



Instituto de
Salud Pública
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

RECOMENDACIONES PARA LA CLASIFICACIÓN SANGUÍNEA RhD

14 de enero de 2013

AUTOR

TM. Andrés Aburto Almonacid.

Encargado Área de Inmunohematología.
Sección de Hematología e Inmunohematología.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA

BQ. Patricio Anabalón Soto.

Jefe. Subdepto Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Mitzy Celis Morales.

Jefe Sección Coordinación Externa.
Subdepto Coordinación de Redes de Laboratorios.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.

Jefe Subdepto Coordinación Externa.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

COMITÉ DE EXPERTOS PEEC INMUNOHEMATOLOGÍA

TM. Mg. Cs. Leonor Armanet Bernal.

Directora Escuela de Tecnología Médica.
Universidad de Chile.

TM. Hugo Henríquez Bello.

Director Docente Escuela de Tecnología Médica.
Universidad Mayor.

Dr. Federico Liendo Palma.

Jefe Banco de Sangre/UMT.
Hospital Barros Luco Trudeau.

Dra. María Cristina Martínez Valenzuela.

Directora Centro de Sangre Concepción.

TM. Ramón Schifferli Salazar.

TM. Encargado de Calificación Microbiológica.
Centro de Sangre y Tejidos de Valparaíso.

Dra. Verónica Soto Arellano.

Jefe UMT Hospital Roberto del Río.
Jefe Banco de Sangre Clínica Dávila.

TM. Carolina Villalobos Urbina.

Director Técnico.
Centro Metropolitano de Sangre y Tejidos.

RECOMENDACIONES PARA LA CLASIFICACIÓN SANGUÍNEA RhD

RESUMEN

Este documento presenta las recomendaciones para el procedimiento de clasificación sanguínea RhD. Está dirigido a los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos, y ha sido consensuado con el Comité de Expertos del área de Inmunohematología y los participantes del I y II Taller Nacional de Inmunohematología PEEC, realizados en los años 2011 y 2012 respectivamente. Este procedimiento entrega las directrices para la realización de una adecuada clasificación sanguínea RhD, a fin de contribuir a la operación de cada institución para asegurar la calidad de la medicina transfusional.

ALCANCE

Estas recomendaciones aplican a los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos que realizan clasificación sanguínea RhD a donantes, pacientes y embarazadas según corresponda.

INTRODUCCIÓN

La determinación de grupos sanguíneos del sistema Rh se efectúa enfrentando glóbulos rojos problema con anticuerpos de especificidad conocida. El grupo Rh (D)

se determina por la presencia o ausencia del antígeno D sobre los glóbulos rojos, el cual puede ser detectado por una prueba de aglutinación directa con un suero clasificador anti-D. Una persona que posee en sus glóbulos rojos el antígeno D, se conoce como "Rh positivo", mientras que la ausencia del antígeno D denota a una persona "Rh negativo".

El antígeno D es altamente inmunogénico, lo cual le confiere la característica de ser el de mayor importancia clínica después de los antígenos del sistema ABO. Se estima que entre 30-85 % de las personas Rh D negativo que reciben una transfusión Rh D positivo producen anticuerpos anti-D causantes de enfermedad hemolítica fetoneonatal (en el caso de embarazadas), anemias hemolíticas autoinmunes y reacciones transfusionales.

La diversidad y complejidad antigénica del sistema Rh se genera por la disposición y proximidad de los genes RHD y RHCE en el brazo corto del cromosoma 1, lo que facilita la aparición de múltiples eventos de intercambio genético que originan las variantes débiles y parciales del antígeno D. Desde el punto de vista clínico, la variante parcial DVI se postula como la de mayor importancia en la población blanca.

Existen múltiples variables que pudieran influir en la determinación serológica del antígeno D, como la gran diversidad de metodologías, reactivos anti-D, polimorfismos del sistema Rh, variantes del antígeno D, entre otras, por lo que este documento busca estandarizar y entregar recomendaciones para una adecuada clasificación sanguínea RhD.

DEFINICIONES Y ABREVIACIONES

D débil: corresponde al fenotipo cuyos eritrocitos poseen una cantidad reducida del antígeno D y requieren, por tanto, de la prueba de antiglobulina indirecta para su detección.

