

FRECUENCIA DE ANTICUERPOS ANTI – HLA DE CLASE I EN DONANTES
MULTÍPARAS DE PLAQUETAS POR AFÉRESIS Y SANGRE TOTAL DEL
BANCO NACIONAL DE SANGRE DE LA CRUZ ROJA COLOMBIANA

Heidy Johana Hernández Casallas

Angie Carolina Romero Tibabuzo

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ

2011

FRECUENCIA DE ANTICUERPOS ANTI – HLA DE CLASE I EN DONANTES
MULTÍPARAS DE PLAQUETAS POR AFÉRESIS Y SANGRE TOTAL DEL
BANCO NACIONAL DE SANGRE DE LA CRUZ ROJA COLOMBIANA

Heidy Johana Hernández Casallas

Angie Carolina Romero Tibabuzo

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para

Optar título de

Bacterióloga(s)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ

2011

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros más sinceros agradecimientos a:

Al Doctor Guillermo Orjuela, por creer en nuestras capacidades y permitirnos realizar este estudio, y por guiarnos y apoyarnos durante todo el proceso.

A la Doctora Lorena Rodríguez, por la paciencia y los consejos, por su asesoría desinteresada y por abrirnos las puertas de su corazón.

A la cruz roja Colombiana por prestarnos las instalaciones del banco de sangre y proporcionarnos todos los materiales y reactivos necesarios para el desarrollo de este estudio.

DEDICATORIA

Johana Hernández Casallas

A mi mamá y mi hermano porque siempre me han apoyado y acompañado en todo. Y a mis amigas por su constante compañía y frases de aliento.

Angie Carolina Romero Tibabuzo

A mis padres, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis hermanos, abuelos. Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	13
2. INTRODUCCIÓN	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. MARCO TEÓRICO	18
4.1 Donación de sangre	18
4.2 Componentes sanguíneos	18
4.2.1 Componentes plasmáticos	18
4.2.2 Concentrados plaquetarios	19
4.3 Aféresis	19
4.3.1 Plaquetaféresis	19
4.4 Reacciones adversas a la transfusión	20
4.5 TRALI	20
4.5.1 Frecuencia	21
4.5.2 Características clínicas	23
4.5.3 Diagnóstico	24
4.5.4 Fisiopatología	25
4.5.5 Anticuerpos involucrados en TRALI	31
4.5.6 Técnicas para cuantificar anticuerpos (HLA clase I y II, NEUTRÓFILO)	33
4.5.7 Tratamiento	36
4.5.8 Medidas para prevenir TRALI	36
5. OBJETIVOS	40
5.1 GENERAL	40
5.2 ESPECÍFICOS	40
6. METODOLOGÍA	42
6.1 Selección de donantes	42
6.2 Obtención de muestras	42
6.3 Detección de anticuerpos anti-HLA clase I	43
7. RESULTADOS	46
7.1 Detección de anticuerpos anti-HLA de clase I en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	46

7.2 Descripción de las variables incluidas en el estudio	46
7.3 Edad de las donantes plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011.....	47
7.4 Relación grupo sanguíneo-RH en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	49
7.5 Gestaciones en las donantes de plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	51
7.6 Partos en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	53
7.7 Abortos en las donantes de plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	55
7.8 Transfusiones previas en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	56
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57
9. CONCLUSIONES	62
10. BIBLIOGRAFÍA	64
11. ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción de las variables incluidas en el estudio	46
Tabla 2. Descripción de las variables incluidas en el estudio	47
Tabla 3. Edad de las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre	47
Tabla 4. Relación grupo sanguíneo-RH en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	49
Tabla 5. Gestaciones en las donantes de plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	51
Tabla 6. Partos en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	53
Tabla 7. Abortos en las donantes de plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	55

INDICE DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 1. Frecuencia edad en las 88 donantes de sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011.....	48
Grafica 2. Frecuencia edad en las donantes de sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA de clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	49
Grafica 3. Frecuencia grupo sanguíneo y RH en las 88 donantes de sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	50
Grafica 4. Frecuencia grupo sanguíneo-RH en las donantes de sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA de clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	51
Grafica 5. Frecuencia número de gestaciones en las mujeres donantes de sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	52
Grafica 6. Frecuencia número de gestaciones en donantes de sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA de clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	53
Grafica 7. Frecuencia número de partos edad en donantes de sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	54
Grafica 8. Frecuencia número de partos en donantes de sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA de clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	54
Grafica 9. Frecuencia número de abortos en mujeres donantes de sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	55
Grafica 10. Frecuencia número de abortos en las donantes de sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011	56

