmunización de acuerdo a los genotipos que pueda heredar la descendencia

Genotipos con probabilidad del 0% de inmunización	Posible antígeno causal	Genotipos con probabilidad del 50% de inmunización	Posible antígeno causal	Genotipos con probabilidad del 100% de inmunización	Posible antígeno causal
Madre: CcDEe R ² /R ⁰	N	Madre: CCDee R ¹ /R ¹	c	Madre: CCDee R ¹ /R ¹	C
Padre: CCDee R ¹ /R ¹		Padre: CcDee R ¹ /R ⁰		Padre: ccDEE R ² /R ²	E
Madre: CcDEe R ² /R ⁰	N	Madre: ccDEe R ² /R ⁰	C	Madre: ccDEE R ² /R ²	C
Padre: ccDee R ⁰ /R ⁰		Padre: CcDee R ¹ /R ⁰		Padre: CCDee R ¹ /R ¹	e
Madre: ccDEe R ² /R ⁰	N	Madre: ccDee R ⁰ /R ⁰	C	Madre: ccDee R ⁰ /R ⁰	C
Padre: ccDEe R ² /R ⁰		Padre: CcDee R ¹ /R ⁰		Padre: CCDEe R ² /R ¹	E
Comparten los antígenos CDE.		No comparten todos los antígenos solo en un 50%.		No comparten los antígenos RHCE	

Fuente: base de datos del autor

4.1.8 Frecuencia de los posibles antígenos que ocasionen isoimmunización materno-fetal. Aplicando el análisis de acuerdo a la presencia o ausencia de los antígenos en los posibles genotipos y siguiendo las leyes de la herencia relacionadas con el “ligamiento total” y las posibles modificaciones por defecto de posición de los alelos se determinó el posible antígeno causante de una incompatibilidad en la madre (Tabla N°4.5).

El análisis de la frecuencia de los antígenos DCE/dce permitió encontrar el porcentaje de probabilidad de una posible inmunización por presentar ciertos antígenos del sistema Rh, sean estos compuestos o solos, así los antígenos compuestos CE presentan una probabilidad del 10,3%; el Ce del 6,2%, siendo mayor en los antígenos C y E con un porcentaje del 24,7 la presencia de los antígeno c y E indican la predisposición a desarrollar un problema de aloimmunización. (Tabla N°4.6).

Tabla N°4.5 Cruces realizados para determinar los posibles antígenos causantes de isoimmunización.

Madre: CCDee R ¹ /R ¹	Hijo 1 R ¹ /R ¹	Ce/Ce	Madre: CCDee R ¹ /R ¹	Hijo 1 R ¹ /R ²	Ce/cE
Padre: CcDee R ¹ /R ⁰	Hijo 2 R ¹ /R ⁰	Ce/ce	Padre: ccDEE R ² /R ²	Hijo2 R ² /R ¹	cE/Ce
Madre: ccDEe R ² /R ⁰	Hijo 1 R ² /R ¹	cE/Ce	Madre: ccDEE R ² /R ²	Hijo 1 R ² /R ¹	cE/Ce
Padre: CcDee R ¹ /R ⁰	Hijo 2 R ¹ /R ⁰	Ce/ce	Padre: CCDee R ¹ /R ¹	Hijo 2 R ¹ /R ²	Ce/cE
Madre: ccDee R ⁰ /R ⁰	Hijo 1 R ⁰ /R ¹	ce/Ce	Madre: ccDee R ⁰ /R ⁰	Hijo 1 R ⁰ /R ²	ce/CE
+Padre: CcDee R ¹ /R ⁰	Hijo 2 R ⁰ /R ⁰	ce/ce	Padre: CCDEe R ² /R ¹	Hijo 2 R ⁰ /R ¹	ce/CE
Madre: CcDEE R ² /R ¹	Hijo 1 R ² /R ¹	CE/Ce	Madre: ccDee R ⁰ /R ⁰	Hijo 1 R ⁰ /R ²	ce/CE
Padre: CcDee R ¹ /R ⁰	Hijo 2 R ² /R ⁰	CE/ce	Padre: CcDEE R ² /R ²	Hijo 2 R ⁰ /R ²	ce/CE

Fuente: base de datos del autor

Tabla N° 4.6 Posibles antígenos causantes de incompatibilidad

ANTÍGENO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
C	24	24,74
CE	10	10,30
Ce	6	6,20
E	24	24,74
c	18	18,56
cE	8	8,25
e	7	7,21
TOTAL	97	100

Frecuencia de posibles Antígenos causales de Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido, analizados mediante mecanismos de herencia basados en Genética Mendeliana

Fuente: Base de datos del autor

4.2 DISCUSIÓN

Es importante que las pruebas utilizadas en la tipificación sanguínea, sea de gran apoyo para la detección y prevención de inmunizaciones, ya sea por embarazos o transfusiones; (Navarrete, 2012). La importancia a largo plazo de esta disertación, es reducir los incidentes de isoimmunizaciones por el sistema Rh, y no será fácil ya que estos exámenes no se realizan de forma rutinaria en todos los laboratorios clínicos del país.

La presencia de aloimmunización tiene una mayor probabilidad en mujeres multíparas o que han recibido transfusiones incompatibles, en este estudio el 92,19% de mujeres no han tenido aún embarazos, la mayoría de estudios realizados y en los que se descubrió la presencia de enfermedad hemolítica del recién nacido por los fenotipos del sistema Rh fueron mujeres con embarazos anteriores (Arias, 2008) (Bonilla, 2011) (Calomarde, 2012) (Yoshida, 2011).

