

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

RECOMENDACIONES PARA LA CLASIFICACIÓN SANGUÍNEA RHD

VERSIÓN 1 | 2018

La presente versión responde fielmente al contenido de la Resolución Exenta N° 482 del 23.02.2018 del Instituto de Salud Pública de Chile, que aprueba el presente documento

AUTORES ISP

TM. Andrés Aburto Almonacid.
Encargado de Inmunohematología.
Sección Hematología e Inmunohematología.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

BQ. Hugo Moscoso Espinoza.
Jefe. Subdepto Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.
Jefe Subdepto Coordinación Externa.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

TM. Diego Zapata Tapia.
Profesional de Inmunohematología.
Sección Hematología e Inmunohematología.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

REVISORES EXTERNOS

Comité de Expertos PEEC Inmunohematología

TM. Guillermo Herrera Calderón.
Banco de Sangre de la Red de Salud UC Christus.

Dr. Federico Liendo Palma.
Jefe Banco de Sangre/UMT.
Complejo Asistencial Barros Luco Trudeau.

TM. Mg Cs. María Antonieta Núñez.
Supervisora Banco de Sangre.
Clínica Santa María.

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.

TM. Carolina Villalobos Urbina.
Jefe de Centro y Encargado de Calidad Banco de Sangre/UMT.
Complejo Asistencial Barros Luco Trudeau.

RECOMENDACIONES PARA LA CLASIFICACIÓN SANGUÍNEA RHD

RESUMEN

Este documento presenta una actualización de las recomendaciones para el procedimiento de clasificación sanguínea del antígeno Rh D. 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 de los Talleres Nacionales de Inmunohematología. Este procedimiento entrega las directrices para la realización de una adecuada clasificación sanguínea Rh D, a fin de contribuir a los procesos de cada institución para asegurar la calidad de la medicina transfusional. Esta versión del documento incluye las recomendaciones para el análisis de muestras discrepantes y pesquisa de antígenos D variantes.

ALCANCE

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

INTRODUCCIÓN

La determinación del antígeno D del sistema sanguíneo Rh, corresponde a la detección de la presencia o ausencia del antígeno D en la membrana de los glóbulos rojos. Se efectúa enfrentando glóbulos rojos del paciente o donante con anticuerpos con especificidad anti-D, y se visualiza macroscópicamente por aglutinación directa después de la centrifugación. Una persona que posee en sus glóbulos rojos el antígeno D, se conoce como “Rh D positivo”, mientras que la ausencia del antígeno D corresponde a una persona “Rh D negativo”.

A nivel biológico el sistema Rh está formado por 2 proteínas que se encuentran en la membrana del glóbulo rojo: Rh D y Rh CE, las que interactúan con la glicoproteína RhAG formando el complejo Rh.

El sistema sanguíneo Rh es el segundo en importancia clínica después del sistema ABO y el antígeno D es el más inmunogénico de todos los antígenos del sistema, esto se debe a una ausencia total de la proteína Rh en personas que son Rh D negativo.

Se estima que entre 30-85 % de las personas Rh D negativo que reciben una transfusión Rh D positivo se aloimmunizan produciendo anticuerpos anti-D, la aloimmunización también puede ocurrir por incompatibilidad feto-materna durante el embarazo (madre Rh D negativo y feto Rh D positivo).

Posterior a la aloimmunización, en un segundo evento transfusional o embarazo Rh D incompatible, se puede generar una reacción hemolítica post transfusional o enfermedad hemolítica feto-neonatal, respectivamente.

De acuerdo a la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT, sigla del inglés: International Society of Blood Transfusion), se han descrito 61 antígenos como parte de este sistema sanguíneo, siendo los de mayor importancia clínica los antígenos: D, C, E, c y e.

Además de individuos clasificados como Rh D positivo o Rh D negativo, existen personas (menor al 0,1%), que tiene un grupo Rh D variante, lo que se debe a la presencia en menor cantidad del antígeno D en la membrana, denominado variante débil, o a que el antígeno D carece de ciertos epítopes (sitio que se encuentra en el antígeno, donde se unen específicamente los anticuerpos), denominado variante parcial.