D parcial: corresponde al fenotipo cuyos eritrocitos son catalogados como D positivos, pero carecen de una porción del antígeno D, pudiendo estos pacientes aloinmunizarse cuando reciben transfusiones de glóbulos rojos D positivos.

Del: corresponde al fenotipo cuyos eritrocitos expresan niveles muy bajos del antígeno D, por lo que no pueden ser detectados con métodos serológicos de rutina.

Suero control D: control que permite evaluar la especificidad del suero anti-D empleado, ya que al agregarlo a los glóbulos rojos en estudio no se observa aglutinación.

Variantes del antígeno D: designación de las variaciones en la expresión del antígeno D, lo cual incluye los fenotipos D débil, D parcial y Del.

Abreviaciones

ACD: Ácido cítrico, citrato, dextrosa.

CD: Suero Control D

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

PAD: Prueba antiglobulina directa.

PBS: Buffer fosfato salino.

AGH: Antiglobulina humana

DESARROLLO

Muestra

La muestra adecuada para realizar la clasificación RhD es sangre completa con o sin anticoagulante (EDTA, ACD). Los glóbulos rojos pueden ser suspendidos en suero o plasma autólogo, o suero fisiológico.

Reactivos

- Sueros clasificadores o tarjetas de geles que contengan anti-D: Debe tener presente que existen sueros de alto contenido proteico, bajo contenido proteico, de naturaleza IgM o mezclas IgM + IgG. Debe seguir cuidadosamente las instrucciones de uso del fabricante verificando y documentando los ajustes que sean necesarios.
- Suero control D.
- Suero fisiológico, PBS o solución diluyente recomendada para la técnica utilizada.
- Suero antiglobulina humana (SAGH) o tarjetas de geles de Coombs poliespecíficos.
- Células control AGH.

Técnicas

Se recomienda la utilización de técnicas manuales, semiautomatizadas y automatizadas de tubo, sistema de geles y sistema de microplaca. La utilización de técnica en lámina para la clasificación RhD no constituye una metodología reconocida por el Instituto de Salud Pública de Chile, debido a lo siguiente:

- De las técnicas para clasificación RhD, es la menos sensible.
- No permite detectar las variantes débiles y parciales del antígeno D.

Dado lo anterior, la técnica en lámina sólo sirve como técnica para “reclasificar” y verificar grupo establecido por una técnica sensible, no puede ser utilizada en la rutina y no es reconocida para informar resultados en el Programa de Evaluación Externa de la calidad (PEEC) de Inmunohematología.

Procedimiento

Para lograr resultados confiables, seguros y de la calidad esperada, debe realizar una lectura acuciosa del inserto del reactivo o técnica, para su cabal comprensión, debiendo seguir rigurosamente todas las indicaciones establecidas en él. También debe hacerse cada vez que se cambia un reactivo o procedimiento. Con lo anterior, el laboratorio debe definir el procedimiento a realizar, para la correcta aplicación de la técnica. A partir del inserto debe elaborarse el Procedimiento Operativo Estándar, de acuerdo a la técnica y equipos a usar, describiendo al menos el sistema de identificación de muestras, los protocolos a usar, la técnica de lectura, la validación del método y el informe de resultados.

A modo de ejemplo se entrega el siguiente procedimiento tipo:

1. Numerar las muestras a clasificar y centrifugarlas de acuerdo al tiempo estandarizado en la centrifuga para obtener suero o plasma.
2. Preparar en un tubo una suspensión de los glóbulos rojos a tipificar en su propio suero o plasma, o en PBS. Esta suspensión se debe preparar de acuerdo al inserto de la técnica a utilizar: Ej: Tubo: 2-4%, Gel: 0,8-1%, Microplaca: 1-3%.
3. Para cada muestra a clasificar, se deben efectuar las reacciones de acuerdo a la tabla n° 1.
4. Mezclar y centrifugar de acuerdo a la calibración de la centrifuga para lectura, o a los tiempos y revoluciones establecidas por el proveedor.
5. Observar en busca de aglutinación y hemólisis, de acuerdo a la técnica de lectura automatizada o manual que recomiende el fabricante. En caso de no existir usar aquella técnica que permita una mayor sensibilidad del método.
6. Registrar los resultados obtenidos de acuerdo a la tabla n° 2 de intensidad de reacción.