El estudio realizado en Argentina menciona que el fenotipo Rh de mayor frecuencia es CcDEe (23,3%), CCDee (23,1%) y CcDee (21,86%) en un total de 3.214 muestras analizadas (Domínguez & Ridolfi, 2007); mientras que este estudio con un total de 384 muestras los fenotipos Rh CcDee es el de mayor frecuencia (27.6%), seguido del fenotipo CcDEe (17.97%), ccDee (15.89%) y CCDee (15.62%).

En Colombia se encontró que los fenotipos CcDee, CcDEe y CCDee están en frecuencias mayores al 20% identificando que los fenotipos heterocigotos Cc estaban en un 50% de los análisis, seguido de cc con un 28% y CC con 22%; el fenotipo ee homocigoto en un 58%, el Ee en un 36% y el EE en un 6%. (Díaz, 1995) Los hallazgos de este estudio revelan que la población analizada presentó un 51% para Cc, 31% en cc y 18% para CC; mientras que ee se presentó en un 61% de los análisis, Ee 29% y EE 10%, aparentemente similares a los datos colombianos.

Identificar el fenotipo Rh en parejas, nos permite seleccionar de manera adecuada, los derivados sanguíneos para una transfusión sanguínea o un tratamiento por isoimmunización materno fetal; en este estudio se determinó que el fenotipo CcDee es el de mayor frecuencia (27.6%), seguido del fenotipo CcDEe (17.97%), ccDee (15.89%) y CCDee (15.62%) y para el RhD negativo el de mayor incidencia fue ccdee con 0.78%. Un estudio realizado en México revela que la frecuencia de fenotipos Rh fue de 31.69% para CCDee, 28.03% CcDEe, y 10.51% para CcDee. Obteniéndose un 0.78% de Rh (d) negativos, equivalente a 3 personas de un total de 384, de los cuales solo se pudo encontrar el fenotipo ccdee. En México se encontró que el fenotipo ccdee representaba un 2.64% (Alcaraz, 2007); mientras que un estudio hecho en Costa Rica analizó un total

de 251 donantes con fenotipo Rh(d) negativo y su frecuencia para el fenotipo ccdee fue de 92.43%. (Navarrete, 2012), en este estudio la presencia de fenotipo Rh(d) negativo fue una de las limitantes debido a que las parejas que aceptaron participar pertenecían al fenotipo Rh(D) positivo.

Para la variable género se determinó el fenotipo dominante en mujeres fue el CcDEe con un 28.12% en comparación al masculino que tiene 7.8%; mientras que para el género masculino el fenotipo CcDee con 34.89% fue el de mayor prevalencia frente al 20.31% del sexo opuesto. Un estudio realizado en Bolivia a un total de 1200 personas obtuvieron que para la variante sexo, en la mujer también existía una mayor prevalencia del fenotipo CcDEe con un 34,49% frente a un 31,93% del hombre; mientras que el hombre fue predominante en CcDee con un 14,47% frente al 12,86% de la mujer. (Calderón, 2006), datos similares entre estas dos poblaciones.

El análisis de la frecuencia de fenotipos del sistema Rh de acuerdo al grupo sanguíneo, reveló que en el grupo O el fenotipo más común es el CcDee 28,20%, seguido del CcDEe 17,22% y el CCDee 16,48%; en el grupo sanguíneo A el fenotipo más frecuente fue el CcDEe 26,38%, seguido del CcDee 23,61%, ccDee 15,27% y ccDEe 12,5%, en el grupo B los fenotipos más frecuentes son CcDee 28% y CcDEe 15,62; para la variante AB los fenotipos CcDee y ccDEe fueron los de mayor frecuencia con un 28,57%. Diferente al estudio realizado en Bolivia en el 2006, en el que el grupo sanguíneo O presento en mayor frecuencia el fenotipo CcDEe con un 34,68%, seguido de ccDEE con un 18,38%, CCDee con 17,07% y CcDee con un 12,25%. Para la el grupo sanguíneo A presento un porcentaje de CcDEe de un 28,43%, ccDEe con 18,48%, CcDee con 17,06%, y CCDee con un 13,27%; para el Grupo B el fenotipo predominante siguió siendo el CcDEe con un 29,58%, seguido de CcDee y CCDee con un 16,90% y para el AB el predominante fue el CcDee con un 75% de los casos. (Calderón, 2006)

No se puede establecer si existe o no una relación entre los antígenos C y E en los RhD negativos debido a que en este estudio únicamente se encontró el 0,78% de factor Rh negativos y únicamente se detectó el fenotipo ccdee, sin embargo un estudio realizado en Costa Rica en el 2012 concluye que el fenotipo ccdee corresponde a un 92,4% del total de la muestra obtenida donde la investigación se hizo en 251 RhD negativos. (Navarrete, 2012)

Los porcentajes de los antígenos c y e en RhD positivo fueron del 81,52% y 89,62% respectivamente mostrando una alta frecuencia de estos fenotipos en el factor RhD positivo, mientras que los menos frecuentes fueron C con un hallazgo de 67% y E con 36%

del total. Un artículo de revisión científica en Cuenca - Ecuador menciona que el antígeno C se encuentra alrededor de un 68% en la población general, frente al 81% del antígeno c; mientras que el antígeno E tiene una frecuencia del 27% y el "e" de 98%. (Tello & Pardo, 2012)

Al establecer si existe riesgo de aloinmunización durante el embarazo el 49,48% de las mujeres incluidas en el estudio no corren ningún riesgo de isoimmunización materno-fetal frente al fenotipo de su pareja, sin embargo el 28,64% tienen un 50% de probabilidad, el 21,87 tienen un 100% de probabilidad de presentar isoimmunización.

