

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA

“DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO D PARCIAL VI EN DONANTES
DE SANGRE QUE ACUDEN AL HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA
ECUATORIANA MEDIANTE LA TÉCNICA GEL, 2014-2015”

DAYSÍ ADRIANA RODRÍGUEZ JIMÉNEZ

DIRECTORA: Máster. Rosa Chiriboga Ponce.

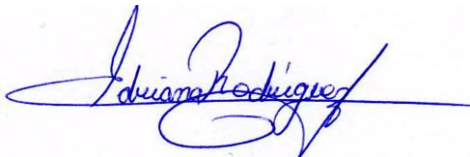
QUITO, 2015

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, DAYSI ADRIANA RODRÍGUEZ JIMÉNEZ, C.I. 1713811816; autora del trabajo de graduación intitulado: “DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO D PARCIAL VI EN DONANTES DE SANGRE QUE ACUDEN AL HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA ECUATORIANA MEDIANTE LA TÉCNICA GEL 2014-2015”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Escuela de Bioanálisis:

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

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



DAYSI ADRIANA RODRÍGUEZ JIMÉNEZ, C.I. 1713811816

DEDICATORIA

Dedico este trabajo y gran logro conseguido primeramente a Dios, pues me lleno de bendiciones y fortaleza día a día, haciendo que supere cada obstáculo que llego y paso.

A mi esposo Paúl Bravo, por darme su apoyo incondicional, su amor su respeto, y sobre todo por ser el compañero perfecto, el indicado el que estuvo conmigo a cada paso de este trabajo, el que me llena por dentro y me ayuda a equilibrar mis emociones.

A mi amada hija Ayelen Naomi, la cual me supo brindar su apoyo incondicional, y cedió sus horas de juego conmigo para que yo realizara uno de mis sueños. Te amo.

A mi padre por brindarme su apoyo y entrega incondicional por enseñarme que se debe realizar los trabajos siempre con amor.

A las personas que siempre estuvieron apoyándome con sus palabras precisas correctas y en el momento indicado y sobre todo porque nunca dudaron que lograría este gran sueño; mi hermana Nora mi hermano David y mi cuñado Fernando.

A mi ángel que se encuentra en el cielo y que desde niña fue la fortaleza y el apoyo más grande de mi vida, quien paso conmigo los momentos más felices de mi vida y los más fuertes y duros, la que me enseñó que un resbalón no es caída, y que lo más importante de este camino es el amor incondicional. A mi madre Elsa que la amo con todo mi corazón. Este logro es tuyo también.

Daysi Adriana Rodríguez Jiménez

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios infinitamente por sus bendiciones y permitirme estar realizando una de mis metas.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Bioanálisis; por los conocimientos y formación impartida durante este largo trayecto.

A mi directora de disertación Mst. Rosita Chiriboga, por su confianza, gran dedicación y esfuerzo, por ser una excelente docente, por compartir su tiempo, e impulsarme a concluir este trabajo y sobre todo por convertirse en una amiga que supo apoyarme en los momentos duros y difíciles. Le estaré infinitamente agradecida por su dedicación, para lograr culminar mi formación académica.

Al Hemocentro Nacional de La Cruz Roja Ecuatoriana, al Dr. Marco Herdoiza, quienes sin dudar fueron parte esencial de este proceso, ya que me permitieron utilizar sus instalaciones, sus datos y sus equipos para poder realizar la parte práctica de mi trabajo, de igual manera agradezco al personal de las áreas de inmunología y re chequeo, las cuales siempre estuvieron dispuestos a brindarme su apoyo y colaboración.

A mi esposo por su apoyo incondicional por estar conmigo en los momentos difíciles, las madrugadas interminables, por apoyarme cada día y en cada decisión, por llenar de alegría mis días duros, y sobre todo por ser parte de mí.

A mi hermosa hija, quien tuvo que privarse de las horas de juego o de contar historias, por permitirme estar sentada frente a un computador o dedicada a la lectura. Por ser tan paciente y valiente por tu ánimo y por ser mi motivación y deseo de superación, Gracias cosita de la mamá.

A mi hermosa familia por su apoyo incondicional, por creer en mí en todo momento, por su apoyo emocional y económico por ser mi timón de lucha, por brindarme su confianza. Gracias infinitas a mis hermanos y a mi padre los amo y estaré para ustedes siempre.

A la señora Lucia Villalba por brindarme su apoyo en todo momento y ser parte de este hermoso sueño.

A mis amigos quienes con sus enseñanzas, sus rizas, sus enojos y sus días aprendí que se puede encontrar en la vida verdaderos amigos; nueva familia. Los cuales me brindaron su amistad y cariño sincero y a los cuales les llevare en mi corazón porque ahora son parte de él.

Finalmente al ejemplo de lucha entrega y amor al ángel que cuida de mis pasos mi madre.

RESUMEN

“Determinación del antígeno D parcial VI en donantes voluntarios de sangre que acuden al Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana mediante la técnica gel, 2014-2015”.

Introducción: El antígeno D se caracteriza por ser polimórfico y altamente inmunógeno debido a la habilidad de estimular la producción de anticuerpos anti-D en pacientes o mujeres que han recibido transfusiones incompatibles; el primer caso documentado de aloinmunización en una persona Rh D positiva desencadenó investigaciones que condujeron a determinar la existencia de individuos portadores de variantes del antígeno D, los más comunes con D Débil y D parcial siendo estos de difícil identificación serológica por lo que se recomienda la implementación de un algoritmo de detección. Existen varios tipos de D parcial dentro de ellos el DVI es el de significancia clínica por estar relacionado con anemia hemolítica postransfusional y la enfermedad hemolítica del recién nacido. Es por esta razón que el objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia y distribución del antígeno parcial DVI considerado como característico de una población y etnia. Adicionalmente los resultados obtenidos permitieron establecer las recomendaciones al Ministerio de Salud Pública del Ecuador por ser el ente rector del sistema de salud. **Materiales y Métodos:** este estudio fue de tipo descriptivo y transversal y mediante un muestreo aleatorio se analizaron un total de 383 muestras provenientes de donantes de sangre tipificados como Rh D negativos, Du positivo y/o fenotipos Ce, cE ó CE, con un nivel de confianza del 95% y 5% de error. Para el análisis de las muestras se utilizó la metodología en gel que identificó a la variante DVI. Para el análisis de datos se utilizó estadística descriptiva y la relación de las variables mediante la aplicación del programa estadístico SPSS-chi cuadrado. **Resultados:** se determinó una prevalencia del 13% de antígeno DVI distribuido en 11 provincias ecuatorianas la de mayor prevalencia fue Pichincha, el grupo sanguíneo relacionado con el antígeno DVI fue el grupo O. Este antígeno se encuentra más comúnmente en hombres que en mujeres entre las edades de 18 a 40 años y está asociado a los antígenos del sistema RHCE. **Conclusiones y Recomendaciones:** La existencia del antígeno DVI y su distribución en la población ecuatoriana pone de manifiesto que deben cambiarse las políticas y normas de tipificación sanguínea especialmente en los centros de medicina transfusional, bancos de sangre, Hemocentros y laboratorios clínicos dedicados a esta actividad; así como la elección de reactivos adecuados y el establecimiento de algoritmos de detección de acuerdo al tipo de paciente a ser tipificado.

ABSTRACT

"Determination of the D VI partial antigen in volunteer blood donors attending the Blood Center of the Ecuadorian Red Cross through gel technique, 2014-2015".

Introduction: The D antigen is characterized as polymorphic and highly immunogenic due to the ability to stimulate the production of anti-D antibodies in patients or women who have received incompatible transfusions; the first documented case of alloimmunization in Rh D positive patient started investigations which guided to establishing the existence of individuals carrying variants of the D antigen, the most common with Weak D and partial D being these hardly serologically identified, for this reason it is recommended to implement a detection algorithm. There were several types of partial D, one of them DVI which is the most clinically significant one by being associated with post-transfusion hemolytic anemia and Hemolytic Disease of the Newborn. This is the reason because the objective of this study was to determine the prevalence and distribution of partial DVI antigen which is characteristic of an ethnicity and population. In addition the results obtained allowed to establish recommendations to the Ministry of Public Health of Ecuador as the government institution of the health system. **Materials and Methods:** This study was descriptive transversal and by random sampling a total of 383 samples were analyzed being these from blood donors classified as Rh D negative, positive Du and / or phenotypes Ce, cE or CE, these with a 95% confidence level and 5% error. For sample analysis methodology used was GRIFOLS BIORAD gel technique for DVI variant identification. For data analysis was used descriptive statistics and for the variables relationship was used chi-square statistic applying SPSS software. **Results:** A prevalence of 13% of DVI antigen was determined, these were distributed in 11 Ecuadorian provinces being Pichincha the most prevalent, and determination that the blood group antigen associated with the DVI was the group O. This antigen is most commonly found in men than in women between the ages of 18-40 years and is associated to RHCE antigens system. **Conclusions and Recommendations:** The existence of DVI antigen and its distribution in the Ecuadorian population shows that should change the policies and standards of blood typing particularly in transfusion centers, blood banks, clinical laboratories and blood centers dedicated to this activity; and the choice of suitable reagents and establishing detection algorithms according to the type of patient to be typing

TABLA DE CONTENIDOS

Declaración y autorización	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Introducción.....	7
CAPÍTULO I.....	9
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
1.3.3 Limitación del estudio	14
CAPÍTULO II.....	15
2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	15
2.1.1 Antecedentes.....	15
2.1.2 Sistema Sanguíneo Rh	16
2.1.3 Genes y antígenos del Sistema Rh.....	18
2.1.4 Antígenos del Sistema Rh.....	19
2.1.5 Anticuerpos del Sistema Rh.....	20
2.1.6 Tipos de antígenos del Sistema Rh	21
2.1.6.1 Antígeno D débil	21
2.1.6.2 Antígeno D parcial.	22
2.1.6.2.1 Clasificación del D parcial.	23
2.1.6.3 Características de los otros antígenos D.....	24
2.1.7 Fenotipos del sistema Rh.....	25
2.2 Métodos de detección.....	26
2.2.1 Discrepancias durante la tipificación del antígeno D.	27

2.2.2	Reacción antígeno-anticuerpo en tubo.....	29
2.2.3	Reacción de aglutinación en gel	29
2.2.4	Métodos moleculares.....	30
2.3	Reacciones transfusionales por anticuerpos anti-D parcial.	31
2.3.1	Reacciones transfusionales inmediatas	31
2.3.2	Reacción hemolítica del recién nacido.....	31
2.4	MARCO CONCEPTUAL	33
CAPÍTULO III.....		34
3.1	MARCO METODOLÓGICO	34
3.1.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1.1.1	Tipo de Estudio.....	34
3.1.1.2	Tipo de Muestreo	34
3.1.1.3	Tamaño de Muestra.....	34
3.1.1.4	Criterios de Inclusión	35
3.1.1.5	Criterios de Exclusión	35
3.1.1.6	Control de Calidad	35
3.2	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	36
3.2.1	Variable Dependiente:	36
3.2.2	Variable Independiente:	36
3.3	MATERIALES Y PROCESO	37
3.3.1	Materiales	37
3.3.2	Reactivos.....	37
3.3.3	Procedimiento.....	37
3.3.3.1	Fase Uno	37
3.3.3.2	Fase Dos	37
3.3.3.3	Fase Tres.	38
3.3.3.4	Fase Cuatro.....	38
3.3.3.5	Fase Cinco	39
3.3.3.6	Fase Seis.....	39

CAPÍTULO IV	40
4.1 RESULTADOS	40
4.1.1 Descripción de la población del estudio.	40
4.1.2 Prevalencia del antígeno DVI en donantes de sangre.....	43
4.1.4 Aloinmunización en donantes de sangre participantes en el estudio.....	46
4.1.5 Relación del antígeno DVI con fenotipos del sistema Rh.	46
4.2 Discusión	49
4.3 Conclusiones	52
4.4 Recomendaciones	53
4.5 Bibliografía.....	54
4.6 Anexos.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Nomenclatura de Fisher

Tabla 2: Nomenclatura de Wiener

Tabla 4.1: Distribución del antígeno DVI de acuerdo a la procedencia

Tabla 4.2: Antígeno CE/ce en presencia o ausencia del antígeno DVI

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Gen Sistema Rh

Gráfico 2: Tipos de D parcial determinados por análisis molecular

Gráfico 3: Determinación de genotipo RHD mediante PCR-SSP_RHD específica

Gráfico 4.1: Distribución de la población de estudio de acuerdo al género

Gráfico 4.2: Distribución de la población de acuerdo a la procedencia

Gráfico 4.3: Distribución porcentual de la población de estudio de acuerdo al grupo sanguíneo

Gráfico 4.4: Prevalencia del antígeno DVI en los donantes de sangre analizados

Gráfico 4.5: Prevalencia del antígeno DVI de acuerdo al género

Gráfico 4.6: Prevalencia del antígeno DVI de acuerdo a la edad

Gráfico 4.7: Prevalencia del antígeno DVI de acuerdo al grupo sanguíneo

Gráfico 4.8: Distribución porcentual del antígeno DVI y su relación con el fenotipo Rh

Gráfico 4.9: Distribución porcentual del antígeno DVI y su relación con el fenotipo Rh, antígenos C y E

ANEXOS

Anexo 1: Técnica control de Coombs

Anexo 2: Ejemplo de numeración aleatoria con un $n=225$

Anexo 3: Ejemplo lectura equipo DELFIN

Anexo 4: Protocolo de identificación de anticuerpos irregulares

Anexo 5: Valoración de la cantidad de aglutinación que se observe

Anexo 6: Proceso de estudio

LISTA DE SIGLAS

AABB: Asociación Americana de Bancos de Sangre.

Ac: Anticuerpo.

Ag: Antígeno.

C.G.R: Concentrado de Glóbulos Rojos.

CIEI: Centro de investigación en enfermedades infecciosas y crónicas.

EHRN: Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido.

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.

ISBT: International Society of Blood Transfusion.

MSP: Ministerio de Salud Pública.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

PCR-SSP: Reacción en cadena de la Polimerasa–Sequence Specific Primers

SPSS: Statistical Package for the Social Science.

INTRODUCCIÓN

El antígeno D es considerado el antígeno sanguíneo de gran importancia en medicina transfusional debido a su poder inmunógeno y a la capacidad de producir una aloinmunización. Las variantes del antígeno D son de difícil identificación y diferenciación serológica en los bancos de sangre especialmente entre D parcial y D débil, este último se caracteriza por poseer todos los epítopes pero en menor cantidad, mientras que el D parcial carece de un fragmento de proteína por lo tanto su deficiencia es cualitativa por la sustituciones de aminoácidos (Geoff D. , 2013), estas características dificultan su identificación. La importancia en una identificación inequívoca del antígeno D en los bancos de sangre se basa en que los individuos portadores de un antígeno parcial a pesar de ser considerados como Rh D positivo desarrollaran un anticuerpo anti-D al recibir sangre Rh D positiva aparentemente compatible (Geoff D. , 2013) (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

La prevalencia de las variantes del antígeno D en la población constituye un gran aporte para la población de estudio por ser un dato relevante y característico de cada población y etnia (Kabiri, Benajiba, Hajjout, Dakka, & Bellaoui, 2014), en este estudio se estableció una prevalencia del 13% de antígeno D variante VI distribuido en 17 provincias ecuatorianas especialmente en la de Pichincha (38,78%); Loja (12,24%), Tungurahua y Cotopaxi (8,16%). Esta información constituye un aporte para el Programa Nacional de Sangre y el de Maternidad Gratuita del Ministerio de Salud Pública del Ecuador, programas donde se establecen normas y lineamientos del “Buen Vivir”, cuyo objetivo es evitar que se produzcan aloinmunizaciones fatales y la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Actualmente varios autores afirman la necesidad de incluir pruebas moleculares para obtener una tipificación inequívoca, sin embargo los costos y adquisición de reactivos es un limitante en los bancos de sangre o Hemocentros por lo que se utilizan pruebas serológicas en tubo o en gel. Para la identificación de los antígenos D parciales se han establecido algoritmos de detección, uno de ellos es la tipificación de los fenotipos del Rh (C,c,E,e), ya que su presencia puede disminuir la expresión del antígeno D o puede ocasionar aglutinaciones inespecíficas al ser enfrentados a reactivos monoclonales ocasionando falsos positivos (Baptista-González H. A., 2004) (Geoff D. , 2013).