La generación de estas variantes obedece a causas genéticas, siendo dos las principales: recombinación génica entre el gen RHD y RHCE o mutaciones en el gen D. La primera se debe a la disposición y proximidad de los genes RHD y RHCE que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 1, que facilita el proceso de recombinación generando principalmente las variantes D parciales. Las mutaciones se producen en el gen RHD principalmente por cambios puntuales de nucleótidos en la secuencia nucleotídica, que originan las variantes Rh D débiles, y también algunas parciales.

Desde el punto de vista clínico, se ha descrito en caucásicos a la variante parcial DVI como la de mayor importancia, sin embargo, en población chilena no existen datos de frecuencia de variantes, ni del impacto clínico de los distintos tipos. Según el análisis de 66 muestras realizado en el Instituto de Salud Pública de Chile entre los años 2012-2016, la variante más prevalente fue D débil tipo 2 y D débil tipo 1 con un 24,2 y 9,1%, respectivamente.

En el año 2015, la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) y el Colegio de Patólogos Americanos (CAP) reunieron suficiente evidencia que recomienda la genotipificación RHD en mujeres embarazadas cuando un fenotipo D variante es detectado por los métodos de rutina. Esta medida permitiría optimizar el uso de la profilaxis con Inmunoglobulina anti-D y el stock de unidades RhD negativas a pacientes que verdaderamente presentan riesgo de aloimmunizarse al antígeno D.

En la determinación serológica del antígeno D, existen múltiples variables que pueden influir en que se presenten discrepancias en los resultados intra o inter laboratorios, entre éstas se encuentran: variantes del antígeno Rh D, reactivos con diferentes clones de anticuerpos clasificadores y metodologías con distinta especificidad y sensibilidad.

El objetivo de este documento es estandarizar y entregar recomendaciones para una adecuada clasificación sanguínea Rh D, de acuerdo al algoritmo presentado en Anexo 1.

DEFINICIONES Y ABREVIACIONES

D débil: fenotipo cuyos eritrocitos expresan el antígeno D en cantidad reducida, que requieren de la prueba de antiglobulina indirecta para su detección. Los fenotipos D débil tipo 1, 2 y 3 son los de mayor frecuencia en la población.

D parcial: fenotipo cuyos eritrocitos carecen de una porción del antígeno D (falta de algún epítope del antígeno). Las personas con este fenotipo se pueden aloimmunizar por transfusiones de glóbulos rojos Rh D positivos o por embarazo con feto Rh D positivo. El fenotipo parcial DVI es el de mayor importancia clínica.

Del: 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: suero control certificado que no presenta anticuerpos. Se utiliza como 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: Expresión fenotípica presente en menos del 1% de la población, tienen una expresión disminuida o parcial del antígeno D en glóbulos rojos, incluye los fenotipos D débil, D parcial y Del.

ABREVIACIONES

AABB: Asociación Americana de Bancos de Sangre.

ACD: Ácido cítrico, citrato, dextrosa.

CAP: Colegio de Patólogos Americanos.

CD: Suero Control D.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

PAD: Prueba antiglobulina directa.

PBS: Buffer fosfato salino.

SAGH: Suero Antiglobulina humana.

DESARROLLO

Metodología para la determinación del antígeno RhD

Muestra

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

Reactivos

1. Suero clasificador: el formato a emplear depende de la metodología:

Técnica en tubo o microplaca:

Sueros clasificadores que contengan anticuerpos anti-D. Se debe tener presente que existen sueros de alto contenido proteico, bajo contenido proteico, de naturaleza IgM o mezclas IgM/IgG. Seguir cuidadosamente las instrucciones de uso del fabricante verificando y documentando los ajustes que sean necesarios. Existen reactivos de este tipo aprobados por la FDA y que son útiles para la detección del antígeno D en las fases directa y de antiglobulina humana indirecta (Anexo 2).

Microcolumnas en tarjetas:

El anticuerpo anti-D presente en la microcolumna debe cumplir las mismas características mencionadas para la técnica en tubo o microplaca.

Independiente de la técnica utilizada, cada laboratorio debe realizar la verificación de los reactivos antes de ser introducidos en el uso de rutina y realizar el control de calidad cada vez que se ejecute la técnica. El laboratorio debe disponer de procedimientos documentados para ambas actividades.