Dentro de los agentes causales existe una mayor posibilidad de que existan isoimmunizaciones causadas por anti-C y anti-E, los cuales podrían presentarse en un 20,31% para anti-C y anti-E en un 21.88%. (Fuenzalida, 2014). Un estudio en Argentina menciona un caso de inmunización por anti-e, en donde presentó anticuerpos no solo hacia eritrocitos fetales sino a sus propios eritrocitos entrando en un caso de anemia severa que llevo a una hospitalización alrededor de 6 meses, el autor menciona la disminución de una causa más de problemas ante parto o postparto si existe la fenotipificaciones del sistema Rh y realización de la prueba de Coombs Indirecto sin importar las característica de su RhD. (Contreras, 2000)

En el 2003, se describió a una mujer que presentaba un anticuerpo anti-Ce en su segundo embarazo, lo que desencadeno una enfermedad hemolítica del recién nacido, en un segundo embarazo gemelar sufrieron la misma patología causada por estos anticuerpos. (Ranasinghe, 2003)

Un análisis de casos clínicos en el 2011, describe un caso de una mujer de 26 años donde su hija recién nacida presento ictericia neonatal causada por anticuerpos anti-c y anti-E (Bonilla, 2011) también se presentaron casos anteriores donde se encontró en una mujer múltipara anticuerpos anti-E el cual causo enfermedad hemolítica en el feto. (William, 2003). Por lo tanto, todos estos estudios confirmar la presencia de aloinmunización por parte de los antígenos del sistema Rh.

4.3 CONCLUSIONES

La técnica de aglutinación en tubo identificó 18 fenotipos Rh, de los cuales solo 10 fueron encontrados, los fenotipos para el RhD positivos que son: CCDEE, CCDEe, CCDee, CcDEE, CcDEe, CcDee, ccDEE, ccDEe, ccDee; y para los RhD negativos solo encontramos el fenotipo ccdee. Solo un 0,78% de la población estudiada fueron RhD negativo, lo que quiere decir que hay ausencia de antígeno D.

El fenotipo más común es el CcDee con un 27.6%, seguido del CcDEe con 17.97%, de un total de 384 personas (192 mujeres: 192 hombres). Las personas con Fenotipo CcDEe no corren riesgo de isoimmunización por anticuerpos anti-Rh.

Se identificó que en mujeres el grupo dominante fue el CcDEe con un 28.12% en comparación al masculino que tiene 7.8%, mientras que en el sexo masculino dominó en el fenotipo CcDee con 34.89% frente a 20.31% del sexo opuesto.

El fenotipo CcDee se encuentra en mayor frecuencia distribuido en todos los grupos sanguíneos del sistema ABO con un total del 27.6%.

Se determinó que los antígenos c y e se encuentran en un 89,50% y 81,62% respectivamente en personas con fenotipo RH D positivo; mientras que los antígenos C y E respectivamente en personas con fenotipo RH D negativos no fueron encontrados debido a que la cantidad de personas con RhD Negativo fueron 3 de 384 muestras analizadas.

Se detectó que existen 42 parejas que presentan un riesgo del 100% de probabilidad de sufrir problemas de incompatibilidad, 55 parejas tienen un riesgo del 50% y 95 parejas no presentan riesgo debido a que la madre tiene todos los antígenos del sistema Rh, siendo los agentes causales más probables anti-C y anti-E, los cuales podrían presentarse en un 20,31% para anti-C y anti-E en un 21.88%.

4.4 RECOMENDACIONES

Realizar la identificación de fenotipos del sistema Rh por ser este el más inmunogénico después del sistema ABO, en parejas donde la mujer se encuentre en gestación o bien, se encuentren en búsqueda de un embarazo.

Informar a la población de riesgo, especialmente a las mujeres, las consecuencias que esto puede traer al feto, tales como enfermedad hemolítica del recién nacido, Hidrops fetal, y hasta la muerte del neonato si no es diagnosticada a tiempo.

Implementar estas pruebas en centros de ginecología y obstetricia, así como también en unidades de fertilidad y esterilidad o laboratorios clínicos anexos a estos.