Tabla n° 1

TUBO	SUERO O PLASMA	GLÓBULOS ROJOS	UTILIDAD
D	anti-D (comercial)	Muestra en concentración adecuada	Determinación de antígeno D en GR.
CD	Suero control D o PBS	Muestra en concentración adecuada	Determina especificidad del suero anti-D. Control debe dar negativo.

Tabla n° 2

INTENSIDAD DE REACCIÓN	SCORE O PUNTAJE	AGLUTINACIÓN TUBO/MICROPLACA	AGLUTINACIÓN GEL
4+	12	Botón único. Fondo claro. Sin células libres.	Banda homogénea de aglutinados en la parte superior de la columna.
3+	10	Varios aglutinados de gran tamaño. Fondo claro. Sin células libres.	Banda superior de aglutinado y desplazamiento en la parte superior de la columna.
2+	8	Muchos aglutinados de mediano tamaño. Fondo claro. Sin células libres.	Aglutinados pequeños en la columna y a lo largo de la columna.
1+	5	Numerosos aglutinados pequeños. Fondo turbio por GR libres.	Algunos aglutinados pequeños en la columna.
+/-	2	Apenas la aglutinación es visible. Fondo turbio por GR libres.	Escasos aglutinados de pequeño tamaño en la columna.
0	0	Ausencia de aglutinación	Banda de GR al fondo de la columna, resto de la columna sin aglutinados.

Se debe respetar la relación suero o plasma/glóbulos rojos recomendada para cada técnica, la cual puede ser la recomendada por el proveedor o la estandarizada por el propio laboratorio. Ej. Tubo (2 gotas de suero o plasma + 1 gota de GR), Gel (50 uL de suero o plasma + 25 uL de GR), Microplaca (1 gota de suero o plasma + 1 gota de GR).

Interpretación

Si hay aglutinación igual o mayor a 2+ en el tubo D, sin aglutinación en el tubo CD, la persona es Rh positiva.

Si la aglutinación es igual a 1+ o negativa en el tubo D, debe continuarse el estudio en busca de variantes débiles o parciales del antígeno D.

Informe de resultados

Actualmente existen múltiples terminologías que se utilizan para informar los resultados de la clasificación RhD, no necesariamente todas de base correcta, pero que se han instaurado y se utilizan masivamente. Ej: Rh, RH, grupo, grupo sanguíneo, factor Rh.

Dado que la clasificación de grupo sanguíneo de utilidad clínica incluye el sistema ABO y el antígeno D del sistema Rh, la denominación recomendada es:

CLASIFICACIÓN ABO Y RhD: A RhD positivo; A RhD negativo; O RhD positivo...según corresponda al individuo clasificado.

ESTUDIO VARIANTES DÉBILES O PARCIALES DEL ANTÍGENO D

1. Las muestras a estudiar se deben preparar de acuerdo a la tabla n° 3.
2. Incubar los tubos durante 15 – 30 minutos a 37°C.
3. Si no existe aglutinación en esta etapa en ninguno de los tubos, se deben evaluar las muestras bajo la prueba de antiglobulina indirecta.
4. Observar en busca de hemólisis o aglutinación, registrando los resultados obtenidos de acuerdo a la tabla n° 4 de intensidad de reacción.

Tabla n° 3

TUBO	SUERO O PLASMA	GLÓBULOS ROJOS	UTILIDAD
D1	anti-D IgM (comercial)	Muestra en concentración adecuada	Determinación de antígeno D en GR. Al menos uno debe reconocer la variante DVI
D2	anti-D IgM/IgG (comercial)	Muestra en concentración adecuada	Determinación de antígeno D en GR. Al menos uno debe reconocer la variante DVI
CD	Suero control D o PBS	Muestra en concentración adecuada	Determina especificidad de los sueros anti-D. Control debe dar negativo
PAD	SAGH	Muestra en concentración adecuada	Determinación de GR sensibilizados "in vivo" con IgG o Complemento

Tabla n° 4

ANTI-D1/D2	CONTROL D	PAD	INFORME	OBSERVACIÓN
0/0	0	0	Rh negativo	Presencia de variante débil o parcial del antígeno D. Se recomienda derivar para estudio de identificación.
+/+	0	0	Rh positivo	
+/0 0/+	0	0	Rh positivo	
+/+ +/0 0/+	+	0	Imposible de interpretar	Estudios adicionales (Ej. Técnicas de elución y adsorción). Derivar para estudio de identificación a laboratorios que dispongan de las metodologías.
+/+ +/0 0/+	0	+	Imposible de interpretar	

Interpretación

El informe de resultados debe establecer claramente si el paciente o donante es “Rh positivo” o “Rh negativo”. La presencia de variantes débiles o parciales del antígeno D debe ser interpretado como “Rh positivo” si se trata de un donante y de “Rh negativo” si se trata de un paciente o receptor de transfusión. En estos términos, no se puede informar “Rh negativo, Du positivo” o “Rh negativo, Du negativo”.