Se ha determinado que el haplotipo RHDCE ejerce una influencia sobre la expresión del antígeno D ya sea disminuyéndola o aumentándola, provocando clasificaciones equívocas en los donantes y por ende reacciones pos transfusionales muchas de ellas

con graves consecuencias (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014); en este estudio se determinó que el 54% de los donantes portadores del antígeno DVI está asociado a los antígenos C y el 34% al E corroborándose el hecho de una expresión disminuida del antígeno D ya que estos donantes fueron tipificados inicialmente como D débil.

La recomendación a los Hemocentros, bancos de sangre y especialmente a centros de medicina transfusional es implementar un algoritmo de detección que permita determinar la presencia de variantes del antígeno D; en estos casos es importante considerar el uso combinado de metodología manual y semi-automatizada. Las variaciones fenotípicas y la identificación entre D débil y D parcial tienen muchas limitantes y van directamente relacionadas con las características de la calidad de los reactivos como son: sensibilidad, especificidad y avidéz de los reactivos utilizados (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014) (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012). También es importante elegir un algoritmo acorde a transfusión y/u obstetricia, los estudios recomiendan el uso de reactivos monoclonales que no detecten DVI para pacientes y mujeres gestantes, y en el caso del uso de tarjetas (gel) deben detectar la fracción DVI (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

En el caso de donantes de sangre la estrategia es la utilización de un reactivo que detecte todas las variantes de D a fin de ser catalogados como Rh D positivos y no utilizar sus derivados en pacientes D negativos con, estas estrategias se evitaría una aloinmunización (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

En el caso de no disponer reactivos con características especiales se debe implementar el uso de dos tipos de reactivos un Dual IgG&IgM más un monoclonal IgM para pruebas en tubo o el uso de tarjetas de gel que puedan identificar estas variantes en forma separada, es decir que posean reactivo para determinar si es DVI(+) y DVI(-) (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Toda esta información y recomendaciones obtenidas en este estudio deben ser tomadas en consideración por el Programa Nacional de Sangre del Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

CAPÍTULO I

1.1 JUSTIFICACIÓN

Los estudios que realiza un banco de sangre antes de cada transfusión sanguínea tienen como objetivo asegurar la compatibilidad entre los hematíes del donante y los anticuerpos presentes en el plasma del receptor, estas pruebas son denominadas “cruzadas” (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

La obtención de resultados negativos en estas pruebas ofrece la posibilidad de una seguridad transfusional. Sin embargo se han presentado problemas de incompatibilidad debido a la existencia de anticuerpos indetectables con las pruebas convencionales, por lo que es necesario realizar nuevos estudios de laboratorio que permitan establecer la presencia de antígenos que estimulen la activación del sistema inmune y formación de anticuerpos que producen reacciones transfusionales (Reverberi, 2008).

El antígeno D después de los antígenos A y B es el más importante en medicina transfusional debido a las severas reacciones hemolíticas que produce luego de una transfusión incompatible ya sea en un paciente o durante el embarazo (Gargiulo, 2005) (Dueñas, El Banco de Sangre, 2003) (Geoff D. , 2013) (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

Se ha determinado que existen dos tipos de antígenos D denominados D débil y parcial, diferenciándose entre sí por el número de sitios antigénicos o por la falta (mutación) de uno de ellos, estas características provocan un problema en la detección durante la tipificación sanguínea que va a estar influenciado por el tipo de reactivos que se utilicen, la fracción que se detecte y el tipo de antígeno D ya sea débil o parcial presente en el donante (Batista-González, 2004) (Geoff D. , 2013).

Se han clasificado diferentes fenotipos D parciales numerados como I,II,III,IV,V, y VI siendo este último considerado de significancia clínica por la aloinmunización que produce y su estrecha relación con enfermedad hemolítica del recién nacido y reacciones pos transfusionales graves (Geoff D. , 2013).

Por lo que la determinación del antígeno DVI constituye un importante hallazgo en donantes de sangre para evitar una aloinmunización innecesaria. Investigaciones previas recomiendan la tipificación del antígeno DVI, especialmente en recién nacidos, pacientes y mujeres embarazadas para evitar una aloinmunización, así en niños es recomendable

utilizar un anti-D que reaccione con DVI para de esta manera tratar a la madre inmediatamente en caso de ser positivo; caso contrario en pacientes y embarazadas se debe utilizar un reactivo que diferencia el DVI (+) y DVI (-); para elegir sangre compatible (Gargiulo, 2005) (Batista-González, 2004) (Buevas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

En Ecuador se desconoce la presencia del antígeno D parcial y D débil, por lo que se establece la necesidad de identificar y determinar la prevalencia del antígeno DVI en donantes de sangre, ya que permite alertar sobre la posibilidad de aloinmunización que tendrían estas personas al recibir sangre incompatible.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el año 1953, se describió el primer caso de aloinmunización anti-D en una persona considerada como Rh (D) positiva; desde entonces se reconoce que existen eritrocitos que carecen de los denominadas “*porciones del mosaico D*” o antígenos (Rivero, 2000). Por ende, a nivel de medicina transfusional y para evitar la enfermedad hemolítica del recién nacido se ha requerido una correcta tipificación del antígeno D, que evite las reacciones postransfusionales graves y anemia hemolítica del recién nacido, pues se ha determinado que una persona con antígeno D incompleto puede producir anticuerpos en la misma magnitud y agresividad que en una persona Rh(D) negativa (Dueñas, El Banco de Sangre, 2003) (Baptista-González H. , 2005) (Geoff D. , 2013).

El estudio realizado por Ulloa A, 2012 en el Hemocentro de Cruz Roja-Quito, detectó la presencia del 35,43% de aloanticuerpo anti-D en donantes de sangre, detectándose un total de 188 mujeres y 20 hombres aloinmunizados (Ulloa A. , 2009-2012), estos valores demuestran que existen aloinmunización del antígeno D pudiendo ser la causa la presencia de antígenos “D parciales” (Baptista-González H. , 2005).

Los estudios investigativos han determinado que existen fenotipos de D que fueron identificados con números romanos de acuerdo a su descubrimiento del I al VII (Connie M. Westhoff, 2010) (Geoff D. , 2013); de estos, los fenotipos DIV; DV y DVII expresan antígenos más inmunogénicos por lo que son detectados como Rh (D) positivos, mientras que el DVI es menos inmunogénico por lo que provoca errores en la detección durante la tipificación sanguínea. (Connie M. Westhoff, 2010).

La presencia del antígeno DVI en mujeres embarazadas es un factor de riesgo para desarrollar anticuerpos anti-D, por lo que se recomienda su diferenciación durante la tipificación sanguínea, es decir que pueda ser clasificado como DVI(-) ó DVI(+) mediante el uso de reactivos adecuados y así prevenir una aloinmunización; lo mismo ocurre en pacientes que van a recibir transfusiones sanguíneas por primera vez, siendo indispensable establecer la presencia y frecuencia de estos antígenos en donantes de sangre que eviten una aloinmunización y sobre todo una tipificación errada. Así, al tomar en consideración la detección del antígeno DVI al momento de una tipificación se disminuiría la probabilidad de aloinmunización (Gerald Sandler, 2012) (Geoff D. , 2013) .

Para la determinación del antígeno D se utilizan técnicas serológicas en tubo y en gel siendo las metodologías utilizadas a nivel de los diferentes Bancos de Sangres en Quito, útiles si se mantiene un estricto control de calidad y evaluación de los reactivos utilizados;

estudios han demostrado que la combinación de reactivos monoclonales duals (IgM&IgG) anti-D pueden identificar el 66% de variantes del antígeno "D" de acuerdo al grado de aglutinación, sin embargo al ser subjetiva la interpretación dificulta el detectar con exactitud el tipo de antígeno, poniéndose en evidencia las limitaciones de los reactivos comerciales. (Swati, Vasantha, & Kanjaksha, 2013) También se puede utilizar las técnicas moleculares, pero en Ecuador aún no existe esta metodología.

Es por esta razón que es importante la determinación de la frecuencia del antígeno D VI en donantes de sangre mediante la tecnología en gel que permite diferenciar su presencia o ausencia y por lo tanto proporcionará datos que alerten al sistema de sangre para implementar su determinación de forma rutinaria; cumpliendo así con una normativa de calidad relacionada con la buena práctica de Medicina Transfusional (Organización Panamericana de la Salud OPS, 1999).

Pregunta del problema: ¿Cuál es la frecuencia del antígeno D VI en donantes de sangre voluntarios que acuden al Hemocentro Nacional?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia del antígeno D parcial VI en donantes que acuden al Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana de julio 2014 a abril del 2015.

1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer la prevalencia del antígeno DVI en donantes que acuden al Hemocentro de Cruz Roja Ecuatoriana, mediante la técnica en gel durante los meses de julio 2014 a abril del 2015.
- Relacionar la frecuencia del antígeno DVI en donantes de acuerdo a la edad, género y procedencia durante los meses de julio 2014 a abril del 2015.
- Establecer la presencia de aloinmunización en los donantes que presenten el antígeno DVI positivo mediante la técnica en gel durante los meses de julio 2014 a abril del 2015.
- Determinar el fenotipo del Rh en los donantes que intervengan en el estudio mediante la técnica en tubo para la identificación de antígenos Cc,Ee, durante los meses de julio 2014 a abril del 2015.

1.3.3 Limitación del estudio

Una de las limitaciones del estudio constituye la falta de reactivos que permitan distinguir todas las variantes del antígeno D, por lo que solo podrá determinarse la presencia o ausencia del antígeno DVI, otra limitación constituye la escasa información en Ecuador de la prevalencia del antígeno D débil.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1.1 Antecedentes

En el año 2009, se inaugura el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en Quito, con el objetivo de proporcionar y facilitar diferentes componentes sanguíneos necesarios para una transfusión, requerida por hospitales y clínicas del país, siendo el cuarto país en Latinoamérica en contar con un propio Hemocentro después de Colombia, Brasil y Argentina (Cruz Roja Ecuatoriana, 2010). En el Hemocentro se recibe y procesa alrededor de 120.000 muestras de sangre, actualmente cuenta con todos los servicios y áreas específicas de trabajo, para garantizar la seguridad y veracidad de su trabajo. (Cruz Roja Ecuatoriana, 2010).

En el año 2012, en el Hemocentro se realiza una investigación retrospectiva de la presencia de aloanticuerpos en donantes de sangre determinándose que existe un 40% de anticuerpos anti-D especialmente en hombres y mujeres en edad fértil, sin embargo no se ha determinado la causa de esta inmunización estableciéndose la hipótesis de la existencia del antígeno D parcial en la población ecuatoriana (Ulloa, 2009 - 2012).

La investigación realizada por S. Gerald Sandler (2012), menciona que no solo las mujeres Rh (D) negativo deben ser tratadas para prevenir una enfermedad hemolítica del recién nacido, ya que en los últimos años se ha encontrado que alrededor del 0.2–1.0% de las mujeres pudieran haber heredado un D débil o un antígeno D parcial (S. Gerald Sandler, MD, y Jerome L. Gottschall, MD, 2012). En este estudio establecieron que si una mujer tuviese una variante D parcial, tendría un riesgo más alto de inducir la formación de aloanticuerpos anti-D; es decir, en mujeres que presenten un D parcial con el fenotipo DVI. (S. Gerald Sandler, MD, y Jerome L. Gottschall, MD, 2012).

Por otra parte se han detectado variantes del antígeno D en poblaciones como la europea en donde se observa la presencia del D VI en un 1%, otra variante detectada fue en personas de raza negra y relacionada a alelos aberrantes RHD (DAU-0 a DAU-4, Thr379met), observándose en estas poblaciones aloinmunización o formación de anti-D a pesar de ser considerados como Rh positivo. (Héctor, 2004) (Geoff D. , 2013).

Cuando se requiere tipificar a un paciente D parcial se debe considerar el uso de un reactivo adecuado, generalmente los reactivos policlonales y monoclonales producen aglutinación fuerte ocasionando una tipificación sanguínea errónea, es por esta razón que se debe utilizar reactivos en gel diseñados para identificar esta variante (DVI).(Begoña Laiz Marro, 2004) (Gargiulo, 2005) (Muñiz Díaz, 2010).

La introducción de la tecnología en gel ha facilitado la identificación de esta variante del antígeno D, y de esta manera evitar una inmunización en mujeres embarazadas que deben ser tipificadas correctamente para recibir un tratamiento oportuno y en el caso de pacientes multitransfundidos detectar si existe o no la variante DVI para evitar una aloinmunización, esto solo puede lograrse con tecnología sensible y específica (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

2.1.2 Sistema Sanguíneo Rh

En el año de 1940 Landsteiner y Weiner inyectaron eritrocitos del mono conocido como "Macacus rhesus" a conejos y cobayos logrando producir un anticuerpo que se caracterizaba por aglutinar al 85% de los eritrocitos humanos (Baptista-González H. , 2005). (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014). Este hallazgo permitió inicialmente diferenciar dos grupos sanguíneos aquellos que aglutinaban fueron denominados como Rh (D) positivos y los que no aglutinaban como Rh (D) negativos, posteriormente se determinó que esta reacción fue el resultado de la unión antígeno-anticuerpo, es decir la presencia o ausencia del antígeno D (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Actualmente se conoce que la clasificación del antígeno D es complicada ya que hasta el momento se han descrito aproximadamente 54 diferentes antígenos del sistema Rh (Geoff D. , 2013); adicionalmente en estudios moleculares se han detectado 170 alelos convirtiéndolo así en un sistema polimórfico y de gran importancia en medicina transfusional por la aloinmunización que origina y la producción de reacciones pos transfusionales. (Gerald Sandler, 2012).

Fisher propone la teoría de que el antígeno D proviene de un gen "D" que posee un alelo "d", dando lugar a la presencia de tres genotipos DD, Dd y dd; y por lo tanto una probabilidad de que el 42% de personas tendrán un genotipo homocigoto DD y el 58% restante presentará un genotipo heterocigoto Dd siendo esta última expresión importante

en mujeres que podrían desarrollar anticuerpos frente a un feto carente del antígeno D (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

Además del antígeno D se descubre la existencia de 4 antígenos denominados Cc/Ee los que han sido relacionados con la presencia de aloinmunización durante una transfusión sanguínea; en base a este descubrimiento a lo largo del tiempo se han creado varias nomenclaturas del sistema Rh, así Fisher hace referencia a una conjunción de letras (triada) (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014) (Geoff D. , 2013). Así a una persona Rh positivo se le identificaría mediante las siglas CDE Rh(+) y con las siglas cde Rh (-) si es tipificada como Rh negativo. (Dueñas, 2003).

En contraste en la nomenclatura propuesta por Weiner asigna una letra para cada haplotipo, utilizando la letra mayúscula “R” para los D positivo y “r” minúscula en los D negativos (Gargiulo, 2005) dando lugar a una variedad de combinaciones. (Tabla N°1-2)

Tabla 1: Nomenclatura de Fisher

Nomenclatura de Fisher	
	D
	C
	E
	D
	C
	E

Autor: Dueñas

Fuente: Medicina Transfusional y terapia celular.

Tabla 2: Nomenclatura de Weiner

Gen	Antígenos	Gen	Antígenos
Rh ⁰	Dce	rh	dce
Rh ¹	DCe	rh'	dCe
Rh ²	DcE	rh''	dcE
Rh ^z	DCE	rh ^y	Dce

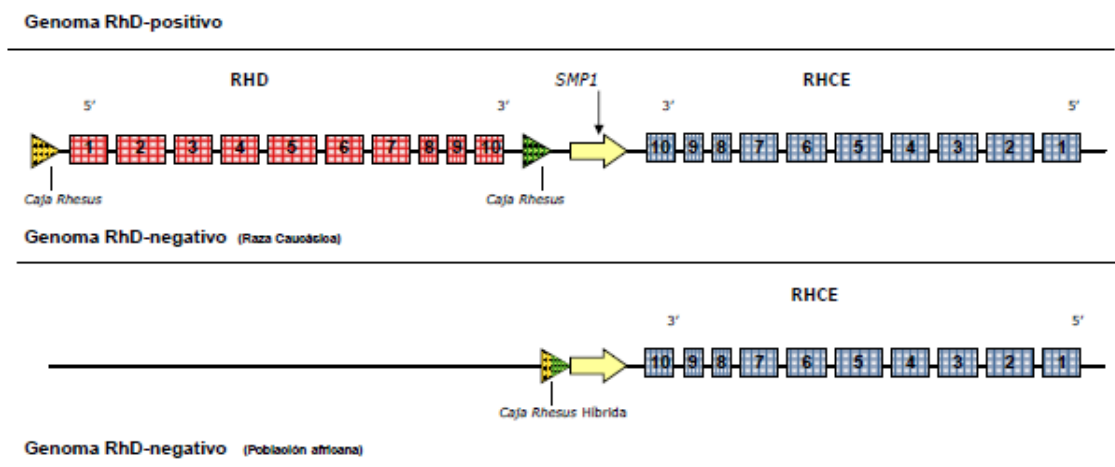
Autor: Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz & León de González

Fuente: Inmunología básica y aplicada

2.1.3 Genes y antígenos del Sistema Rh

El sistema Rh está compuesto por dos genes homólogos RHD, RHCE formado por 10 exones cada uno, ubicados en el cromosoma 1, con una extensión de 60kb; la delección del gen es el causante de la producción del fenotipo negativo (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012) (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014). (Geoff D. , 2013). (Gráfico N°1).