Concientización en la población sobre la importancia de conocer su verdadero grupo sanguíneo y no limitarlos solo a la detección de ABO y Rh, sin conocer su fenotipo.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alcaraz, J. L. (2007). Investigación en el trabajo diario de inmunohematología. Fenotipos eritrocitarios y protocolo para encontrar sangre compatible en pacientes con aloanticuerpos antieritrocitos. *Medigraphic Artemisa*, p. 23-27.
- Animal., D. S. (2009). *Inmunología. Curso 2009-10. Tema 13*. Obtenido de www.ucm.es/info/saniani
- Arbelaez, C. (2009). Fundamentos de Genética e Inmunología para Bancos de Sangre y Medicina Transfusional. *Medicina & Laboratorio. Volumen 5, N 1 y 2*, 37-68.
- Arévalo, A. (2009). Incompatibilidad Rh en el Embarazo. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina. N° 195*, p. 17-22.
- Arias, A. (2008). Isoinmunización Rh Descripción de un Caso. *Revista Médica de Costa Rica Centroamerica LXV*, 163-168.
- Asociación de Hemoterapia e Inmunología. (2001). American Association of Bloods Bank. Manual técnico. Argentina: 13ª edición; pp. 302 - 313.
- Bailey-Wilson, (1998) J. E. (s.f.). *Define Locus* . National Human Genome Research Institute .
- Baptista, H. (2005). El sistema Rh, una mirada a fondo. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 43 (supl 1): 3-8.
- Baptista, H. (2001). Prevención de la isoinmunización materna al RhD, con g-globulina anti D. *Instituto Nacional de Salud Pública, Revista Salud Pública de México*, Vol 43:52-58.
- Bloch, D. M. (2007). Manual de Procedimientos Técnicos de Laboratorio Clínico de Atención de Primer nivel. *El Salvador Ministerio de Salud* 123-124.
- Bonilla, R. (2011). Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido por Anti-c y Anti-E. *Asociación Mexicana de Medicina Transfusional*, p. 10-13.
- Buelvas, A., Muñoz-Díaz, E., & León, G. (2014). *Inmunohematología básica y aplicada*. Colombia: Feriva ISBN 978-958-46-4106-9.
- Calderon, D. (2006). *Frecuencia de fenotipos del sistema Rh aplicando el método de aglutinación en microplaca caja petrolera de salud La Paz - Bolivia Octubre a Diciembre del 2005*. Obtenido de <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/500/1/TN939.pdf>
- Calomarde, M. C. (2012). Isoinmunización grave anti-D en una gestación gemelar. Caso clínico. *Ginecología y Obstetricia de México*, p. 218-223. ISSN-0300-9041.
- Cañizares, C. (8 de agosto de 2002). *Órgano oficial de difusión científica H.C.A.M.* Obtenido de Sensibilización antieritrocítica en donantes y embarazadas: <http://www.hcam.gob.ec/multimedia/revista/rcv1n2.pdf#page=46>
- Concebir, U. d. (2011). *Concebir*. Recuperado el 25 de febrero de 2013, de www.concebir.com.ec

- Contreras, P. (2000). Incompatibilidad sanguínea materno fetal severa por anti-Duffy y anti-E (*Rh-Hr*) en una madre con drepanocitosis. Obtenido de Revista médica de Costa Rica y Centroamérica, Vol.57, no.550 (ene.-mar. 2000) p.11-4: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/550/04INCOMP.html>
- Cortes, A., & León, G. (Mayo de 2014). Evaluación inmunohematológica durante la gestación y terapia transfusional en el periodo prenatal. *Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional*. México, Venezuela, Argentina.
- Cotorruelo, C. (2006). Aloimmunización a un antígeno del sistema Rh de alta frecuencia. *Medicina (Buenos Aires)*, 66: 46-48.
- Dajak, S. (Octubre de 2013). *National Center of Biotechnology Information (NCBI)*. Obtenido de Relationship between previous maternal transfusions and haemolytic disease of the foetus and newborn mediated by non-RhD antibodies: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827396/> doi: 10.2450/2013.0193-12
- Daniels, G., & Bromilow, I. (2010). Essential Guide to Blood Groups. En G. Daniels, & I. Bromilow, *Essential Guide to Blood Groups* (págs. 219-236). UK: Wiley-Blackwell.
- Dean, L. (2005). *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Estados Unidos: Bethesda: National Center for Biotechnology Information.
- Del Peon, H. L. (2002). Salud Pública Mex. *Frecuencias de grupos sanguíneos e incompatibilidad ABO y Rh D*. México: vol. 44 Pág. 406-412.
- Díaz, J. A. (1995). Estudio genético multiloci en la población colombiana. *Biomédica*, 15:123-130.
- Domínguez, A. (2007). Frecuencia del fenotipo Rh en donantes de sangre / Frequency of the Rh phenotype among blood donors. *Rev. argent. transfus*;33(1):77-80.
- Domínguez, A., & Ridolfi, A. (2007). Frecuencia del fenotipo Rh en donantes de sangre. *Revista argentina de transfusión* , 33(1):77-80.
- 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.
- Fuenzalida, J. (2014). Manejo de la embarazada con isoimmunización por anticuerpos irregulares. *Revista chilena obstetrica ginecologica*, 79(4): 315 - 322.
- Fung, M. K. (2014). Manual Técnico de Asociación de Bancos de Sangre. AABB. Edición Nº18
- Geifman-Holtzman, O. (27 de julio de 2006). Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood—A meta-analysis. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2006.07.033>.
- Golfed, J. (2014). Microtécnica de aglutinación en gel. *Fundamentos y técnicas básicas* . Montevideo, Uruguay: Saiden S.A.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (08 de 10 de 2014). *Estadísticas de Nacimientos y Defunciones (Generales y Fetales) – 2013*. Obtenido de "Cuadro No. 10 Defunciones totales, por tipo de certificación y grupos de edad, según sexo y causas de muerte: www.ecuadorencifras.gob.ec/nacimientos-defunciones/