2. Suero control D certificado.

3. Suero fisiológico, PBS o diluyente recomendado por el fabricante para la técnica utilizada.

4. SAGH poliespecífico: en formato antisuero o en microcolumnas.

5. Células control SAGH.

Técnicas

Se recomienda la utilización de técnicas manuales, semiautomatizadas y automatizadas; ya sea en tubo, microcolumna o 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 su baja sensibilidad, resultados falsos negativos que produce y no permite detectar las variantes débiles y parciales del antígeno D.

Dado lo anterior, la técnica en lámina sólo sirve como técnica para “preclasificar” a los donantes de sangre y “reclasificar” para verificar el grupo sanguíneo al lado del paciente antes de una transfusión o en el proceso productivo de hemocomponentes.

Por lo tanto, la técnica en lámina no debe ser utilizada en la rutina y no es reconocida para informar resultados en el Programa de Evaluación Externa de la calidad (PEEC) de Inmunohematología.

Se recomienda utilizar una única metodología para la clasificación RhD y para la búsqueda de variantes del antígeno D para donantes, pacientes, embarazadas y recién nacidos. El informe de resultados para las variantes que se encuentren en estudio por biología molecular, debe decir “Rh D positivo (Variante)”, acompañados de una observación que para efectos transfusionales o embarazo debe ser considerado como “Rh D negativo” hasta que se resuelva su investigación por biología molecular.

Procedimiento

I CLASIFICACIÓN SANGUÍNEA RhD DE RUTINA

Para lograr resultados confiables, seguros y de la calidad esperada, la técnica a emplear debe ser verificada en el laboratorio antes de su uso en rutina, se debe realizar una lectura acuciosa del inserto del reactivo o técnica para su cabal comprensión, debiendo seguir rigurosamente todas las indicaciones establecidas en él. La verificación 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 de ejecución de técnicas, la verificación del método, el control de calidad interno y externo y el informe de resultados.

Se recomienda el siguiente procedimiento a utilizar:

1. Numerar las muestras a clasificar y centrifugarlas de acuerdo al tiempo estandarizado en la centrífuga 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 siguientes reacciones:

Tubo	Suero o Plasma	Glóbulos Rojos	Utilidad
D1	anti-D IgM o IgM/IgG (comercial)	Muestra en concentración adecuada	Determinación de antígeno D en GR. Al menos uno de los reactivos debe reconocer la variante DVI.
D2	anti-D IgM o IgM/IgG (comercial)	Muestra en concentración adecuada	Determinación de antígeno D en GR. Al menos uno de los reactivos debe reconocer la variante DVI.
CD	Suero control D o PBS	Muestra en concentración adecuada	Determina especificidad del suero anti-D. Control debe dar negativo.

- Mezclar y centrifugar de acuerdo a la calibración de la centrífuga para lectura, o a los tiempos y revoluciones establecidas por el proveedor.
- 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.
- Registrar los resultados obtenidos de acuerdo a la siguiente tabla de intensidad de reacción:

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 (25 uL de suero o plasma + 50 uL de GR), Microplaca (1 gota de suero o plasma + 1 gota de GR).

Interpretación de resultados

Si hay aglutinación igual o mayor a 3+ en ambos tubos D1 y D2, sin aglutinación en el tubo CD, la clasificación sanguínea es Rh D positiva.

Si la aglutinación es negativa en tubos D1 y D2, debe continuarse el estudio en el propio laboratorio en busca de variantes del antígeno Rh D.

Si la aglutinación es igual o menor a 2+ en tubos D1 y D2, debe continuarse el estudio molecular en laboratorios que dispongan de las metodologías, como el Laboratorio de Referencia del Instituto de Salud Pública de Chile para identificar el tipo de variante del antígeno Rh 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, factor Rhesus.

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 Rh D, por ejemplo:

A Rh D positivo

A Rh D negativo

O Rh D positivo

Otros, según corresponda al individuo clasificado.