Gráfico N°1: Gen del sistema Rh



Autor: Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz & León de González

Fuente: Inmunología básica y aplicada

Las personas que presentan, fenotipos Rh(D) positivo pueden ser homocigotos o heterocigotos, mientras que las personas Rh(D) negativas son consideradas homocigotas; sin embargo existen individuos de poblaciones de raza negra que presentan una variante alélica o pseudogen RHD que por sus características no da lugar a la proteína Rhd y por ende al antígeno correspondiente (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

Luego del descubrimiento del locus Rh se han realizado varios estudios que han permitido determinar los diferentes fenotipos del antígeno D clasificándolos en D parcial y D débil (Muñiz Dias, 2010) (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

2.1.4 Antígenos del Sistema Rh

El sistema sanguíneo Rh posee cincuenta y cuatro antígenos enumerados RH1 a RH61 de los cuales siete fueron rechazados por la ISBT (por sus siglas en inglés, Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea) y cinco se expresan fenotípicamente "D, C, E, c, e". (Geoff D. , 2013). El antígeno D (RH1) es considerado de mayor frecuencia, se describe que está presente en un 94,2% de la población. (Ramiro Navarrete Coronado, Daniel Segura Ulate, 2012).

Los fenotipos posibles del sistema Rh-Hr que se pueden combinar para que una persona corresponda a un Rh positivo son: CCDEE, CCDEe, CCDee, CcDEE, CcDEe, CcDee, ccDEE, ccDEe y ccDee. (Ramiro Navarrete Coronado, Daniel Segura Ulate, 2012). De la misma manera se conoce que el porcentaje de Rh negativo fue 5,2% siendo un 5.1% de fenotipo ccdee y el porcentaje restante 0.1% de fenotipo ccdEe. (Ramiro Navarrete Coronado, Daniel Segura Ulate, 2012).

En relación a los antígenos "C" y "c", estos están presentes en diferentes porcentajes, así el antígeno "C" está en un 65%, mientras que la frecuencia de antígeno "c" es del 81% (Ramiro Navarrete Coronado, Daniel Segura Ulate, 2012).

El antígeno "c" se considera después del antígeno "D" el más inmunógeno constituyendo un riesgo en mujeres embarazadas de niños con antígeno "c" desencadenando una Enfermedad hemolítica del Recién Nacido. (Castillo Espinosa, Daniela, Vásquez Rojas, Marcela, 2012)

En cuanto a los antígenos "E" y "e" se determinó que el antígeno "E" presenta una frecuencia del 79% y el antígeno "e" un porcentaje del 35,5% (Castillo Espinosa, Daniela, Vásquez Rojas, Marcela, 2012). Estudios demostraron que el antígeno E era causante de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Finalmente se menciona la existencia de antígenos diferentes a los ya mencionados y estudiados; como el descubierto por Allen y Tippett en el año de 1958, el denominado antígeno "G", el cual está presente en todos los individuos con antígenos "D" y "C", de ahí la explicación de que las personas que aparentemente eran D negativas empiecen a fabricar un anticuerpo que reaccione frente a los eritrocitos C(+), D (-), puesto que los eritrocitos del donante inducirán la formación de anti-G y reaccionarán con todos los hematíes C(+). (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

2.1.5 Anticuerpos del Sistema Rh

Los anticuerpos del sistema Rh son producto de una respuesta inmune, generalmente son isotipos IgG (IgG1 y/o IgG3), y su presencia se evidencia en la prueba de antiglobulina (Coombs) o a través de la utilización de potenciadores (Baptista-González H. , 2005) (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Una de las características del anti-D es el efecto “dosis”, es decir que reaccionan fuertemente con células homocigotas que heterocigotas, es decir si las células comerciales utilizadas en las pruebas de laboratorio presenta un fenotipo homocigoto (DD) provocará una reacción inmune inmediata, mientras que si exhiben un fenotipo heterocigoto (Dd) la reacción será menos intensa. (Dueñas, El Banco de Sangre , 2003), dificultando la identificación de anticuerpos anti-D en mujeres Rh (d) negativas. (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

Esta característica lo convierte en un anticuerpo de gran interés clínico por la capacidad de destrucción inmune que presenta frente a hematíes incompatibles, como ocurre en casos feto-maternos, especialmente cuando el feto presenta un fenotipo homocigoto (DD) (Cotorruelo, Biondi, Garcia Borrás, Racca, Di Monaco, & Racca, 2006).

La sola exposición de una pequeña cantidad de sangre D positiva no permite que el anticuerpo sea detectado en las pruebas de laboratorio, esto ocurre especialmente durante el primer embarazo, sin embargo en una segunda gestación con exposición nuevamente a antígenos incompatibles favorece a una rápida e intensa respuesta inmune (Cotorruelo, Biondi, Garcia Borrás, Racca, Di Monaco, & Racca, 2006) (Geoff D. , 2013). Por lo que este anticuerpo es considerado el causante de la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN). (Hassan, Mohd Noor, Johan Noor, Sukri, & Mustafa, 2014)

Se han determinado la presencia de otros anticuerpos anti-c y anti-E. El anticuerpo anti-c se origina de manera inmune y puede ser el causante de Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido y Eritroblastosis Fetal. El estudio realizado por Hassan, determinó que en mujeres Rh(D) positivas carentes del antígeno c y/o E desarrollaban el correspondiente anticuerpo ante embarazos incompatibles, sin embargo se demostró que el anti-E es menos inmunógeno por ocasionar un menor daño al recién nacido. (Hassan, Mohd Noor, Johan Noor, Sukri, & Mustafa, 2014). (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

2.1.6 Tipos de antígenos del Sistema Rh

El primer antígeno del sistema Rh descubierto fue el D (Rh1), a partir de este descubrimiento se reconocen otros tipos de antígenos D, a pesar de que el 85% de las personas son D (Rh) existen variantes de D, las que se caracterizan por presentar resultados diferentes durante la tipificación sanguínea (Buevas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

La ausencia del antígeno D es característica de las personas con fenotipo D (negativo), investigaciones demostraron que el antígeno D es un mosaico de varios epitopes que dan lugar a diferencias cuantitativas o cualitativas dando lugar a los fenotipos D débil y D parciales (Geoff D. , 2013).

Otros antígenos del sistema Rh son los denominados C y E que provienen del gen RHCE dando lugar a cuatro expresiones fenotípicas RHce, RHCe, RHCE y RHcE (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

2.1.6.1 Antígeno D débil

Este tipo de antígeno se caracteriza por poseer menor número de sitios antigénicos, por lo que se trata de una diferencia cuantitativa frente al antígeno D fuerte. Este antígeno es de alta importancia en banco de sangre puesto que por su forma débil resulta difícil ser identificado, se requiere de reactivos policlonales y monoclonales para observar su reactividad (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Sin embargo presenta una actividad antigénica capaz de producir una inmunización en una persona que sea de tipo Rh D (-). (Ramiro Navarrete Coronado, Daniel Segura Ulate, 2012) (Buevas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014) Así, si una persona que es Rh D (-) recibe una transfusión sanguínea de una persona con un antígeno D (débil), el resultado será una reacción hemolítica fatal.

La importancia también radica en el área obstétrico debido a que si una madre posee el fenotipo D débil y fue clasificada como Rh D (-) no necesitará de la vacuna de globulina anti-Rh, ocasionando una producción de anticuerpos durante el primer embarazo; en un segundo embarazo se producirá una severa enfermedad hemolítica del recién nacido (Ramiro Navarrete Coronado, Daniel Segura Ulate, 2012) (Buevas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014)..

2.1.6.2 Antígeno D parcial.

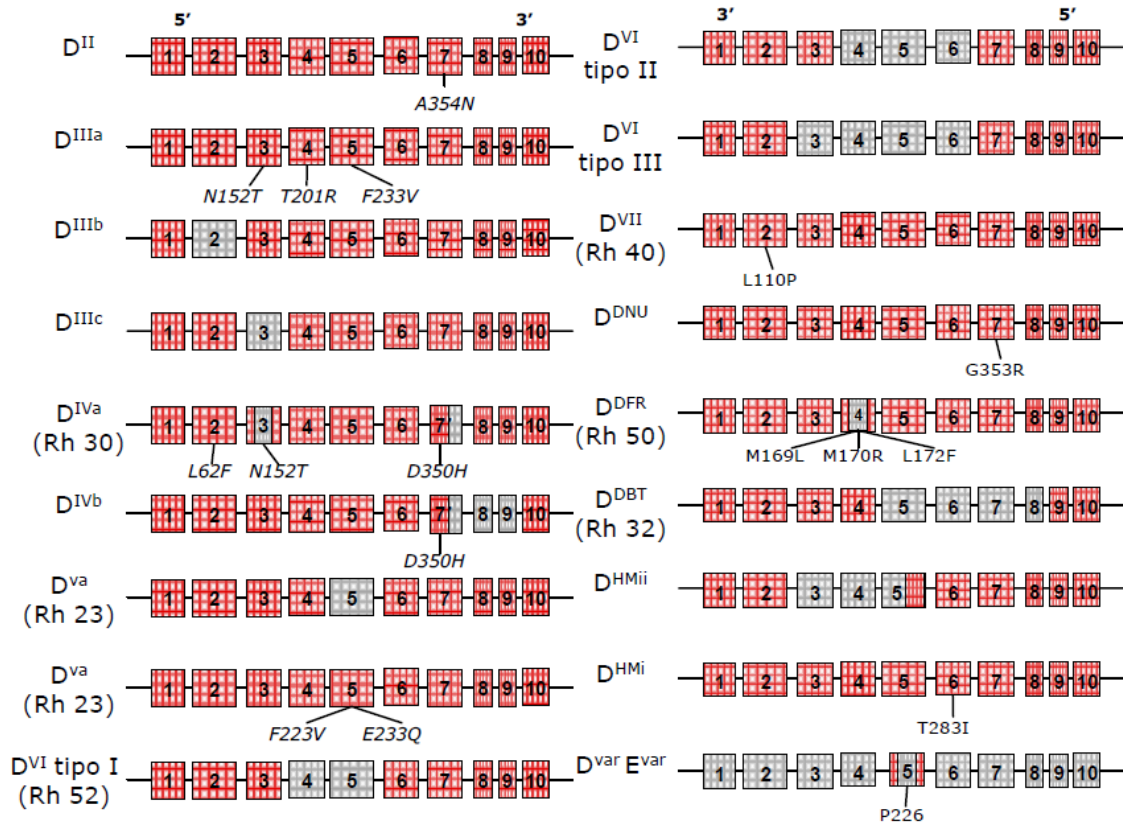
Las personas que poseen un antígeno D parcial se caracterizan por la carencia de un fragmento de la proteína, sin embargo reacciona fuertemente con el antisuero comercial anti-D y es considerado como positivo, pudiendo desencadenar la formación de un anticuerpo anti-D (Flegel W, 2002;)en el momento de recibir una transfusión sanguínea de una persona con antígeno Rh(D) completo (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

El antígeno D parcial se encuentra formado por nueve epítopes y si alguno de estos epítopes no se sintetiza la molécula que se expresará en la membrana del hematíe es diferente y en ocasiones débil, por lo que las personas que han perdido alguna parte del epítope pueden generar aloanticuerpos anti-D que no reaccionarán con sus propias células. (Dueñas, El Banco de Sangre, 2003) (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

Durante mucho tiempo se creía que la falta de un fragmento producía este tipo de antígeno, sin embargo luego del descubrimiento de las bases moleculares se ha determinado que puede deberse a mutaciones puntuales o dispersas en segmentos de la proteína (Flegel W, 2002;).

Estos estudios también han identificado que las variantes DII, DVII y DNB son fenotipos debidos a mutaciones puntuales y los DIIIa, DII tipo IV, DIVa y Dar a mutaciones dispersas, generando una variedad de tipos de D parcial. (Gráfico N°2).

Gráfico N°2: Tipos de D parcial determinados por análisis molecular



Autor: Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz & León de González

Fuente: Inmunología básica y aplicada

2.1.6.2.1 Clasificación del D parcial.

La clasificación del antígeno D parcial se basó en el comportamiento aglutinante que se observó en los hematíes al ser expuestos a sueros de personas que eran D-negativos (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

D parcial I.- Se puede evidenciar que se trata de una forma transitoria de antígeno D, presente solo en raza blanca, este grupo va a reaccionar con todos los sueros anti-D, y no van a reaccionar con su propio suero, el anti-D se presenta de una manera muy débil (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014)

D parcial II.- Esta categoría no fue descrita puesto que después de realizar los estudios no se obtuvo suero para poder concluirlo por ser una variante muy rara (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

D parcial III a, b, c.- No pueden diferenciarse puesto que los reactivos comerciales de origen monoclonal, no son de utilidad para la diferenciación entre un D parcial y un D normal. La mayoría de personas pertenecientes a este grupo son de raza negra (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014)

D parcial IV a, b, c.- De forma similar que la categoría III no se pudo diferenciar de un D normal, se presenta preferentemente en raza negra.

D parcial V a, b, c.- Los reactivos de uso comercial de origen monoclonal, no reconocieron a la categoría V como variante del antígeno D, los hematíes de las personas que son de esta categoría son D positivo.

D parcial VI.- La categoría VI del antígeno parcial VI carece de la mayoría de los epítopes del antígeno D. Según estudios realizados un aproximado del 0,002 % de la raza blanca pertenecen a este grupo. (Dueñas, El Banco de Sangre , 2003) El grupo seis va a reaccionar con todos los sueros anti-D normales.

Por consiguiente si un sujeto es Rh D negativo va a reaccionar frente a las categorías I y III, y la gran mayoría van a reaccionar frente a las categorías IV y V. Por otro lado los sujetos generadores de su propio anti- D van a pertenecer al grupo VI, de ahí la importancia de la identificación del tipo de antígeno D, puesto que esto ayudará a evitar una posible enfermedad hemolítica. En mujeres embarazadas Rh(D) positivas que generan un anti-D, generalmente presentan un fenotipo perteneciente al grupo VI (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

2.1.6.3 Características de los otros antígenos D

Se han identificado antígenos compuestos dentro del sistema Rh como: ce(RH6), Ce(RH7), cE(RH27), CE(RH22) y G(RH12).

- a) ce (RH6) denominado también antígeno fse expresa cuando los antígeno c y e se encuentran en una misma proteína (DCe/ce ó Dce/Dce), y no se expresará cuando c y e están sobre proteínas separadas (DCe/DcE).

- b) Ce (RH7) de igual manera solo se expresará cuando los antígenos C y e están en la misma proteína (DCe/ce).
- c) cE(RH27) es poco común, y no se expresará cuando c y E están en posiciones separadas.
- d) CE (RH22) este antígeno ha sido reconocido por la presencia de anticuerpos anti-CE de forma natural.
- e) G(RH12) el anti-G es identificado en sueros que contiene anti-D y anti-C, su importancia radica en que generalmente no es identificado en suero de mujeres con enfermedad hemolítica de recién nacido no identificado.
- f) C^w (RH8), C^x (RH9), son antígenos de rara frecuencia, muy raros su incidencia es variable generalmente entre 0,1 al 3%. (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

2.1.7 Fenotipos del sistema Rh

Fenotipo Rh-deficitarios-Rh_{null}: son fenotipos raros y su característica principal es la ausencia de antígenos en la membrana de los eritrocitos, las personas portadores de este fenotipo producen un anticuerpo denominado anti-Rh₂₉, el que reacciona con todos los eritrocitos, excepto con los del mismo fenotipo (Geoff D. , 2013).

Las células de estos individuos son anómalas, no funcionales, por lo que los portadores de este fenotipo siempre presentan anemia hemolítica (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

Fenotipo Rhmod: este fenotipo puede ser confundido con el Rh_{null}, si se detecta con pruebas serológicas, se caracteriza porque su presencia es identificada en padres que mantienen consanguinidad. En el laboratorio se deben realizar pruebas de absorción o elución para su identificación (Geoff D. , 2013).