- Insunza, A. (2011). Enfermedad hemolítica perinatal: manejo de la embarazada RhD negativo. *Revista chilena de obstetricia y ginecologia*, Hospital Padre Hurtado, Escuela de Medicina, Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo, Chile. 76(3): 188 - 206.
- Langston, M. (1999). Evaluation of the Gel system for ABO Grouping and D typing. *Transfusion*, Volume 39, issue 3, 300-305.
- López, D. C. (2009). Verificación de la funcionalidad de los reactivos hemoclasificadores (sistema ABO y Rh) como parte del control de calidad interno. *Medigraphic Artemisa*, Volumen 34, p. 69.
- Lopez, M. (2000). Enfermedad Hemolitica Perinatal. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología Hemoter*, 16(3):161-83.
- Ministerio de Salud Publica. (29 de agosto de 2006). *Ley de Maternidad Gratuita y Atención a la Infancia*. Obtenido de <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/09/LEYDEMATERNIDADGRATUITAYATENCIONALAINFANCIA.pdf>
- Molina, S. (2009). Aloinmunización rh: manejo anteparto. Revisión de la literatura. *Revista Colommboliana de Obstetricia y Ginecología*, Vol. 60 No. 3: 262-273.
- Mora, M. P. (enero de 2010). Boletín informativo no.2: "salud transfusional" volumen 3, número 14. *Diagnóstico del area de inmunohematología en los bancos de sangre de Colombia, Año 2009*. Colombia: instituto nacional de salud, red nacional de sangre.
- Muñoz, H. (30 de Enero de 2014). Programa Nacional de Salud de la mujer, Guia Perinatal 2014. *Subsecretaria de Salud Pública, División Prevención y Control de Eefermedades*. Chile.
- Navarrete, R. (2012). Frecuencia de fenotipos del sistema Rh-Hr en donantes Rh negativos en el Hospital San Vicente de Paul. *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica LXIX*, (601) 143-147.
- Navarrete, R. (2012). Frecuencia de fenotipos del sistema Rh-Hr en donantes Rh negativos en el Hospital San Vicente de Paul. *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica LXIX*, (601) 143-147.
- Omeñaca, T. (2008). Enfermedad hemolítica del recién nacido. *Servicio de Neonatología. Hospital Infantil La Paz. Departamento Pediatría*. España.
- Ovalle, A. (2005). Estudio Anatomico-Clinico de las Causas de Muerte Fetal. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 303-312.
- Ramón.Almuna, & Rodrigo, C. (2009). Anticuerpos Irregulares Anti-E. *Rev. Obstet. Ginecol. - Hosp. Santiago Oriente dr. Luis Tisné Brousse.* , Vol 4 (1): 37-41.
- Ranasinghe, E. (2003). Transfusion Medicine. *Anti-Ce complicating two consecutive pregnancies with increasing severity of haemolytic disease of the newborn*. Blackwell Publishing Volumen 13, pp. 53-56 DOI: 10.1046/j.1365-3148.2003.00412.x.
- Roback, J., Grossman, B., Harris, T., & Hillyer, C. (2011). *Technical Manual*. 17th ed. AABB.

- Romero, J. (2007). Reacciones de hipersensibilidad. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina N° 167*, 11-16.
- Saline, N. (2007). Solución salina preparada BBL. *BD ESPAÑOL* , 2-3.
- Scott, M. (2004). The complexities of the Rh system. *Vox Sanguinis*, 87 suppl. 1 58-62.
- Swarz, R. (2006). *Obstetricia 6ª Edicion*. Buenos Aires: El Ateneo.
- Tello, J., & Pardo, A. (2012). Incompatibilidad por Subgrupos C, c, E, e: Experiencia del Servicio de Neonatología del Hospital José Carrasco, 2009-2011. *REVISTA MÉDICA HJCA*, 49-53.
- Ulloa, A. (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-2009-2012.
- Valdes, A. (2001). Instituto de hematología e Inmunología. *Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios*. Cuba: Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia 17(2): 98-107.
- Westhoff, C. (2004). The Rh blood group system in review. *Transfusion*, 44:1663–73.
- William, W. (2003). Anti-E Alloimmunization in pregnancy: Management dilema. *Journal of Obstetrics and Gynecology. Res. Vol 29*, 1:45-48 DOI: 10.1046/j.1341-8076.2003.00067.
- Yoshida, M. (2011). Successful treatment of fetal intraperitoneal administration of immunoglobulin in a case of fetal hemolytic anemia with 131,072-fold anti-E alloimmunization. *Hindawi Publishing Corporation, Case report in Obstetrics and gynecology*, ID 157510, 4 pages.

6. ANEXOS

Anexo 1: Formulario de Consentimiento Informado

“Identificación del fenotipo Rh-Hr en parejas que acuden a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir en Quito, 2013”

Formulario de Consentimiento Informado

Objetivo del Proyecto:

La isoimmunización materno-fetal por anticuerpos anti-fenotipos Rh es uno de los principales causales de la enfermedad hemolítica del recién nacido y para determinar el riesgo que tiene el feto de padecer esta enfermedad identificamos el grupo sanguíneo y el fenotipo Rh-Hr en parejas que acuden a la unidad de fertilidad y esterilidad Clínica Concebir en Quito. Pedimos su ayuda voluntaria. Su participación ayudará a obtener información valiosa que ayudará a diseñar maneras de controlar y prevenir esta enfermedad. Este estudio incluirá a unas 400 parejas aproximadamente.