II ESTUDIO VARIANTES DEL ANTÍGENO Rh D

1. Las muestras a estudiar se deben preparar de acuerdo al siguiente esquema:

Tubo	Suero o Plasma	Glóbulos Rojos	Utilidad
D3	anti-D IgG o IgM/IgG (comercial)	Muestra en concentración adecuada.	Determinación de antígeno D en GR. Debe reconocer la variante DVI.
C+	anti-D IgG	Glóbulos rojos R1r.	Control debe dar positivo.
C-	anti-D IgG	Glóbulos rojos rr.	Control debe dar negativo.
PAD	SAGH	Muestra en concentración adecuada.	Determinación de GR sensibilizados "in vivo" con IgG o Complemento.

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 siguiente tabla de intensidad de reacción:

anti-D3	Controles	PAD	Informe	Observación
0	OK	0	Rh D negativo	-
+	OK	0	Rh D positivo (Variante)	Presencia de variante débil o parcial del antígeno D. Se recomienda derivar para estudio de identificación.
+	OK	+	Imposible de interpretar	Realizar estudios adicionales (Ej. Técnicas de elución y adsorción). Derivar para estudio de identificación a laboratorios que dispongan de las metodologías.

Interpretación de resultados

El informe de resultados debe establecer claramente si el paciente o donante es “Rh D positivo” o “Rh D negativo”.

La presencia de variantes del antígeno Rh D debe ser interpretado como “Rh D positivo (Variante)” acompañados de una observación que para efectos transfusionales o embarazo debe ser considerado como “Rh D negativo” hasta que se resuelva su investigación por biología molecular.

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 del antígeno Rh D” o simplemente a “D variantes”.

Es necesario llevar un registro de los casos “imposible de interpretar” o “discrepantes” e informar al Instituto de Salud Pública de Chile a través del Registro de Indicadores Inmunohematológicos y derivar las muestras para estudio de identificación de tipo de variante Rh D.

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 R1r (*)	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 verificación 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 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 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
Rh D positivos	2
Rh D negativos	4

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

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

Glóbulos rojos	Anti-D
Rh D 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
Rh D positivos	2

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

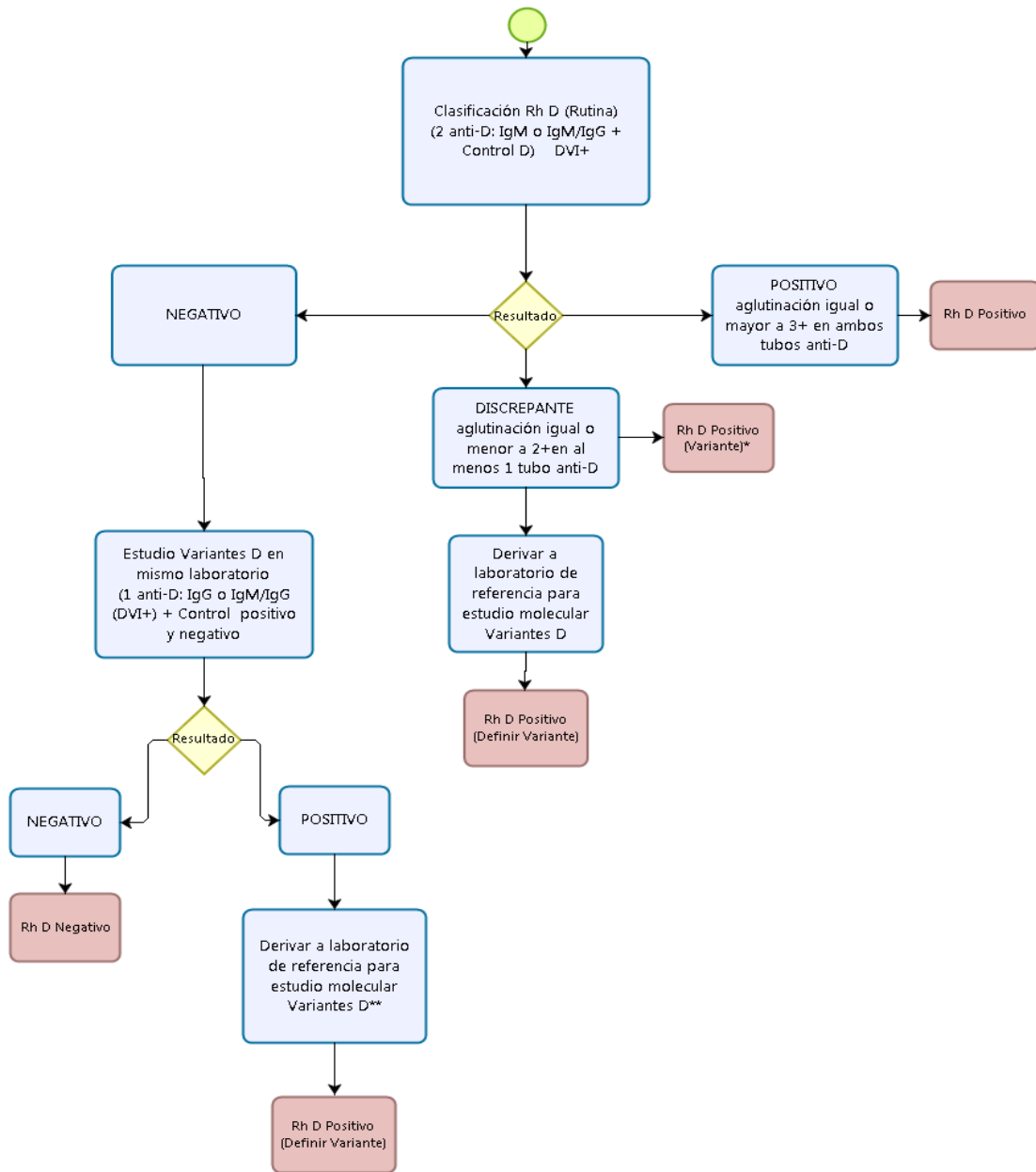
Los Centros de Sangre, Unidades de Medicina Transfusional, Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos del país que realizan esta determinación deben participar en algún Programa de Evaluación Externa de la Calidad.