Fenotipo D elevado: este fenotipo es característico en deleciones que producen la sobreexpresión del antígeno D y no así de los antígenos C y E, es diferente al D parcial y ocurre como resultado del reemplazo de RHCE por RHD (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Fenotipo DEL: los individuos portadores de este fenotipo expresan una cantidad mínima del antígeno D en sus eritrocitos, la que no es detectada con los reactivos convencionales, por lo que son identificados como Rh D negativos (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014). Este fenotipo está fuertemente ligado con la expresión CE siendo común en individuos asiáticos.

Fenotipo RHD Ψ : es común en individuos Rh D(negativos) que conservan secuencias propias del gen RHD, esto ocasiona resultados discrepantes entre el fenotipo y el genotipo. A esta variante alélica se conoce como pseudogen RHD el que está presente en personas de raza negra (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

2.2 Métodos de detección.

La detección del antígeno D se inició mediante el uso de anticuerpos policlonales procedentes de mujeres sensibilizadas durante un embarazo, los anticuerpos utilizados fueron de tipo IgG, suspendidos en soluciones proteínicas que potenciaban la reacción y de esa manera reconocían varios epítopes del antígeno, pero ocasionaban resultados falsos positivos (Westhoff, Vege, Hips Hue-Roye, Copeland, Velliquette, & Reid, 2013) (Daniels, 2013).

Posteriormente, se utilizó reactivos constituidos por anticuerpos monoclonales los que evitaron la presencia de falsas aglutinaciones, su especificidad se debía a que sus clones reaccionaban con un solo epítopo (Benalcazar & Chiriboga, 2013); a pesar de ello, esto no garantizaba la detección de todas las variantes del antígeno D (Westhoff, Vege, Hips Hue-Roye, Copeland, Velliquette, & Reid, 2013) (Daniels, 2013).

Es por esta razón, que los bancos de sangre utilizan la estrategia de aplicar varios protocolos de detección del antígeno D dependiendo de la población a ser tipificada así:

Pacientes y gestantes la detección de este antígeno se realizaba mediante el uso de reactivos monoclonales tipo IgM, que aglutinan a todos los hematíes excepto a la variante DVI (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014). Con esta estrategia esta población se beneficiaría del uso de sangre Rh D negativa evitando inmunizaciones con graves consecuencias (Von Zabern, Wagner, Moulds, Moulds, & Flegel, 2013).

Actualmente, el uso de tarjetas de gel para tipificación sanguínea ha complicado la determinación de variantes del antígeno D, debido a su composición monoclonal y dual

(IgM e IgG); por lo que se requiere del uso de tarjetas que determinen la presencia del antígeno DVI (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

Ante esta situación los laboratorios han implementado estrategias que le permitan reconocer la presencia de D débiles y parciales, mediante la fenotipificación de los antígenos del sistema Rh (C,E,c,e), así un D débil con fenotipo CDe(R1) los asocian a los D débil tipo 1 y 3; el fenotipo cDE (R2) con las variantes D débil tipo 2 y 5; y el fenotipo cDe(R0) se asocia al fenotipo D débil tipo 4 (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014) (Geoff D. , 2013).

Por último, se ha implementado la determinación molecular de las variantes del antígeno D como estrategia de tipificación para algunas poblaciones donde se conoce de la presencia de individuos susceptibles de ser inmunizados, al ser catalogados como Rh D positivos sin serlo como es el caso del RHD Ψ y DEL (Connie M. Westhoff, 2010).

Donantes: una de las estrategias fue el uso de reactivos monoclonales que detecten todas las variantes de D, para ser catalogados como D positivos de forma inequívoca (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

Sin embargo resulta imposible obtener un reactivo de esas características, por lo que actualmente se utilizan tarjetas de Gel, estas determinan la mayor cantidad de epitopes del antígeno D (Benalcazar & Chiriboga, 2013).

A pesar de ello, varios estudios han determinado la existencia de pacientes que han sido inmunizados al recibir sangre con variantes de D como el DVI ó DEL, tipificadas como D positivas (Hassan, Mohd Noor, Johan Noor, Sukri, & Mustafa, 2014). Mientras las investigaciones avanzan en relación a estas estrategias, se recomienda que las unidades sanguíneas con fenotipo C y E no sean utilizadas en pacientes Rh D negativo, fenotipo cde; por la posibilidad de que se trate de variantes de D (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

2.2.1 Discrepancias durante la tipificación del antígeno D.

Durante la tipificación sanguínea en donantes o pacientes se presentan discrepancias de resultados, en el caso de utilizar reactivos policlonales IgG se recomienda que todas las muestras con resultados D negativos, sean sometidas a la prueba de antiglobulina indirecta o Coombs que determine la presencia o ausencia del antígeno D débil

(Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012). También se recomienda la determinación del fenotipo RHCE por ser una opción para alertar la presencia de posibles variantes del antígeno D (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014).

En ciertas poblaciones como las de raza negra y asiática es necesaria la realización de pruebas moleculares que identifiquen el tipo de antígeno D y de esta manera la resolución de la discrepancia detectada (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014). Adicionalmente, debe mantenerse la clasificación de que si un individuo es catalogado como Rh D débil al ser donante, se considere como Rh D negativo al convertirse en paciente y necesitar de una transfusión sanguínea; de igual manera mantener este criterio en mujeres gestantes (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Una consideración importante entre la diferencia de un fenotipo D débil y parcial constituye la producción del anticuerpo anti-D. Los individuos portadores del antígeno débil D 1,2 y 3 presentan poca probabilidad de desarrollar el anticuerpo (anti-D), por lo que pueden recibir sangre Rh D positiva. En contraste, los pacientes con fenotipo D parcial por presentar alteración en uno de sus epitopes, se encuentran en un alto riesgo de formar anti-D, por lo que deben recibir sangre tipificada como Rh D negativa (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Los glóbulos rojos DIIIa comunes en la raza negra, son tipificados comúnmente como D positivos y únicamente se los identifica cuando han desarrollado reacciones post transfusionales debidas a la producción de anticuerpos anti-D; de igual manera ocurre con el antígeno parcial DVI el cuál carece de varios epitopes, por lo que es uno de los más antigénicos y causante de reacciones hemolíticas y la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Bajo estas consideraciones los bancos de sangre deben crear sus algoritmos de detección, por lo que las normativas de tipificación en los bancos de sangre en cada país son establecidas luego de establecer la prevalencia de las variantes del antígeno D en sus respectivas poblaciones. Así por ejemplo: la delección del aplotipo RHD es la causa más común de D parcial en africanos, presentando el 67% de estos individuos el pseudogen RHD Ψ , la frecuencia de D parcial varía de un grupo étnico a otro, en la población caucásica la frecuencia de variante DVI es de 1:6.2000; mientras que en la

raza negra la frecuencia de DIIIa, DIIIb es relativamente alto, en Europa la frecuencia de DVI tipo III es del 40% (Kabiri, Benajiba, Hajjout, Dakka, & Bellaoui, 2014).

Aunque en los bancos de sangre es muy difícil diferenciar entre D parcial y débil por la falta de reactivos de identificación, una de las estrategias es la investigación de la presencia de variantes del antígeno D (Daniels, 2013).

2.2.2 Reacción antígeno-anticuerpo en tubo

La técnica en tubo es considerada como un prueba de alta especificidad cuando se trata de determinar la presencia de antígenos en Banco de Sangre (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012). En el caso de la determinación del factor Rh esta técnica ha sido utilizado por mucho tiempo tanto en bancos de sangre como laboratorios privados, sin embargo la sensibilidad y especificidad va a depender del tipo de reactivo que sea utilizado (Benalcazar L. , 2013).

Por esta razón los reactivos utilizados para la determinación de grupo sanguíneo y factor Rh deben ser evaluados bajo parámetros establecidos por la Asociación Americana de Bancos de Sangre, siendo la avidéz, potencia, afinidad y especificidad los más relevantes (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012) (Benalcazar L. , 2013).

Adicionalmente, debe tomarse en cuenta que un resultado va a variar si se presenta interferencias en la muestra, parte de las limitaciones puede deberse a una posible contaminación ya sea por bacterias o sustancias química de las muestras, por el material en mal estado. (Silberman, 2007), por lo que se debe mantener un protocolo de trabajo establecido y un control de calidad adecuado.

A pesar de seguir el proceso de una forma adecuada en la determinación del antígeno "D" en la técnica en tubo, es difícil establecer si se trata de un D parcial debido a que la lectura puede ser subjetiva (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

2.2.3 Reacción de aglutinación en gel

La determinación de antígenos D mediante la técnica de gel constituye una prueba que aporta mayor sensibilidad y especificidad, esta prueba se basa en la utilización de tarjetas que contienen anticuerpos específicos que permiten la identificación de un tipo específico

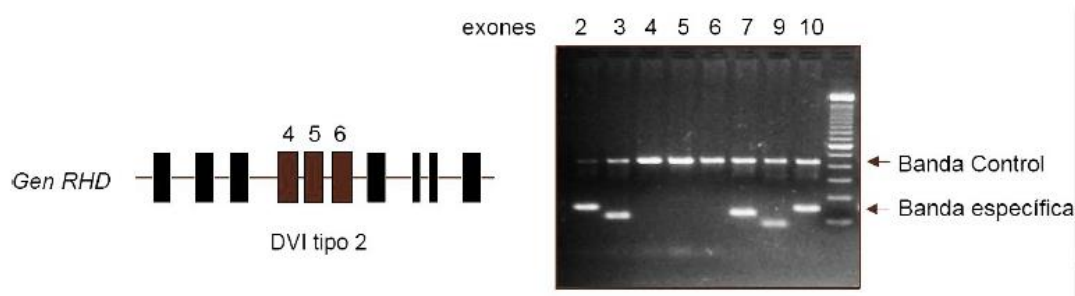
de antígenos D; sin embargo se debe tener en cuenta las limitaciones de la prueba y las posibles interferencias que puedan presentarse tanto en el reactivo como en la muestra (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

2.2.4 Métodos moleculares

Debido al polimorfismo del sistema Rh es necesario incluir la determinación molecular, estudios han demostrado que el uso de pruebas moleculares permiten resolver las discrepancias (Abdelrazik, Elshafie, & Ezzat Ahmed, 2013). Por lo tanto, la introducción de las técnicas moleculares para identificar grupos sanguíneos es útil en el estudio de muestras (donantes o pacientes) con problemas de identificación de antígenos sanguíneos.

Uno de los test utilizados en el caso del sistema Rh es la genotipificación especialmente en aquellos individuos que presentan discrepancias serológicas, se han diseñado un sinnúmero de métodos considerando la homología existente entre los genes RHD y RHCE, uno de estos métodos es la reacción de multiplex PCR-SSP (Muñiz Dias, 2010).(Gráfico N°3).

Gráfico N°3. Determinación del genotipo RHD mediante PCR-SSP RHD específica



Autor: Muñiz Días, Eduardo

Fuente: Grupos Sanguíneos Eritrocitarios

Otra aplicación de las técnicas moleculares es la determinación del grupo sanguíneo del feto en una madre sensibilizada, y de esta manera evitar un monitoreo más agresivo, actualmente las pruebas disponibles son para detección del sistemas RHD, RHCE, Kell, Jk y Fy en líquido amniótico o de vellosidades coriales (Muñiz Dias, 2010).

También es posible determinar la cigocidad del padre, especialmente en casos en que existe una diferencia de grupos sanguíneos con la madre o está ya ha sido inmunizada posteriormente, la técnica más utilizada es “PCR fluorescente cuantitativa” cuya diferencia es el marcaje fluorescente (Buelvas Cortés, Muñoz-Díaz, & León de González, 2014).

2.3 Reacciones transfusionales por anticuerpos anti-D parcial.

2.3.1 Reacciones transfusionales inmediatas

Los antígenos Rh presentan una fuerte estimulación para provocar una respuesta inmunológica, los cuales al enfrentarse a un antígeno diferente al que posee el receptor este será estimulado y desarrollara una respuesta inmune y por consiguiente la producción de anticuerpos. (Westhoff, Vege, Hips Hue-Roye, Copeland, Velliquette, & Reid, 2013)

Las reacciones inmediatas a causa del anti-D parcial, se pueden dar básicamente por la presencia de anticuerpos anti-D parcial, esto quiere decir que se presentaría una hemólisis por incompatibilidad, la presencia de fiebre, puede presentarse infiltrados pulmonares afectar a los demás órganos, shock anafiláctico, urticaria. (Buelvas Cortés, Muñoz-Díaz, & León de González, 2014).

2.3.2 Reacción hemolítica del recién nacido

La Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido, se da básicamente por una incompatibilidad de grupo sanguíneo de la madre con el bebe, dicha incompatibilidad feto materna desarrolla una respuesta o reacción respuesta inmunitaria en la madre, esto se va a dar por el paso de anticuerpos de la clase IgG a través de la placenta y la subsiguiente unión de los anticuerpos a la membrana del hematíe. (Buelvas Cortés, Muñoz-Díaz, & León de González, 2014)

Se puede referir que este tipo de enfermedad se la relaciona principalmente con el antígeno D del sistema Rh. Puesto que los anticuerpos que se han estudiado y son los relacionados y se asocian con la enfermedad hemolítica del recién nacido en estado

moderada y grave son principalmente los del sistema Rh. (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014)

El anti-D, es considerado 50 veces más inmunogénico que otros anticuerpos, en segundo lugar de estudio y causante de reacciones transfusionales al anti-c. (A. Rodríguez de la Rúa, D. Hernandez Maraver, J. Gracia Colldeforns, 2004)

La reacción por anticuerpos anti- D es la hemólisis de los hematíes fetales que se encontraran recubiertos de anticuerpos. Lo que posteriormente causa anemia hemolítica, y por consiguiente una disminución en la capacidad de los hematíes para transportar oxígeno, se producirá una hiperplasia intramedular de la serie roja y la liberación de formas inmaduras a sangre periférica. (A. Rodríguez de la Rúa, D. Hernandez Maraver, J. Gracia Colldeforns, 2004).

2.4 MARCO CONCEPTUAL

Antígenos: Son sustancias extrañas al cuerpo que son capaces de producir o generar una respuesta inmunológica. (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014)

Antígeno D: Antígeno que es parte del sistema Rh, sustancia que se encuentra en la membrana de los glóbulos rojos (Geoff D. , 2013).

Antígeno D Parcial: Antígeno que no contiene completamente el complejo anti – D (Geoff D. , 2013).

Antígeno D parcial VI: Sub tipo del antígeno D parcial considerado el que más reacciona con los anti- D, antígeno que carece de la mayoría de sus epítopes (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Anticuerpos: Inmunoglobulinas que se producen en el organismo por las células plasmáticas tras una exposición a un antígeno (Geoff D. , 2013)

Alloinmunización: Es la incompatibilidad dada por el sistema Rh y que esto ocasionara una respuesta inmune que va a atacar a su propio organismo (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014)

Donantes: Persona que da sangre para ser utilizada por otra en caso de ser necesario (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012)

Epítopes: Sitios donde se va a producir la unión del antígeno con el anticuerpo. (Geoff D. , 2013)

Especificidad: Es la capacidad de un anticuerpo para poder reaccionar solo con un antígeno específico (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012)

Sensibilidad: Es la determinación de la mínima parte de una partícula y la efectividad de un método. (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012)

Sensibilización: Producción de anticuerpos en una persona que es D negativa (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012)

Sistema Rh: Es una forma de clasificar los hematíes de acuerdo con sus componentes en la membrana celular, (pueden o no presentar el antígeno D) (Geoff D. , 2013).

CAPÍTULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1.1 Tipo de Estudio

Es de tipo descriptivo – transversal, puesto que se va a realizar una descripción de la presencia o ausencia del antígeno D parcial VI, en donantes en el Hemocentro Nacional de la Cruz Roja en la ciudad de Quito, para establecer la proporción del mismo con una aplicación de medición de tipo transversal porque se lleva a cabo en un tiempo determinado período comprendido en los años 2014 – 2015.

3.1.1.2 Tipo de Muestreo

Se realizará un muestreo aleatorio simple.

3.1.1.3 Tamaño de Muestra

Se utilizó la fórmula de población finita con un grado de confianza del 95% y un error alfa del 5%, tomando en cuenta que al Hemocentro de la Cruz Roja ecuatoriana acuden 120000 donantes al año.

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

$$n = \frac{120.000 \times 1,96^2 \times 0,50 \times (1 - 0,50)}{0.05^2 * (120000 - 1) + 1.96^2 * 0.50 * 0.50}$$

$$n = \frac{115248}{300,9579}$$

$$n = 382,93$$

Dónde:

n : Tamaño de muestra

N : Población (total de donantes en un año 120.000).