Participación voluntaria: Usted puede elegir libremente participar o no participar en absoluto en este proyecto de investigación. No habrá ningún tipo de penalización si usted no desea participar. Si se niega a participar Ud. no perderá ninguno de los beneficios de atención de salud que existen normalmente para Ud. Para que usted pueda participar en este proyecto, es necesario que usted entienda lo que se necesita de usted. Si usted acepta colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea disponible abajo en este formulario.

Usted puede dejar de participar en este proyecto en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. De igual manera, los investigadores pueden terminar la participación de Ud. en el mismo. Si éste es el caso, usted será notificado. Si usted tiene dudas sobre la investigación o sobre sus derechos en este proyecto de investigación, por favor pregunte al entrevistador o contacte a las personas nombradas abajo.

Encuesta sobre: Un entrevistador solicitará que usted responda a varias preguntas relacionadas con número de embarazos, si tuvo o padece de alguna enfermedad y si ha recibido o no algún tipo de transfusión sanguínea o trasplante de órganos. Estas preguntas se refieren a varios factores asociados a la determinación del fenotipo Rh (tiempo estimado 2 minutos).

Confidencialidad: Toda la información que usted proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada solamente para propósitos de la investigación sin conexión a su nombre. Los resultados generales, serán compartidos con la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, la unidad de fertilidad y esterilidad Clínica Concebir y el Laboratorio Clínico Diagnossis S.A en Quito-Ecuador.

Riesgos: No existe ningún riesgo en participar en esta investigación. El asignar un código a toda su información y desligarlo de cualquier referencia a su identificación personal reducen al mínimo la de pérdida de confidencialidad.

Beneficios: Los beneficios potenciales de su participación incluyen un incremento en el conocimiento sobre la prevención de la inmunización Materno-fetal y la futura implementación de actividades de control e intervención, que tienen el potencial de mejorar la salud de su comunidad. Como también el conocimiento de su tipo de sangre y fenotipo Rh completo realizado por un método de calidad estandarizado.

Declaración general de consentimiento: “Al firmar abajo, declaro que los investigadores a cargo de este proyecto me han explicado los propósitos y los beneficios y riesgos de la investigación, y que los he entendido plenamente. Entiendo claramente que no hay compensación monetaria por mi participación ni de parte de la unidad de fertilidad y esterilidad Clínica Concebir, ni del Laboratorio Clínico Diagnossis S.A, ni de la PUCE, y/o de sus empleados, y que en caso de alguna lesión que pudiese sufrir por mi participación en esta investigación, se buscarán las prestaciones médicas necesarias sin costo para mí. Al firmar abajo declaro que entiendo el alcance y los objetivos del Proyecto, y estoy dispuesto a participar voluntariamente.

Nombres: _____ **Apellidos:** _____

Firma

Si tiene preguntas sobre esta investigación por favor comuníquese con: Jaime Sojo en Diagnossis S.A. av. Mariana de Jesús y Martín de Utreras tel. 2468450 (ext. 103) / 2565602 / 0995844677 mail. diagnossis@outlook.com.

Anexo 2: Protocolo de Control de Calidad de Reactivos. Sueros Rh

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

CUADRO 7. Control de calidad de las técnicas. Tipificación Rh

Tipo de prueba	Requisitos mínimos	Muestras de control	Frecuencia de los controles
Tipificación del factor Rh (D)	Usar dos sueros anti-D diferentes Usar el test indirecto de antiglobulina para detectar los D ^u , si es necesario Si se utilizan dos sueros monoclonales deben ser de lotes diferentes y capaces de reconocer con certeza las variantes del antígeno D.	Una muestra D+ y otra D-	En cada serie de pruebas, o al menos una vez al día, siempre que se usen los mismos reactivos
Fenotipo Rh	Tipificación por duplicado usando dos sueros para cada antígeno (C, c, E, e)	Para una fenotipificación completa, una muestra de cada uno de los siguientes Rh: R ₁ r, R ₂ r, r' r, r" r, r r y R ₁ ^w r.	Ídem

Fuente: El control de la calidad de los análisis inmunohematológicos en la Región de las Américas Dra. Elena Franco, 2013.

Anexo 3: Resultados del Control de Calidad de los reactivos

Tabla Nº 4.7 Control de calidad del Reactivo Anti-D

	Potencia	Afinidad	Avidez
	1/16	(++++)	12''
		Reactivo no diluido	
Valores de referencia	Dilución máxima	(++++) Grumo completo bien formado	Reactivo sin diluir
Franco, 2003	1/16	(+++)	14''
AABB, 2012		grumo disperso	(López, 2009)
		Referencia de los dos autores	

Tabla Nº 4.8 Control de Calidad del Reactivo Anti-E

	Potencia	Afinidad	Avidez
	1/16	(++++)	13''
		Reactivo no diluido	
Valores de referencia	Dilución máxima	(++++) Grumo completo bien formado	Reactivo sin diluir
Franco, 2003	1/16	(+++)	14''
AABB, 2012		grumo disperso	(López, 2009)
		Referencia de los dos autores	