La designación “Du” se encuentra actualmente obsoleta, por lo que se debe hacer referencia a una designación más amplia para estas variantes de D. Es correcto referirse a “Variantes débiles y parciales del antígeno D” o simplemente a “D variantes”.

Es necesario realizar un seguimiento a los casos “imposible de interpretar”, por lo que se deben esclarecer en el mismo laboratorio o derivar para estudio de identificación.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se deben seguir los procedimientos de control de calidad recomendados por los fabricantes de reactivos y equipos. Cada laboratorio debe realizar control de calidad en las siguientes situaciones:

- a) Con cada serie de clasificación:** los reactivos que se utilicen deben dar reacciones apropiadas e inequívocas, según la siguiente tabla:

	REACCIÓN POSITIVA	REACCIÓN NEGATIVA
Anti-D	Glóbulos rojos R ₁ r (*)	Glóbulos rojos rr (*)

(*) *Nomenclatura de Wiener para la designación de haplotipo.*

- b) Con cada nuevo lote de reactivos:** corresponde a la verificación para asegurar la conformidad con los criterios. Cualquier reactivo que no cumpla con las especificación requeridas para los test, no se debe utilizar.

- c) Con cada nueva técnica o tecnología:** además de probar los reactivos como se describen anteriormente, es conveniente realizar junto a este nuevo método, si es posible, en paralelo con el método que se estaba usando, de acuerdo al protocolo de verifi-

cación implementado en el laboratorio. Esto deberá asegurar que el método es apto para su uso rutinario.

d) Inspección visual

- **Etiqueta** debe contener el nombre del producto, el número de lote (serie), la fecha de vencimiento, las condiciones de almacenamiento y el nombre del fabricante o su logo.
- **Inserto del producto** debe aportar los mismos detalles que los señalados en la etiqueta, pero explicitando el método recomendado para su uso, los controles de calidad a aplicar, los diluyentes recomendados etc., que pueden ser necesarios, además de cualquier limitación o advertencias en el uso de ese reactivo. Debe incluir también detalles de la composición del reactivo, entregar las advertencias de bioseguridad, y aportar detalles para su uso seguro.

Todos los reactivos no-celulares deben estar libres de hemólisis, precipitados, partículas o formación de gel.

- e) Especificidad:** los reactivos deben dar reacciones positivas y negativas claras cuando es probado con el siguiente número de muestras:

GLÓBULOS ROJOS	ANTI-D
RhD Positivos	2
RhD Negativos	4

- f) Potencia:** se debe evaluar el límite de detección de reacciones específicas para cada suero en estudio (sensibilidad).

Se debe usar el siguiente número de muestras y títulos mínimos aceptables (en paréntesis):

GLÓBULOS ROJOS	ANTI-D
RhD Positivos	4 (32)

El reactivo sin diluir debe dar una reacción de al menos 3 +

g) Avidez: se deben producir reacciones observables en un tiempo dado. Es de utilidad para reactivos que sean utilizados en lámina para “reclasificar”.

Se debe usar el siguiente número de muestras, las cuales deben aglutinar dentro de los primeros 2 minutos.

GLÓBULOS ROJOS	ANTI-D
RhD Positivos	2

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos del país que realizan esta determinación deben participar en algún Programa de Evaluación Externa de la Calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Roback JD, editor. *AABB Technical Manual*, 17th ed., Bethesda, Maryland, 2011.
- American Association of Blood Banks. *AABB Standards for Blood Bank and Transfusion Services*, 25th ed., Bethesda, Maryland, 2008.
- Ministerio de Salud de Chile. *Orientaciones para Centros de Sangre y Unidades de Medicina Transfusional*, MINSAL, 2007.