Z²_α: 1,96² (Nivel de confianza del 95%)

p : Proporción esperada al no conocer la prevalencia de antígenos D parciales se establece el valor de 0,5.

q : 1 – p

d : Error alfa del 5%.

Decisión: Con un nivel de confianza del 95% y un error alfa del 5% se estableció un tamaño muestral de 383 donantes con resultados que exhiben una reacción débil al ser tipificados.

3.1.1.4 Criterios de Inclusión

Donantes de sangre detectados como Rh débiles, donantes tipificados como Rh (d) negativos con fenotipo Ce y cE y aquellas muestras que presenten discrepancia en la detección del anti-D en placa mediante la técnica por hemoaglutinación directa y la utilización de la técnica hemoaglutinación en el equipo NEO GALILEO.

3.1.1.5 Criterios de Exclusión

Donantes de sangre detectados como Rh fuertes, es decir que presentes una reacción de aglutinación superior a 3+. Y todos los donantes tipificados como Rh (d) negativos con fenotipo cde.

3.1.1.6 Control de Calidad

Para la metodología en gel, se inspeccionó la integridad de este en cada una de las tarjetas mediante centrifugación previa a la realización de las pruebas. El gel debe estar intacto sin burbujas, ni cambio de color ni signos de evaporación (BIORAD). Además se utilizó como control positivo Células Rh (DVI) de donante confirmado, esta se colocaron en cada tarjeta de gel para confirmar su funcionamiento.

Para la determinación de anticuerpos anti-D se utilizaron tarjetas de gel con antiglobulina humana (Coombs), para su control se utilizó células sensibilizadas comerciales denominadas control Coombs siguiendo el protocolo del Manual AABB 2012 (Anexo 1).

3.1.1.7 Análisis Estadístico

Se utilizó una estadística descriptiva analizada en el programa SPSS V.20 ya que el estudio pretende identificar la frecuencia del antígeno DVI no busca probar hipótesis, a pesar de ello se relacionaron las variables independientes con la presencia de este antígeno por lo que se utilizó Chi-cuadrado.

3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.2.1 Variable Dependiente: Determinación de antígeno D parcial VI

3.2.2 Variable Independiente: Donantes de sangre que acuden al Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana de acuerdo a los criterios de inclusión.

Variable dependiente	Definición	Dimensiones	Indicadores	Instrumento de Medida
Determinación del antígeno D parcial VI	Carencia de un fragmento de la proteína La categoría VI del antígeno parcial VI carece de la mayoría de los epítopes del antígeno D.	Cualitativo	Positivo Negativo	Pruebas de laboratorio técnica en gel. Reporte de los resultados
Variable independiente	Definición	Dimensiones	Indicadores	Instrumento de Medida
Donantes voluntarias de sangre	Persona que voluntariamente y después de cumplir con los requisitos legales accede a entregar su sangre.	Cualitativo	Total de donantes aceptados	Requisitos para la aceptación
Aglutinación en determinación del factor Rh	Reacción antígeno-anticuerpos, en la que el antígeno D presente en los glóbulos rojos es detectado por el anti-D de reactivo monoclonal IgM o dual "IgG/IgM".	Semi-cuantitativo	Observación del botón resultado de la aglutinación: (+): 10% aglutinados (++): 30% aglutinados (+++): 80% aglutinados (++++): 100% aglutinados (-): ausencia de aglutinación	Observación Clasificación de aglutinación de acuerdo al Manual Técnico AABB 2012. Anexo N°5
Determinación del Factor Rh	Reacción antígeno-anticuerpo entre el antígeno D y anticuerpo anti-D	Cualitativo	Aglutinación=Positivo No Aglutinación=Negativo	Observación tomando en consideración las normas del Manual Técnico de la AABB 2012
Determinación del fenotipo CDE	El sistema Rh se encuentra constituido por fenotipos clasificados como C,c,E,e que deben ser determinados mediante aglutinación con los anticuerpos correspondientes.	Cualitativo	Aglutinación=Positivo No Aglutinación=Negativo	Observación tomando en consideración las normas del Manual Técnico de la AABB 2012. Anexo N°6
Género	Se refiere a las diferencias biológicas naturales entre hombres y mujeres.	Cualitativo	Femenino Masculino	Registro del donante
Edad	Número de años que tiene una persona contados desde su nacimiento.	Cuantitativo	Años cumplidos	Registro del donante
Procedencia	Lugar de donde viene la persona	Cualitativo	Total de donantes del Hemocentro Nacional	Formulario del registro del donante

3.3 MATERIALES Y PROCESO

3.3.1 Materiales

- ✓ Tubos de vidrio 12+75cm
- ✓ Puntas de plástico 10-100ul
- ✓ Gradillas para Tarjetas en Gel
- ✓ Pipeta automática de 10-100ul
- ✓ Centrifuga automatizada para tarjetas DG Gel

3.3.2 Reactivos

- ✓ Diluyente de LISS
- ✓ Tarjetas DG Gel determinación ABO-D-DVI(+), ABO-D-DVI(-). Para cuatro pacientes.
- ✓ Células panel Set ID-DiaPanel 4516174.
- ✓ Reactivos para fenotipo de Rh (anti-C, anti-c, anti-E, anti-e).

3.3.3 Procedimiento

3.3.3.1 Fase Uno

Consentimiento Informado: Todos los donantes que acuden a los bancos de sangre firman un consentimiento para el uso de la sangre y la realización de las pruebas que se requieran antes del uso de los componentes sanguíneos, además no se mantuvo contacto directo con el donante ni sus identificaciones, se trabajó con los códigos asignados por el Hemocentro de tal manera que está protegida la integridad y confidencialidad de todos los participantes en el estudio.

3.3.3.2 Fase Dos

Elección del período de recolección de muestras: Se acudió durante los meses de Junio 2014 a Mayo del 2015.

Elección de las pintas de sangre: Se realizó una elección aleatoria por día de las pintas que ingresan al Hemocentro tanto de la ciudad de Quito como de las otras provincias y únicamente aquellas que sean tipificadas como Rh(D) débiles y que correspondan al orden de ingreso elegido serán tipificadas para DVI.

La elección aleatoria que se realizó por semana consiste en colocar en la columna B2 el total del n calculado y en la Columna C1 la fórmula $=1+ENTERO(\$B\$2*ALEATORIO())$ (Arias, 2006), de esa manera se escogieron la pintas de sangre.(Anexo 2).

3.3.3.3 Fase Tres.

Recolección de muestras: Las pintas elegidas cumplieron las siguientes características: Integridad es decir sin roturas visibles en las mangueras, rodilladas de tal manera que los fragmentos de las mangueras no posean microcoágulos que impidan una correcta dilución de los glóbulos rojos.

Rotulación: en el cuaderno de laboratorio enumerado se copiaron los códigos de cada pinta y el número de cada manguera de tal manera que no existan errores de tipificación por mal rotulado.

3.3.3.4 Fase Cuatro

Preparación de las muestras

Dilución: Preparación de una suspensión de hematíes al 5% en DG Gel Solución o Solución de LISS (50 μ l de fragmento de manguera obtenido del concentrado de hematíes en 1 ml de DG Gel Sol).

Realización del Test: Añadir en cada uno de los microtubos de la tarjeta de DG GEL indicados, 50 μ l de suspensión de hematíes al 5%.

Centrifugar en centrífuga para tarjetas DG Gel por 15 minutos a 1500 revoluciones por minuto.

Lectura de resultados: se basa en el principio de reacción antígeno-anticuerpo cuando existe unión es decir aglutinación se forman aglutinatos grandes que no pueden atravesar el gel por lo que permanecen en la superficie considerándose un resultado positivo,

mientras que los glóbulos rojos que no han aglutinado atraviesan los poros del gel y van al fondo siendo esto característico de un resultado negativo (AABB, 2012). (Anexo 3).

3.3.3.5 Fase Cinco

Determinación de anticuerpos irregulares: a todos los donantes que presenten el antígeno DVI a través de 11 células panel siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial BIORAD.(Anexo 4).

Determinación de fenotipo Rh: También se realizará a los pacientes que presenten el antígeno DVI el fenotipo Rh (C,c,E,e) siguiendo el protocolo en tubo descrito en AABB, 2012 (Anexo 6).

3.3.3.6 Fase Seis

Base de Datos: se creó una base de datos en Excell con todos los reportes obtenidos y codificados de tal manera que fueron fácilmente exportados a SPSS V0.20. La Base de datos contiene los siguientes datos: Código de la pinta/donante, edad, sexo, procedencia, grupos sanguíneo ABO, Rh(D)positivo, DVI(+ ó -), Fenotipo Rh (C, c, E, e) y presencia de anticuerpo irregular.

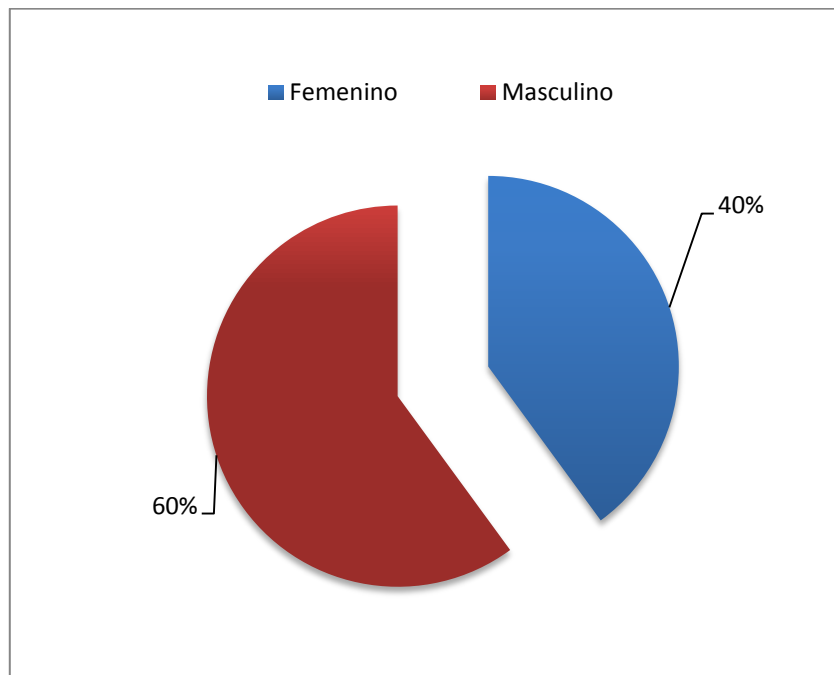
CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Descripción de la población del estudio.

Se analizó un total de 383 muestras de las cuales el 40% fueron mujeres y el 60% hombres. (Gráfico N°4.1).

Gráfico N°4.1 Distribución de la población de estudio de acuerdo al género



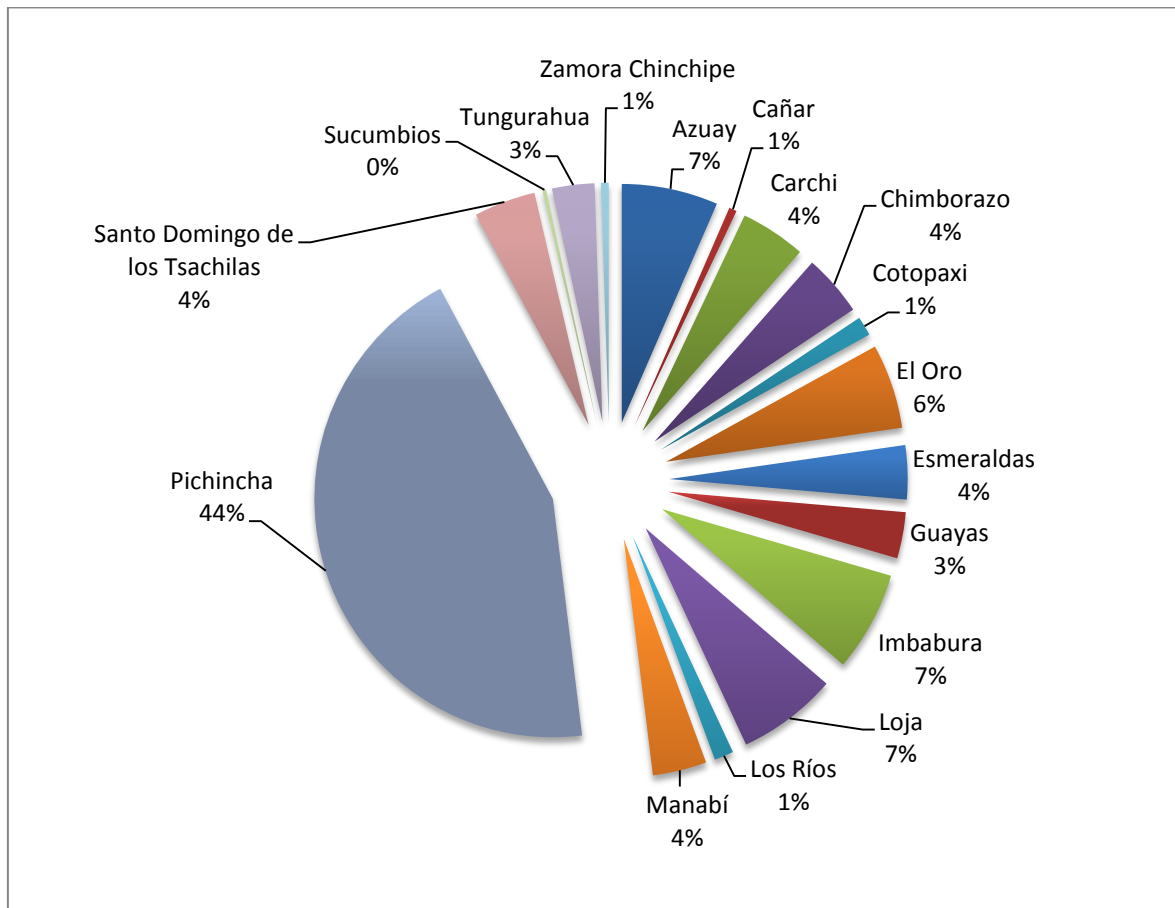
Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC.

El gráfico muestra una mayor frecuencia del género masculino sobre el femenino.

Las muestras de donantes de sangre analizadas en este estudio provenían de 17 provincias ecuatorianas, el mayor porcentaje fue en Pichincha 44%. (Gráfico N°4.2).

Gráfico N°4.2. Distribución de la población de estudio de acuerdo a la procedencia



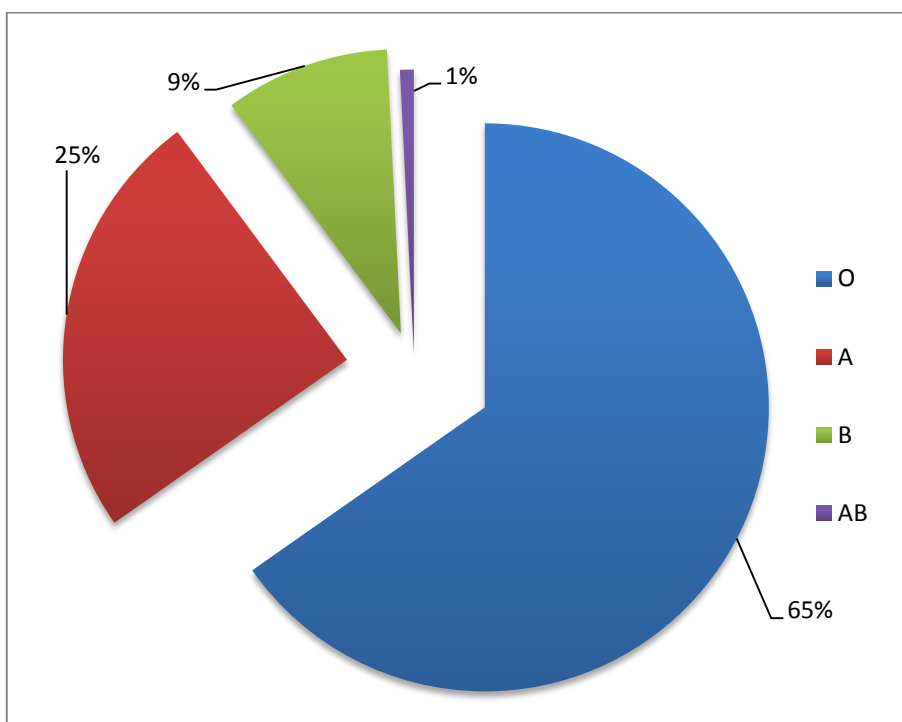
Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra la distribución porcentual de los donantes de sangre por provincia siendo similar entre ellas a excepción de Pichincha.