Tabla Nº 4.9 Control de Calidad del Reactivo Anti-e

	Potencia	Afinidad	Avidez
	1/16	(++++)	14''
		Reactivo no diluido	
Valores de referencia	Dilución máxima	(++++) Grumo completo bien formado	Reactivo sin diluir
Franco, 2003	1/16	(+++)	14''
AABB, 2012		grumo disperso	(López, 2009)
		Referencia de los dos autores	

Tabla Nº 4.10 Control de Calidad del Reactivo Anti-C

	Potencia	Afinidad	Avidez
	1/16	(++++)	11''
		Reactivo no diluido	
Valores de referencia	Dilución máxima	(++++) Grumo completo bien formado	Reactivo sin diluir
Franco, 2003	1/16	(+++)	14''
AABB, 2012		grumo disperso	(López, 2009)
		Referencia de los dos autores	

Tabla Nº 4.11 Control de Calidad del Reactivo Anti-c

	Potencia	Afinidad	Avidez
	1/16	(++++)	10''
		Reactivo no diluido	
Valores de referencia	Dilución máxima	(++++) Grumo completo bien formado	Reactivo sin diluir
Franco, 2003	1/16	(+++)	14''
AABB, 2012		grumo disperso	(López, 2009)
		Referencia de los dos autores	

Anexo 4: Encuestas

“Identificación del fenotipo Rh-Hr en parejas que acuden a la Unidad de Fertilidad y Esterilidad Clínica Concebir en Quito, 2013”

Pareja N° _____ (Mujer)

Edad: _____

1. ¿Cuántos embarazos ha tenido?
 - A. 1
 - B. 2
 - C. 3
 - D. Otros _____

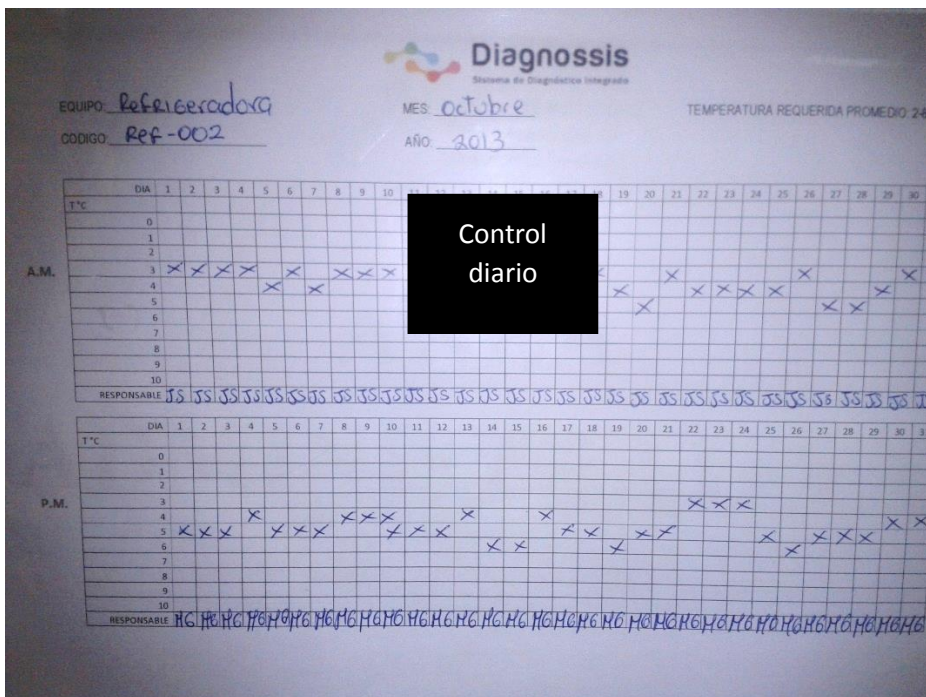
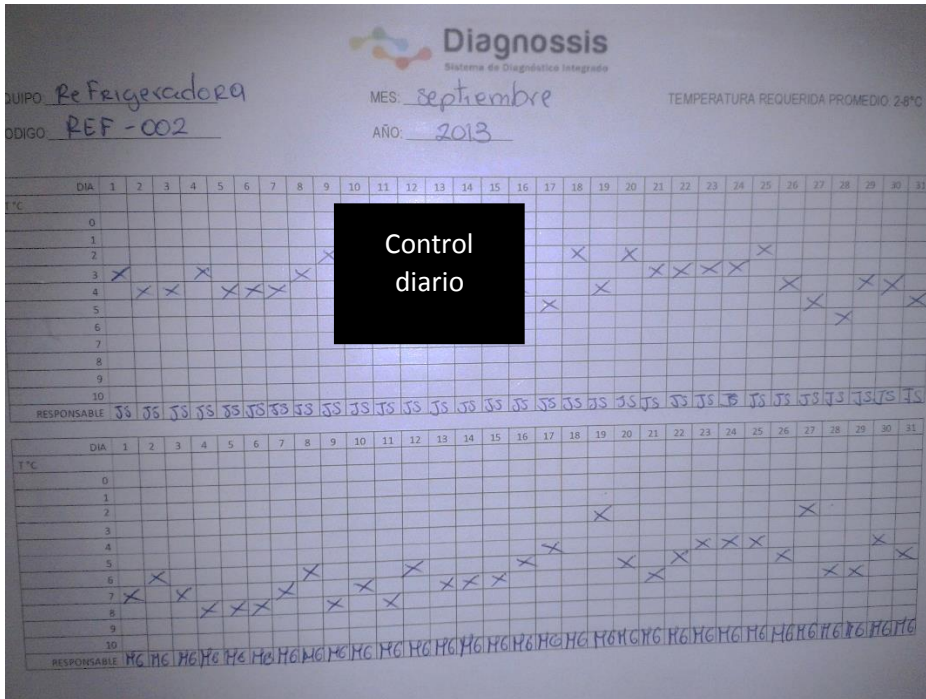
2. ¿Se ha sometido a algún procedimiento quirúrgico? Si su respuesta es si, indique cual o cuales.
 - A. No
 - B. Si