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.
- Sandler G, Flegel W, Westhoff C, Denomme G, Delaney M, Keller M, Johnson S, Katz L, Queenan J, Vassallo R, Simon C. It's time to phase-in RHD genotyping for patients with a serological weak D phenotype. *Transfusion*; 55(3): 680-689, 2015.
- Cortés Buelvas A, Muñoz-Díaz E, León de González G. Inmunohematología básica y aplicada, 1° Edición. Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional, 2014.

ANEXO 1

Algoritmo recomendado por el laboratorio de referencia (ISP) para la clasificación Rh D en Chile.



* Este informe es preliminar a la espera de la confirmación de Variante en el laboratorio de referencia.

** Cada laboratorio puede realizar estudios adicionales (PAD, técnicas de elución-adsorción) que deben ser reportados al laboratorio de referencia.

ANEXO 2

Reactivos aprobados por la FDA para la pesquisa del antígeno D

Nombre del Reactivo Anti-D	Método	Clase y clones	
		IgM	IgG
Gamma-Clone	Tubo	GAMA401	F8D8
Immucor-4	Tubo	MS201	MS26
Immucor-5	Tubo	TH28	MS26
Ortho Bioclone Tube	Tubo	MAD2	Policlonal humano
BioRad Seraclone-Blend	Tubo	BS232	BS221, H41, 11B7
BioRad Seraclone-226	Tubo	BS226	-
Quotient Alba-Alfa	Tubo	LDM1	-
Quotient Alba-Beta	Tubo	LDM3	-
Quotient Alba-Delta	Tubo	LDM1, ESD1-M	-
Quotient Alba-Blend	Tubo	LDM3	EDS1
Immucor-Series 4	Galileo Echo, Neo	MS201	MS26
Immucor-Series 5	Galileo Echo, Neo	TH28	MS26
Ortho	Gel/Provue	MS201	-
PK1	PK7200/PK7300	P3X61	-
PK2	PK7200/PK7300	HM10	-
Blend	PK7200/PK7300	P3X61, P3X21223B10	P3X290, P3X35
BioRad 226	Tango	BS226	-
BioRad 232	Tango	BS232	-
Solidscreen II Blend	Tango	-	H411B7
Grifols	DG Gel/Erytra	P3X61	-