Los donantes de sangre incluidos en el estudio presentaron el fenotipo O Rh negativo en un 65%, seguido del grupo sanguíneo A Rh negativo con un 25%; B Rh negativo el 9% y únicamente el 1% de grupo sanguíneo AB Rh negativo. (Gráfico N°4.3).

Gráfico N°4.3. Distribución porcentual de la población de estudio de acuerdo al grupo sanguíneo.



Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC

En el gráfico se observa el bajo porcentaje de donantes AB Rh negativos.

4.1.2 Prevalencia del antígeno DVI en donantes de sangre.

Se determinó una prevalencia del 13% (n=48) de antígeno DVI en donantes de sangre, de este porcentaje el 25%(12) pertenecen al género femenino y el 75%(36) al masculino.(Gráfico N°4.4-4.5).

Gráfico N°4.4. Prevalencia del antígeno DVI en los donantes de sangre analizados

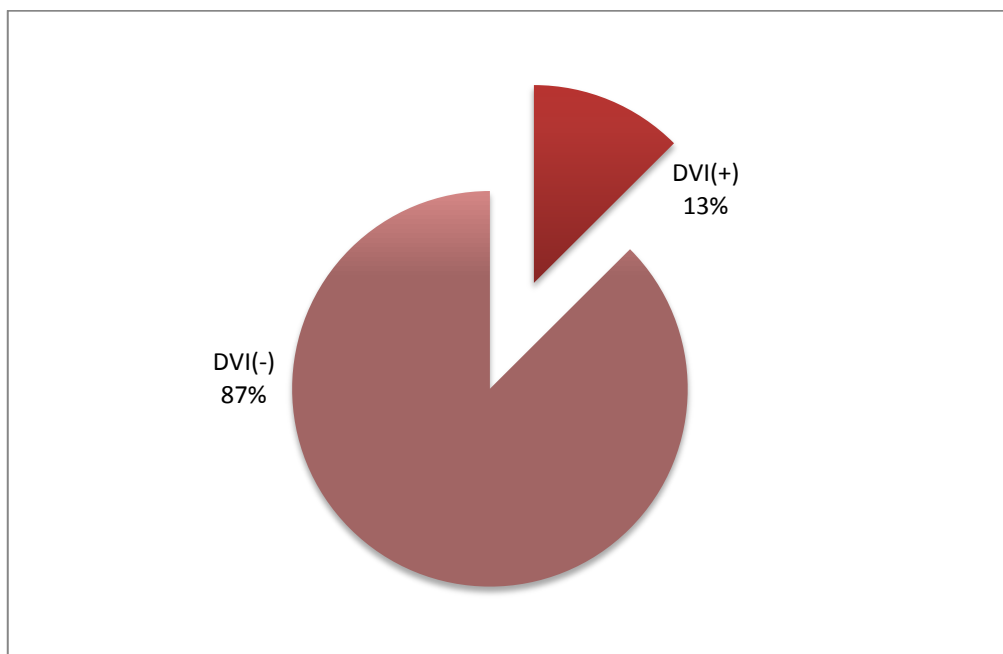
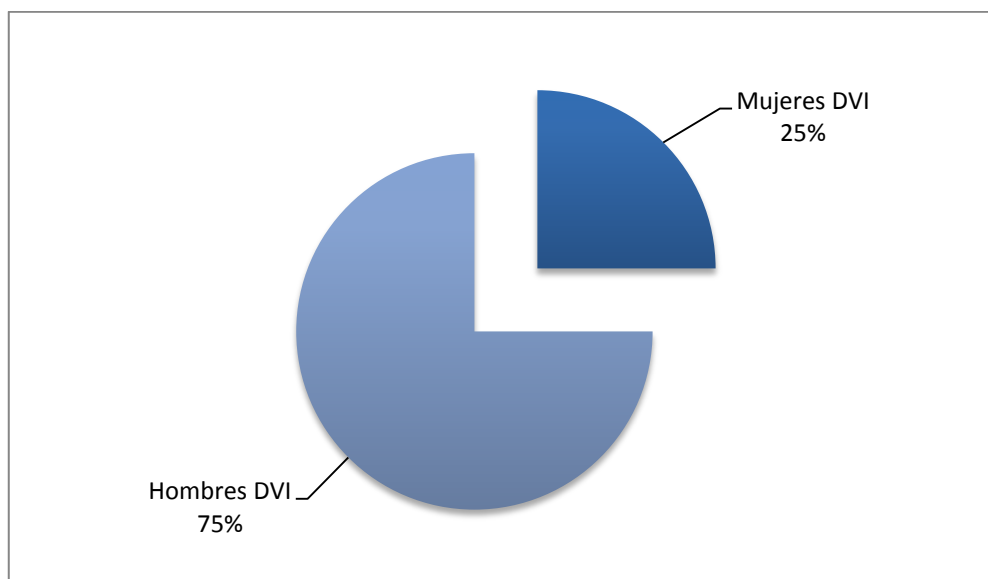


Gráfico N°4.5. Prevalencia del antígeno DVI de acuerdo al género



Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC

4.1.3 Relación de la frecuencia del antígeno DVI con la edad y procedencia de los donantes de sangre.

Del análisis realizado se determinó que la provincia con mayor frecuencia de antígeno DVI fue Pichincha con el 38,78%; seguido de la provincia de Loja con el 12,24% y las provincias de Tungurahua y Cotopaxi con el 8,6%. (Tabla N°4.1).

Tabla N°4.1. Distribución del antígeno DVI de acuerdo a la procedencia

Provincia	Antígeno DVI		Total
	Positivo	Negativo	
Azuay	3	22	25
Cañar	0	2	2
Carchi	2	15	17
Chimborazo	2	4	6
Cotopaxi	4	3	7
El Oro	2	21	23
Esmeraldas	0	14	14
Guayas	0	12	12
Imbabura	3	22	25
Loja	6	20	26
Los Ríos	0	11	11
Manabí	3	11	14
Pichincha	19	153	172
Santo Domingo de los Tsachilas	1	15	16
Sucumbios	0	1	1
Tungurahua	4	7	11
Zamora Chinchipe	0	1	1
	49	334	383

Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC

Tabla muestra la distribución de los antígenos DVI en 11 de las 17 provincias ecuatorianas.

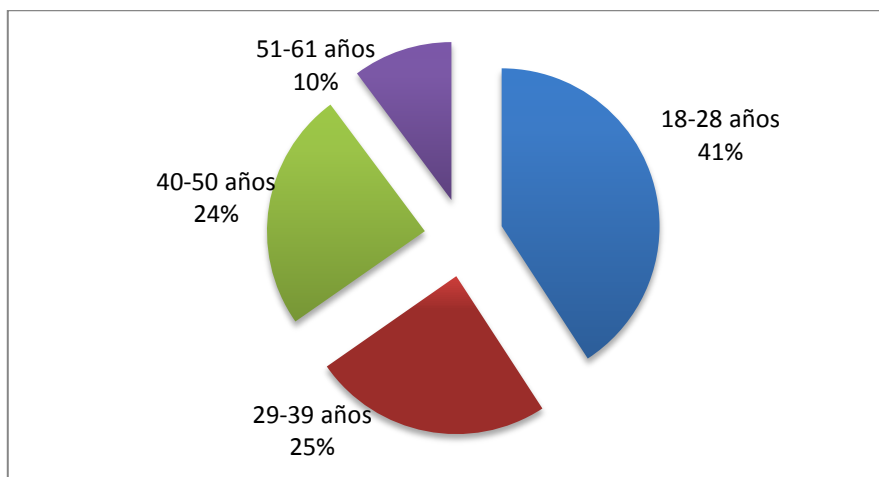
Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	21,650 ^a	19	,302
Razón de verosimilitud	22,799	19	,246
N de casos válidos	383		

No existe significancia estadística entre la relación procedencia y presencia o ausencia del antígeno DVI

En relación al grupo de edad el antígeno DVI se encuentra distribuido mayormente en el grupo etario comprendido entre 18-28 años con un 41%, seguido del grupo de 29-39 años con un 25%, grupos considerados en edad fértil susceptibles de aloinmunización por embarazo y transfusiones sanguíneas. (Gráfico N°4.6-4.7).

Gráfico N°4.6. Prevalencia del antígeno DVI de acuerdo a la edad.

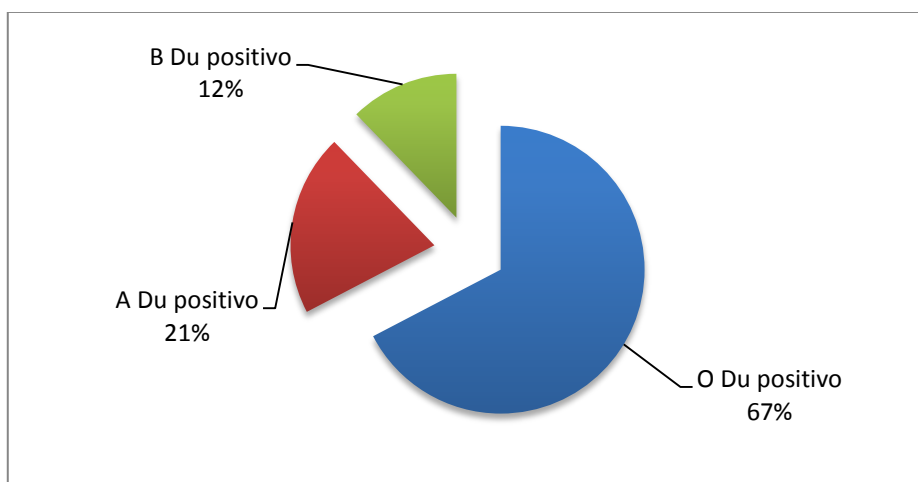


Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra la distribución porcentual del antígeno DVI en cada grupo etario.

Gráfico N°4.7. Prevalencia del antígeno DVI de acuerdo al grupo sanguíneo



Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEI

El gráfico muestra la distribución porcentual del antígeno DVI por grupo sanguíneo.

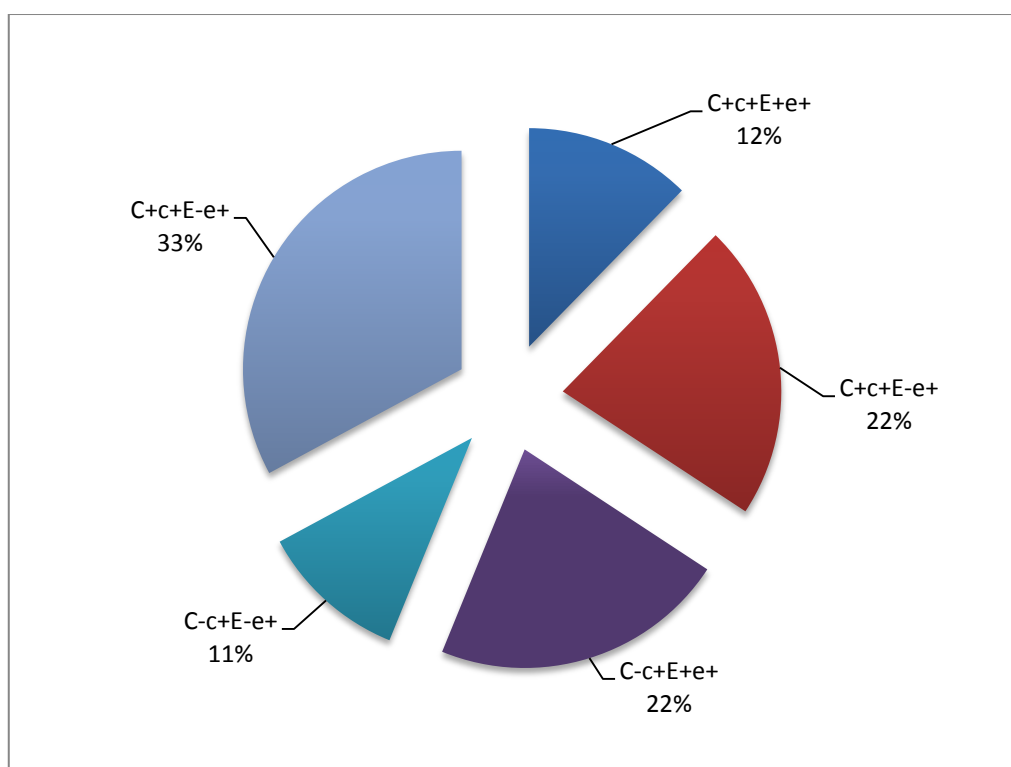
4.1.4 Aloinmunización en donantes de sangre participantes en el estudio.

De los 49 donantes voluntarios de sangre que presentaron antígenos DVI únicamente uno (2,04%) presentó aloinmunización del sistema Rh indicativo de la existencia de transfusiones incompatibles.

4.1.5 Relación del antígeno DVI con fenotipos del sistema Rh.

Del análisis realizado entre la existencia de los fenotipos del sistema Rh y el antígeno DVI se estableció que existen cinco combinaciones con ausencia o presencia de antígenos C y E con expresión fenotípica como DVI. (Gráfico N°4.8).

Gráfico N°4.8. Distribución porcentual del antígeno DVI y su relación con el fenotipo Rh



Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra la existencia de combinaciones del fenotipo Rh con el antígeno DVI.

Al identificar la presencia de los antígenos C y E con el fenotipo DVI, se estableció que el 25% de los donantes positivos para DVI exhiben un fenotipo con C; el 25% presenta el antígeno E y el 50% los antígenos C y E; siendo estadísticamente significativa esta relación. $p < 0.01$ (Tabla N° 4.2) (Gráfico N°4.9).

Tabla N°4.2. Antígeno CE/ce en presencia o ausencia del antígeno DVI

DVI	C+	C-	c+	c-	E+	E-	e+	e-
Negativo	227	107	333	1	115	219	328	6
Positivo	40	24	73	1	25	48	73	0

DVI	C-E	c-e
Negativo	342	661
Positivo	9	73

Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC

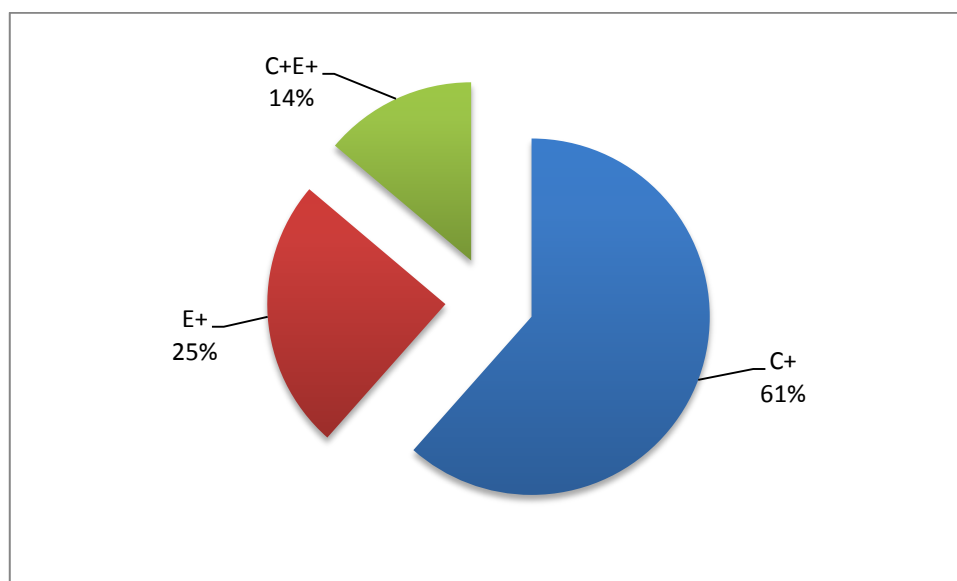
El gráfico muestra la existencia de combinaciones del fenotipo Rh con el antígeno DVI.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	389,465 ^a	4	,000
Razón de verosimilitud	19,122	4	,001
N de casos válidos	383		

Existe significancia estadística entre la relación de antígenos CE/ce con el fenotipo DVI.

Gráfico N°4.9. Distribución porcentual del antígeno DVI y su relación con el fenotipo Rh, antígenos C y E.



Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Base de datos CIEIC

El gráfico muestra la existencia de antígeno C, E o su combinación C+E y el fenotipo DVI.

4.1.6 Determinación de la existencia de aloanticuerpos en donantes con fenotipo DVI

Del total de donantes analizados y positivos para el fenotipo DVI, únicamente uno se encuentra aloinmunizado. Adicionalmente los 49 donantes positivos en DVI fueron clasificados como D débil.