3. ¿Le han transfundido Sangre alguna vez?
 - A. No
 - B. Si

4. ¿Le han trasplantado órganos?
 - A. No
 - B. Si

5. ¿Sufre o padece alguna enfermedad? Si su respuesta es si, indique cual o cuales.
 - A. No
 - B. Si

Anexo 6: Temperatura Refrigeradora



Fuente: Base de datos fotográficos del autor.

Anexo 7: Fases del Estudio

a) Reactivos para determinación de fenotipos



Fuente: Bio-rad

b) Control de Calidad:

Avidéz



Potencia



Especificidad

Determinación de la presencia de otros antígenos con el reactivo anti-E



Resultados:

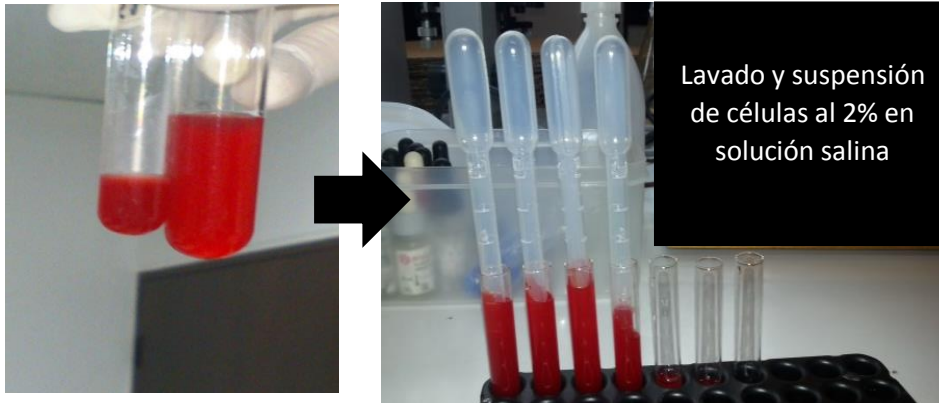
Avidéz: aglutinación 3''

Potencia: de todos los reactivos de acuerdo a la dilución más lata.

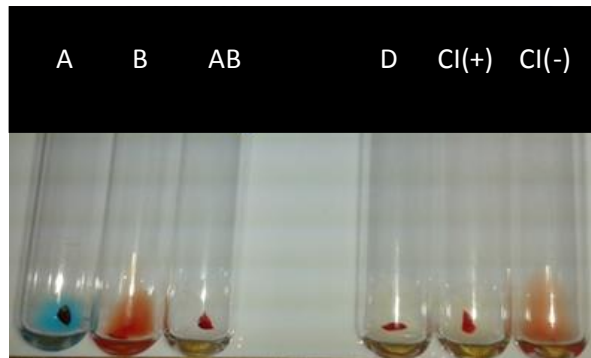
Especificidad: negativo con otros antígenos

Fuente: Bases de datos fotográficos del autor

c) Preparación de muestras al 2%

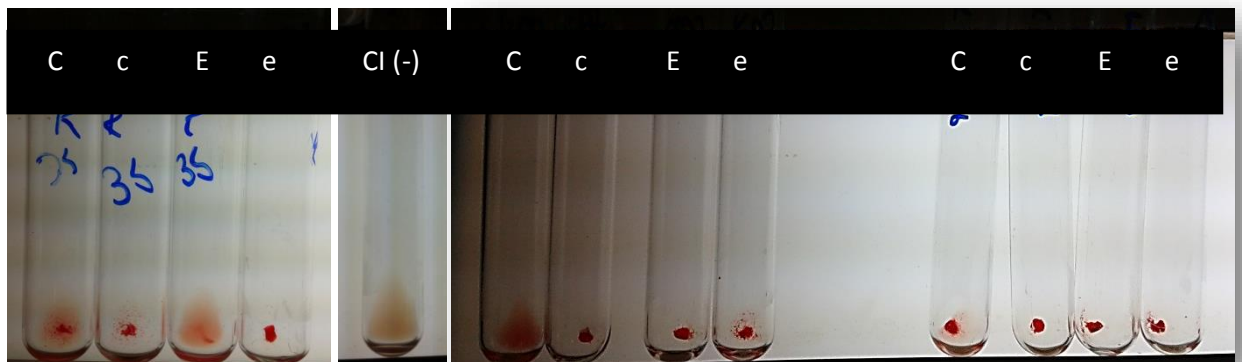


d) Determinación del grupo sanguíneo: Lectura por Aglutinación



Fuente: Base de datos fotográficos del autor

e) Determinación de antígenos C,c, E, e: Lectura por aglutinación



Base de datos fotográficos del autor.

Anexo 8: Propaganda de campaña



Fuente: Base de datos fotográficos del autor.