4.2 DISCUSIÓN

La descripción de la población es un aspecto importante dentro de un estudio para determinar su composición y establecer la relación de las variables de estudio, en este caso se identificó que está compuesta mayoritariamente por el género masculino (60%), dato similar al encontrado en los estudios de Granda y Ulloa (Ulloa & Chiriboga, 2013) (Granda & Chiriboga, 2015) quienes realizaron investigaciones en donantes de sangre.

La existencia de una mayor frecuencia de donantes masculinos que femeninos se debe especialmente a los requisitos implementados tanto por la Asociación Americana de Bancos de Sangre como la Organización Panamericana de la salud en relación al nivel de hemoglobina, hematocrito, y peso (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012) (Organización Panamericana de la Salud, 2009). Otro dato importante fue la distribución de la población de acuerdo a la procedencia, en este estudio se incluyeron 17 provincias ecuatorianas, la provincia de mayor frecuencia fue Pichincha (44%), las restantes presentaron una prevalencia entre 1 al 7%; permitiendo establecer la localización de los donantes de sangre que presentan el antígeno DVI.

Otro aspecto dentro de la descripción de la población fue la frecuencia del grupo sanguíneo encontrándose que el de mayor prevalencia fue el O Rh negativo (65%), seguido del A Rh negativo (25%), el 9% del grupo B negativo y únicamente el 1% de AB Rh negativo, datos similares al encontrado por Ulloa en su estudio retrospectivo de cuatro años en los que se encontraron que el grupo O Rh negativo es el más frecuente (Ulloa & Chiriboga, 2013).

El estudio de la identificación y frecuencia del antígeno D parcial es importante en los bancos de sangre especialmente por la producción de aloinmunización en individuos Rh D positivos, en esta investigación se determinó una prevalencia del 13% del antígeno DVI; otros estudios han establecido que la frecuencia de este antígeno varía de un grupo étnico a otro, así en la población caucásica es de 1: 6.200 y en individuos de raza negra es alta. (Kabiri, Benajiba, Hajjout, Dakka, & Bellaoui, 2014), en Bélgica se determinó una prevalencia del 7,8% (Van Sandt VS, 2015), mientras que en India se identificó una incidencia de 0,15% de D parcial (Kulkarni S, 2008). En Europa, Estados Unidos y Australia se ha estimado una frecuencia de antígeno DVI entre 0,015% y 0,04% mientras que en los Japoneses se detectó un DVI entre 5 millones (Geoff D. , 2013).

El análisis de la frecuencia y distribución del antígeno DVI en el Ecuador permitió establecer la provincia con mayor prevalencia fue Pichincha (38,78%), seguida de Loja

con el 12,24%, Tungurahua y Cotopaxi con el 8,16% respectivamente y la de menor fue Santo Domingo de los Tsáchilas con 2,04%. Estos datos demuestran que la presencia de las variantes del antígeno D y en especial de DVI es característica de cada población y etnia (Kabiri, Benajiba, Hajjout, Dakka, & Bellaoui, 2014).

En este estudio la presencia del antígeno DVI y su relación con el género se identificó que existe una mayor frecuencia en hombres (75%) que en mujeres, siendo un dato indicativo de una probabilidad de aloinmunización durante un embarazo o a través de transfusiones sanguíneas incompatibles (Daniels, 2013). Así lo concluye el estudio realizado por Chou y Westhoff los que mencionan que mujeres portadoras de la variante DVI pueden producir un anti-D altamente relacionado con enfermedad hemolítica del recién nacido por lo que la identificación de esta variante evitaría la sensibilización de estas mujeres mediante una profilaxis (Chou & Westhoff, 2010); en Europa también se reportó que el antígeno DVI está relacionado con aloinmunización ya sea durante el embarazo o luego de una transfusión sanguínea (Kabiri, Benajiba, Hajjout, Dakka, & Bellaoui, 2014).

Otro aspecto encontrado en este estudio fue la presencia del antígeno DVI en los donantes de grupo O Du positivo con el 67%, A Du positivo 21% y B Du positivo 12%, este hallazgo indica que el antígeno DVI se encuentra distribuido en los grupos sanguíneos de mayor frecuencia en el país, este lo corrobora los resultados reportados en el estudio realizado por Ulloa (Ulloa & Chiriboga, 2013).

En esta investigación también se identificó la existencia de aloinmunización en donantes de sangre con presencia del antígeno DVI encontrándose que únicamente el 2,04% (1) desarrolló un anti-D; sin embargo en el estudio realizado por Ulloa se determinó una aloinmunización por el antígeno D en 208 donantes de un total de 587 aloinmunizados en cuatro años de estudio (Ulloa & Chiriboga, 2013); en contraste en la investigación realizada por Checa en pacientes multitransfundidos no se encontró aloinmunización con anti-D (Checa & Chiriboga, 2012).

Del análisis de la relación entre la presencia del antígeno DVI y los fenotipos del sistema Rh se determinó que existen 5 combinaciones diferentes: la de mayor frecuencia es C+c+E-e+ con el 33%, seguida de la combinación C+c+E-e+ y C-c+E+e+ con el 22% respectivamente y C+c+E+e+ 12%; C-c+E-e+ 11%. Al separar los antígenos del sistema Rh se estableció que las muestras que presentaban el antígeno DVI estaban relacionadas con la presencia de los antígenos C+ en un 61%; E+ el 25% y C+E+ con el 14%. Estos resultados concuerdan con la teoría de que la mayoría de los fenotipos DVI

están asociados al haplotipo RHCE*C y en menor frecuencia al RHCE*CE (Geoff D. , 2013). El estudio realizado por Goldman identificó la presencia del antígeno C+ en cuatro donantes tipificados como Rh D negativo, sin embargo al realizar las pruebas de confirmación se los identificó como D parcial, esto se debe a que la presencia de C es una de las causas que se produzca una expresión reducida del antígeno D razón por la cual se ha propuesto un algoritmo en el cual individuos con fenotipo Rh D negativo con antígenos C o E deben ser tipificados para la detección de variantes de D (débil o parcial) (Goldman, Resz, Ochoa, & Angus, 2013). Investigadores como Londero y otros mencionan que en donantes con fenotipos RhD negativos y positivos para los antígenos C y E deben ser analizados en búsqueda de variantes de D (Londero, Fiorino, Miotti, & De Angelis, 2010). La presencia de los antígenos CE puede provocar aglutinaciones inespecíficas al usar reactivos anti-D monoclonales lo que ocasiona que pase desapercibido ciertas variantes del antígeno D como el DVI (Baptista-González H. A., 2004).

La tipificación errónea de las variantes del antígeno D puede ocasionar reacciones hemolíticas fatales es necesario que en pacientes y mujeres embarazadas se utilicen reactivos monoclonales IgM que no detecten la variante DVI y en donantes reactivos dual IgM&IgG de tal manera que se identifiquen todas las variantes de este antígeno; en el caso del uso de tarjetas de gel se requiere que se utilicen aquellas que identifican a los hematíes portadores de DVI(+) ó DVI(-) (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014). Esto permite clasificar a los individuos en: Caso de mujeres embarazadas y pacientes como Rh D negativas para que tengan la posibilidad de recibir profilaxis o sangre Rh D negativa. En el caso de donantes de sangre los portadores de DVI deben considerarse como Rh D positivos (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

El estudio realizado por Benalcázar determinó que en Ecuador existen reactivos anti-D de tipo policlonal-IgG, monoclonal-IgM y dual IgG&IgM para su uso en metodología manual que cumplieran con los criterios de calidad (potencia, avidéz, especificidad y sensibilidad); sin embargo eran utilizados indistintamente tanto en laboratorios particulares como en bancos de sangre y de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se recomendaría la elección adecuada del tipo de reactivo a ser utilizado tomando en consideración la recomendación de Buelvas de que se establezca un protocolo de detección diferenciado en pacientes, donantes y mujeres gestantes (Buelvas Cortés, Muñiz-Díaz, & León de González, 2014) (Benalcazar & Chiriboga, 2013).

4.3 CONCLUSIONES

- La población participante en este estudio fueron donantes de sangre de 17 provincias ecuatorianas en su mayoría conformada por el género masculino y donantes de grupo O Rh D negativo.
- La prevalencia y distribución del antígeno DVI es característica de cada población y etnia determinándose que en la población ecuatoriana es del 13%.
- La presencia del antígeno DVI en mujeres en edad fértil constituye un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad hemolítica del recién nacido de igual manera en el género masculino puede ocasionar una anemia hemolítica pos transfusional debida a una aloinmunización, en este estudio se estableció que el antígeno DVI está distribuido mayoritariamente en hombres que mujeres.
- Las provincias con mayor frecuencia de la variante del antígeno DVI fueron Pichincha, Loja, Tungurahua y Cotopaxi mientras que la distribución de este antígeno en las otras provincias varió entre el 4-6%.
- Se estableció que la frecuencia del antígeno DVI en el grupo etario considerado en edad fértil fue del 41%, dato que debe ser considerado en el Programa de Maternidad Gratuita para implementar un nuevo esquema de tipificación sanguínea.
- Se ha determinado que el grupo sanguíneo de mayor prevalencia en el Ecuador es el O, en este estudio se identificó que el antígeno DVI está relacionado mayoritariamente con el grupo O Rh Débil por lo que debe implementarse la tipificación de variantes de D.
- Estudios han establecido que los individuos portadores del antígeno DVI son susceptibles de desarrollar un anticuerpo anti-D, en este estudio únicamente se identificó a un donante.
- También se relacionó la presencia del antígeno DVI con el haplotipo RHCE estableciéndose que los donantes incluidos en el estudio presentaron el fenotipo C+c+E-e+ y C-c+E+e+ con el 22%.
- La presencia de los antígenos C y/o E han sido considerados como los causantes de una baja expresión del antígeno D, en este estudio se encontró que los individuos portadores del antígeno DVI poseen el antígeno C(61%); E(25%) y CE(14%).
- Los resultados obtenidos en este estudio indican una adecuada elección de reactivos para identificación de las variantes del antígeno D.

4.4 RECOMENDACIONES

De los resultados obtenidos en este estudio surgen varias recomendaciones para el Ministerio de Salud Pública del país y sus programas de salud así:

- Debe considerarse que existe una prevalencia de donantes de sangre portadores del antígeno DVI lo que constituye un factor de riesgo de inmunización por lo que se debe incluir nuevos métodos de detección que identifiquen esta variante del antígeno D especialmente en mujeres en edad fértil y/o embarazada.
- Al no disponer de la metodología en gel que es la que discrimina la presencia o ausencia del antígeno DVI implementar un algoritmo de detección e identificación tanto para el antígeno D débil y D parcial.
- Los centros de medicina transfusional deben utilizar el tipo de reactivos anti-D (monoclonal o policlonal) de acuerdo a las características de los pacientes a ser tipificado como lo sugiere el Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre.
- En el caso de laboratorios clínicos debe considerar el uso de reactivos monoclonales IgM que no detecten el antígeno DVI de tal manera que los portadores sean identificados como Rh D negativos y confirmados con la prueba de antiglobulina humana o Coombs directo.
- Todos los individuos que sean tipificados como RhD negativos ó Du positivos (D débil) deben ser sometidos a la identificación fenotípica de los antígenos CDE (C,c,E,e) ante la posibilidad de encontrar variantes del antígeno D.
- Todos los individuos que presenten un resultado positivo en el fenotipo Rh (C+, E+ ó CE+) deben ser sometidos a la identificación del antígeno DVI u otra variante de D.
- Todos los pacientes y mujeres embarazadas deben ser tipificadas utilizando reactivos monoclonales IgM, y a los donantes mediante el uso de reactivos Dual IgG e IgM.
- Programa de Maternidad Gratuita debe incluir en la prestación de servicios la inclusión de la determinación de variantes del antígeno D.
- Ministerio de Salud Pública y el Programa Nacional de Sangre debe vigilar y facilitar la existencia de reactivos anti-D validados y con características específicas para la detección inequívoca de las variantes de D.

4.5 Bibliografía

A. Rodríguez de la Rúa, D. Hernandez Maraver, J. Gracia Colldeforns. (2004). ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO. *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario La Paz. Madrid.* , 30-37..

Abdelrazik, A. M., Elshafie, S. M., & Ezzat Ahmed, G. M. (2013). Combining serology and molecular typing of weak D role in improving D typing strategy in Egypt. . *Transfusion* , 53: 2940–2944. doi: 10.1111/trf.12100.

Arias, J. c. (2006). *Muestras Estadísticas*. Obtenido de <http://inmaculadava.maristascompostela.org/Derive/ccss2/02excel/11muestrasexcel.htm>

Asociación Americana de Bancos de Sangre. (2012). Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre-AABB. *Manual* .

Baptista-González, H. A. (2004). Actualidades en el sistema Rh-Hr. *Gac Méd Méx Vol* , Vol 140, Suplemento N°3: 37-40.

Batista-González, H. (2004). Actualidades del sistema Rh-Hr. *Medigraph* , 140(3): 37-40.

Benalcazar, L., & Chiriboga, R. (2013). Determinación de la Capacidad de detección de los reactivos monoclonales y policlonales utilizados para la identificación del Antígeno D en técnica de tubo Quito,. *TESIS* .

Bennington. (2000). *Diccionario enciclopédico de Laboratorio Clínico* . España : Panamericana .

Buelvas Cortés, A., Muñoz-Díaz, E., & León de González, G. (2014). *Inmunohematología básica y aplicada*. Colombia: FERIVA.

Castillo Espinosa, Daniela, Vásquez Rojas, Marcela. (2012). Frecuencia fenotípica de los cinco antígenos mayores del sistema sanguíneo Rh en donantes voluntarios de sangre de la región del Maule. *Universidad de Talca* , 1 - 3.

Checa, A., & Chiriboga, R. (2012). Determinación de la frecuencia de aloanticuerpos en pacientes hematológicos multitransfundidos que acuden a dos centros de salud en Quito. *Tesis* .

Chou, S., & Westhoff, C. (2010). The Rh and RhAG blood group systems . *Inmunohematology* , Volume 26, Number 4, 178-186:ISSN 0894-203X.

- Connie M. Westhoff, S. V.-H.-R. (2010). DIIIa and DIII Type 5 are encoded by the same allele and are associated with altered RHCE*ce alleles: clinical implications. *Transfusion* , 1-17.
- Cotorruelo, C., Biondi, C., Garcia Borrás, S., Racca, L. B., Di Monaco, R., & Racca, A. (2006). Aloimmunización a un antígeno del sistema Rh de Alta frecuencia. *Medicina Buenos Aires* , 66:46-48.
- Daniels, G. (2013). Variants of RhD – current testing and clinical consequences. *British Journal of Haematology* , 161: 461–470.
- Dorland. (2005). *Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina*. España: Elsevier.
- Dueñas, V. H. (2003). *El Banco de Sangre*. Cali: Universidad del Valle.
- Flegel W, W. F. (2002;). Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clinical Lab* , 48:53-59.
- Gargiulo, D. (2005). Sistema Rh lo que hay que saber. *México* , 2-14.
- Geoff, D. (2013). Rh and RHAG Blood Group System. En *Human Blood Groups* (págs. 182-253). Blackwell Publishing.
- Geoff, D. (2013). Variants of RhD – current testing and clinical consequences. *International Blood Group Reference Laboratory, NHS Blood and Transplant, Bristol, UK. British Journal of Haematology* , 161, 461–470 doi:10.1111/bjh.12275.
- Gerald Sandler, M. y. (2012). Inmunoprofilaxis Rh Postparto. *Obstetrics & Gynecology* , 120:1428–38.
- Goldman, M., Resz, J., Ochoa, G., & Angus, N. (2013). Identifying D-positive donors using a second automated testing platform. *Immunohematology* , Volumen 29, Número 3: 97-100 PMID: 25695437.
- Granda, S., & Chiriboga, R. (2015). Detección del Sistema Kell (k,k,Kpa,Kpb) en donantes de sangre que acuden el Hemocentro de Cruz Roja ecuatoriana en la ciudad de Quito, durante el período de Junio a Diciembre, 2014. *Tesis* .
- Hassan, M., Mohd Noor, N., Johan Noor, S., Sukri, S., & Mustafa, R. &. (2014). Hemolytic disease of fetus and newborn due to maternal red blood cell alloantibodies in the Malay population. *Asian Journal of Transfusion Science* , 8(2): 113-117. doi 10.4103/09736247.137449.

Jean Delamare, Jacques Delamare. (1981). *DICCIONARIO DE LOS TERMINOS TECNICOS DE MEDICINA*. Paris: INTERAMERICANA.

Kabiri, Z., Benajiba, M., Hajjout, Z., Dakka, N. H., & Bellaoui, H. (2014). Testing for Partial RhD with a D-Screen Diagast Kit in Moroccan Blood Donors with Weak D Expression. *Journal of Blood Transfusion* , 1-4, dx.doi.org/10.1155/2014/204301.

Kulkarni S, C. R. (2008). Frequency of partial D in Western India. *Transfusion* , 18(2):91-6. doi: 10.1111/j.1365-3148.2008.00848.x.

Londero, D., Fiorino, M., Miotti, V., & De Angelis, V. (2010). Molecular RH blood group typing of serologically D-/CE+ donors: the use of a polymerase chain reaction-sequence-specific primer test kit with pooled samples. *Inmunology* , Volumen 27, capitulo 1: 25-28 ISSN 0894-203X.

Muñiz Dias, E. (2010). Grupos sanguíneos eritrocitarios.

Organizacion Panamericana de la Salud. (2009). *Elegibilidad para la Donación de Sangre*. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud.

Ramiro Navarrete Coronado, Daniel Segura Ulate. (2012). Frecuencia de Fenotipos del Sistema Rh-Hr en donantes Rh Negativos en el Hospital San Vicente De Paúl. *Revista Medica De Costa Rica Y Centroamerica* , 143 - 147 .

Reverberi, R. (2008). The persistence of red cell alloantibodies. *Blood Transfusion*, 225-234 , 225-234.

Rivero, R. (2000). Anticuerpos monoclonales anti-Rh(D): Antecedentes y estado actual. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* , 16(1):30-7, 16(1):30-7.

Roja, C. (2010). *HEMOCENTRO CRUZ ROJA ECUATORIANA*. Obtenido de http://www.cruzroja.org.ec/plantilla_texto.php?id_submenu1=18&id_menu=7

Silberman, D. R. (Junio de 2007). *INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA*. Obtenido de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>

Swati, K., Vasantha, K., & Kanjaksha, G. (2013). A simple diagnostic strategy for RhD typing in discrepant cases in the India Population. *Blood Transfusion* , 11(1): 37-42.

Ulloa, A & Chiriboga, R (2009-2012). Análisis retrospectivo de la frecuencia y tipo de anticuerpos irregulares en donantes voluntarios de sangre en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatorina-Quito. *Tesis* , 1-87.

Van Sandt VS, G. C. (2015). RHD variants in Flanders, Belgium. *Transfusion* , 55(6 Pt 2):1411-7. doi: 10.1111/trf.12947.

Von Zabern, I., Wagner, F. F., Moulds, J. M., Moulds, J., & Flegel, W. (2013). D category IV: a group of clinically relevant and phylogenetically diverse partial D. . *Transfusion* , 53(11 0 2), 10.1111/trf.12145. doi:10.1111/trf.12145.

Westhoff, C., Vege, S., Hips Hue-Roye, K., Copeland, T., Velliquette, R., & Reid, M. (2013). RHCE*ceTI encodes partial c and partial e and is often in cis to RHD*DIVa. *Transfusion* , 53(4), 741–746. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03800.x.

X. Fuentes Arderiu, M.J. Castiñeiras Lacambra, J. M. Queraltó Compañó. (1998). *Bioquímica clínica y Patología molecular* . Barcelona : Reverte .

4.6 ANEXOS

Anexo 1. Técnica de control de Coombs

Células control Coombs se producen al sensibilizar in vitro células rojas humanas con anticuerpos anti-D (IgG), cuyo objetivo primordial es producir aglutinación fuerte en presencia de los reactivos de antiglobulina humana (Coombs) de esta manera se puede controlar la viabilidad y potencia del reactivo elegido sea este en tubo o en gel.

Proceso:

1. Obtener sangre con anticoagulante EDTA Rh positiva.
2. Centrifugar por 1 minuto para precipitar los glóbulos rojos.
3. Retirar el plasma con una pipeta pasteur.
4. Separar 3 ml de eritrocitos y lavar dos veces con solución salina al 0,85%.
5. Agregar dos gotas de albúmina y dos potas de anti-D monoclonal
6. Incubar durante 15 minutos a 37°C.
7. Lavar dos veces con solución salina al 0,85% y 3000 rpm.
8. Diluir en 1 ml de solución salina
9. Utilizar por 1 semana.

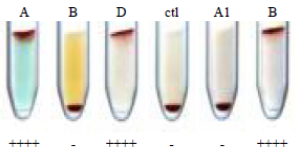

Fuente: AABB, 2012.


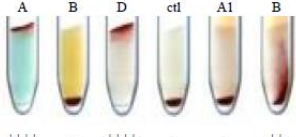
Anexo 2 Ejemplo de Numeración aleatoria con un n=225

172	101	213	113	168	390	307	268	434
131	13	439	115	155	403	109	358	273
182	100	80	321	170	440	317	224	240
265	337	330	95	363	402	353	376	378
216	173	297	96	242	415	285	50	91
416	259	239	266	54	370	40	360	97
93	266	12	264	191	312	203	156	100
342	142	302	142	256	380	374	396	247
302	295	102	407	89	278	232	167	286
124	331	272	183	167	156	79	317	315
428	77	238	166	58	58	191	350	6
227	113	1	14	355	358	161	290	57
132	407	366	424	323	373	302	217	243
3	382	111	110	217	431	181	151	193
419	339	11	315	307	250	204	93	133
296	128	398	330	105	56	145	104	357
288	395	296	437	420	208	320	346	310
207	76	97	202	413	90	20	416	208
287	115	235	262	213	246	240	365	135
425	301	12	250	25	310	180	256	388
123	268	211	390	114	423	20	349	136
96	160	95	245	192	341	235	247	283
260	429	357	288	7	119	385	417	413
39	133	67	54	435	194	2	26	248
105	201	345	389	129	213	386	176	265

Autor: Adriana Rodríguez

Anexo 3. Ejemplo de Lectura en equipo DELFIN

SAMPLE: 004644					SAMPLE: 004644													
Test:MO31 Bloodgr. + Rev.gr.: A-B-D-ctl/A1-B (DiaClon) (5009)	1st	Batch 4671	Date 25/07/2012 0:40:07	Operator SAGULAR	Test:PR80 Crossmatch: (IAT)5053	1st	Batch 4671	Date 25/07/2012 0:40:07	Operator SAGULAR									
Barcode:5009248051208450633					Barcode:5053168271302208302													
 <p>++++ - +++++ - - +++++</p>					 <p>- -</p>													
Group: A Rh(D): positivo					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tube</th> <th>Donor</th> <th>Result</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>20121804</td> <td>Crossmatch: compatible</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>20121784</td> <td>Crossmatch: compatible</td> </tr> </tbody> </table>					Tube	Donor	Result	5	20121804	Crossmatch: compatible	6	20121784	Crossmatch: compatible
Tube	Donor	Result																
5	20121804	Crossmatch: compatible																
6	20121784	Crossmatch: compatible																

SAMPLE: 00707					SAMPLE: 00707				
Test:PR17 Direct Antiglobulin test (IAT) 5053	1st	Batch 4677	Date 25/07/2012 11:24:12	Operator DCARVAJAL	Test:MO31 Bloodgr. + Rev.gr.: A-B-D-ctl/A1-B (DiaClon) (5009)	1st	Batch 4678	Date 25/07/2012 12:00:13	Operator DCARVAJAL
Barcode:5053168271302208225					Barcode:5009248051208450841				
 <p>++</p>					 <p>++++ - +++++ - - ++</p>				
DAT: positivo					Group: A Rh(D): positivo				

Fuente: Base de datos sistema DELFIN.

Anexo 4: Protocolo de Identificación de anticuerpos irregulares.

Test cell reagents for the ID-System

Español B004350 05.10

Reactivos de eritrocitos para detección de anticuerpos: ID-DiaCell I-II, ID-DiaCell I-II-III, ID-DiaCell I-II-III P (papainized), ID-DiaCell I-II-III Asia, ID-DiaCell Pool para identificación de anticuerpos: ID-Panel, ID-Panel P antígenos especiales: ID-Di* (Diego) positivo, ID-I negativo cell

INTRODUCCIÓN

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

Los sistemas de selección e instrumentación de configuración antigénica de las células son rigurosos; deben asegurar la presencia de todos los antígenos adecuadamente expresados. Para el sistema ID, ID-DiaCell I-II y ID-Di se seleccionan antígenos solo estar presente en forma homogénea. Además, deben estar presentes los antígenos Lewis en su forma antigénica "a".

Tradicionalmente se consideraba que el procedimiento más efectivo para detectar todos los anticuerpos (requiere pruebas de aglutinación y pruebas de neutralización) era el uso de un sistema de selección e instrumentación de configuración antigénica de las células son rigurosos; deben asegurar la presencia de todos los antígenos adecuadamente expresados. Para el sistema ID, ID-DiaCell I-II y ID-Di se seleccionan antígenos solo estar presente en forma homogénea. Además, deben estar presentes los antígenos Lewis en su forma antigénica "a".

Los métodos clásicos han sido ampliamente reemplazados por el sistema ID-System.

REACTIVOS

IVD

Todos los eritrocitos de prueba son de origen humano, en un medio de suspensión tamponado a 0.9% (0.1%) de cloruro de sodio fisiológico y sulfato de potasio.

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

ID-DiaCell I-II R₁R₂R₃ para prueba (R₁ y NaCl)
 ID-DiaCell I-II-III R₁R₂R₃R₄ para prueba (R₁ y NaCl)
 ID-DiaCell I-II-III P papainized, para técnica automatizada
 ID-DiaCell Pool R₁R₂R₃R₄R₅ el tipo de eritrocito aglutinado para análisis serológico de donantes
 ID-DiaCell I-II-III Asia R₁R₂R₃R₄R₅ combinados de fenotipo GP(AUR) para WF y para detección de aglutininas fijas

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

ID-DiaPanel 11 tipos de eritrocitos de prueba para prueba (R₁ y NaCl)
 ID-DiaPanel P 11 tipos de eritrocitos de prueba papainizados, para técnica automatizada

Antígenos especiales:

Estas células son para ser utilizadas como complementos de otras células usadas rutinariamente en el estudio de anticuerpos.

ID-Di* (Diego) positivo
 Errores: Sin reactivos.
 Error cada 4 semanas (puede permanecer)

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

REACTIVOS ADICIONALES NECESARIOS

- Tarjeta ID-Card 1.000 Coombs + Enzima Test con 3 microtubos que contienen suero antieritrocitos antiaglutinina humana (AHG) para WF en el interior de la matriz de gel, y 3 microtubos por gel matriz para técnica serológica (2 no. 5020)
- Tarjeta ID-Card 1.000 Coombs con 8 microtubos que contienen suero AHG papainizado en la matriz de gel para WF (2 no. 5021)
- Tarjeta ID-Card Coombs Anti-IgG con 8 microtubos que contienen anti-IgG de conejo en la matriz de gel para WF (2 no. 5022)
- Tarjeta ID-Card NaCl Enzima Test anti-cel aglutinante con 8 microtubos que contienen gel reactivo para técnica automatizada o prueba NaCl (2 no. 5023)
- Tarjeta ID-Card Reverse Grouping with Antibody Screening con 3 microtubos que contienen gel reactivo y 3 microtubos que contienen suero antieritrocitos antiaglutinina humana (AHG) para WF en el interior de la matriz de gel (2 no. 5024)
- ID-Quant 2.1.000 microtubo para subtipos de eritrocitos (2 no. 5025)

Verse el prospecto correspondiente.

OTROS MATERIALES NECESARIOS

- ID-Diagnost
- ID-Pipettor
- ID-Tips (para cada tubo)
- ID-Mixing table (superficie de trabajo)
- Agua de destilada
- Incubador 37 °C
- ID-Centrifuge (centrifuga) 6, 12 x 24

MATERIAL DE LA MUESTRA

Para un resultado fiable, la distribución debe realizarse con una muestra recién extraída, cumpliendo la normativa local del laboratorio en cuanto a límites de estabilidad de las muestras. Preferentemente, las muestras de sangre deben recogerse utilizando citofluorocentrífuga (CFC) o CFC-A como anticoagulante. También es posible utilizar muestras recogidas en tubo en anticoagulante.

BIO-RAD

Test cell reagents for the ID-System

Español B004350 05.10

CONTROLES

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

USO DE LOS ERITROCITOS DE PRUEBA ID

- Todos los reactivos de eritrocitos de prueba están destinados exclusivamente al uso con las tarjetas ID-Card del ID-System de Bio-Rad.
- Siga estrictamente los procedimientos descritos en los correspondientes folletos de las tarjetas ID-Card utilizadas.
- Los eritrocitos siempre deben resuspenderse suavemente invitando el frasco varias veces antes del uso, y también antes de colocar los frascos en un refrigerador automático.
- Asegúrese de que los eritrocitos de prueba se empleen a temperatura ambiente (18-24 °C).
- Durante las tareas de análisis, compruebe que los eritrocitos de prueba se mantienen en suspensión. Si se produce una precipitación, resuspenda de nuevo.
- En el sistema ID es importante la máxima precisión en el pipeteo. Utilice los distribuidores ID-Pipettor para el pipeteo en serie.
- Al registrar las reacciones, asegúrese de que el número de lote de la tabla de antígenos se corresponde con el número de lote de los frascos de reactivo.
- Después del uso, cierre los frascos e introduzca de nuevo en el frigorífico.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Principio [2]

Positivo: Las hemias aglutinadas forman una línea roja sobre la superficie del gel o están repartidas en el gel.
 Negativo: Sedimento compacto de hemias en el fondo del microtubo.

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

B) Reacciones

Véanse los prospectos correspondientes.

LIMITACIONES

a) La contaminación de los materiales empleados, bacteriana o de otro tipo, puede provocar falsos positivos o falsos negativos.
 b) El sistema atornilla estrictamente a los procedimientos y equipos recomendados. El equipo debe comprobarse periódicamente según la normativa de prácticas de laboratorio correctas (CLP).

BIBLIOGRAFÍA

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

PRODUCTOS

ID-DiaCell I-II-III (2-no: 45184)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ R ₃)	3 x 10 mL	REF 004310
ID-DiaCell I-II-III Asia (2-no: 45404)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ R ₃ R ₄)	3 x 5 mL	REF 004304
ID-DiaCell I-II-III Asia (2-no: 45330)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ R ₃ R ₄ GP(AUR))	3 x 10 mL	REF 003614
ID-DiaCell I-II-III P (2-no: 45184)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ R ₃ R ₄ papainized)	3 x 10 mL	REF 005310
ID-DiaCell I-II-III P (2-no: 45144)	Juego de 3 frascos (R ₁ R ₂ R ₃ R ₄ papainized)	3 x 5 mL	REF 005304
ID-DiaCell I-II (2-no: 45151)	Juego de 2 frascos (R ₁ R ₂)	2 x 10 mL	REF 003613
ID-DiaCell Pool (2-no: 06070)	2 tipos de eritrocitos combinados (R ₁ R ₂ R ₃)	2 x 10 mL	REF 003620
ID-DiaCell Pool (2-no: 06070)	2 tipos de eritrocitos combinados (R ₁ R ₂ R ₃)	3 x 10 mL	REF 003631
ID-DiaPanel (2-no: 45161)	Juego de 11 frascos	11 x 4 mL	REF 004114
ID-DiaPanel P (2-no: 45171)	Juego de 11 frascos	11 x 4 mL	REF 004214
ID-Di* (Diego) positivo (2-no: 05980)	Juego de 1 frasco	1 x 10 mL	REF 004134
ID-I negative cell (2-no: 05291)	Juego de 1 frasco	1 x 1.6 mL	REF 004111

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





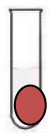

BIO-RAD

DiaMed GmbH
1785 Cressier FR
Suiza

CE
0123

Fuente: BIORAD

Anexo 5: valoración de la cantidad de aglutinación que se observe.

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

Fuente: Manual Técnico AABB, 2012.

Anexo N°6: Proceso y procedimiento del estudio

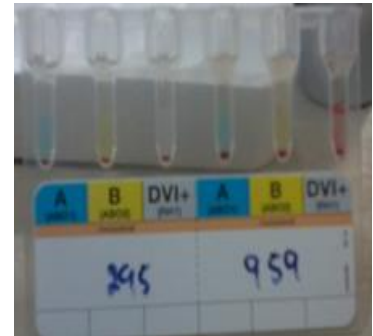
Recolección de muestras



Recolección de muestras



Patrón de lectura



Procesamiento de la muestra



Centrifugación de tarjetas



Lectura de tarjetas



Autor: Adriana Rodríguez

Fuente: Hemocentro de Cruz Roja