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Muertes probablemente debido a TRALI y numero de notificaciones de sospecha de TRALI por año	22
FIGURA 2. Esquema de la fisiopatología del modelo de lesión pulmonar aguda producida por la transfusión (TRALI) inmune y del modelo de TRALI no inmune.	28
FIGURA 3. Posible mecanismo patogénico de TRALI. Los neutrófilos y las células del endotelio vascular cumplen el rol principal	30
FIGURA 4. Anticuerpos del donantes identificados en casos de TRALI en el año 2007	32
FIGURA 5 . Propuesta modelo de acción de screening de anticuerpos anti-HLA clase I y II para el diferimeinto de las donantes	61

INDICE DE ANEXOS

- 1.** Base de datos donantes de plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre de 2011
- 2.** Base de datos 88 donantes de plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre de 2011
- 3.** Orden del montaje de las muestras en la placa de ELISA
- 4.** Inserto de la prueba de ELISA AbScreen HLA class I, BioRAD
- 5.** Resultado de la medición de las absorbancias de todos los pozos contenidos en la placa de ELISA

1. RESUMEN

La lesión pulmonar aguda asociada a la transfusión (TRALI) es un síndrome clínico que puede constituir una amenaza para la vida y que se caracteriza por insuficiencia respiratoria aguda y edema pulmonar no cardiogénico durante o después de una transfusión de productos hemáticos. Actualmente es una de las reacciones adversas a la transfusión con mayor morbilidad y mortalidad. Se han propuesto dos etiologías. La primera es un episodio mediado por anticuerpos debido a la transfusión de anticuerpos contra el antígeno leucocitario o anticuerpos antigranulocito a pacientes cuyos leucocitos presentan antígenos afines. Estos anticuerpos anti-HLA se encuentran en el plasma del donante. La segunda es un modelo en el que se precisan dos eventos: el primero está relacionado con el cuadro clínico del receptor que produce activación endotelial y aumento de permeabilidad capilar. Este estudio hecho por primera vez en Colombia, evaluó la prevalencia de anticuerpos anti-HLA clase I en mujeres donantes multíparas de plaquetaféresis y sangre total del Banco Nacional de Sangre Cruz Roja Colombiana (BNS-CRC) por medio de la técnica ELISA, teniendo en cuenta además la frecuencia de donantes recibidas según la edad, grupo sanguíneo, Rh, número de gestaciones, partos, abortos, y antecedentes de transfusión. Los resultados mostraron una prevalencia del 15.9% de positividad para anticuerpos anti HLA de clase I, de un total de 88 donantes seleccionadas, demostrando así la importancia de realizar nuevos estudios que conduzcan a la creación de nuevas políticas de diferimiento de donantes femeninas, implementándose como medida preventiva de TRALI.

2. INTRODUCCIÓN

TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury) o lesión pulmonar aguda producida por transfusión es un síndrome clínico que se presenta como hipoxemia aguda y edema pulmonar durante o después de una transfusión de productos hemáticos. Ha sido la causa más frecuente de muertes relacionada con la transfusión sanguínea durante 3 años consecutivos en EE.UU. y la segunda en el Reino Unido (LK, 2005).

Múltiples estudios han demostrado la asociación de TRALI con la presencia principalmente de anticuerpos anti-HLA y anti-neutrófilo en el componente transfundido. Aunque todas las clases de hemocomponentes han sido implicados en casos de TRALI, aquellos ricos en plasma, como el plasma fresco congelado (PFC) y las plaquetas, son los más comprometidos, seguido de las unidades de glóbulos rojos (SHOT, 2009). Debido a que estos anticuerpos suelen ser formados luego de exposiciones a antígenos extraños como ocurre con las transfusiones o la gestación, varias de las medidas preventivas se han enfocado en la elegibilidad de las mujeres multíparas como donantes.

No hay, sin embargo, relación causal directa entre la presencia de anticuerpos y TRALI. De tal forma, la presencia de anti-HLA o anti-neutrófilo en un componente no siempre resulta en reacción transfusional e incluso, componentes negativos para esos anticuerpos, también han estado involucrados con la reacción.

En ciertos bancos de sangre alrededor del mundo, una aproximación a la prevención del TRALI se ha centrado en el tamizaje de anticuerpos anti-HLA y anti-neutrófilo en el suero de donantes mujeres multíparas y donantes con historia de transfusiones, al menos para determinar su elegibilidad para donar componentes ricos en plasma.

No existen datos en el país acerca de la incidencia de TRALI, ni tampoco ninguna medida preventiva ha sido adoptada al interior de los centros de captación de hemocomponentes.

Este estudio pretende determinar la presencia de anticuerpos anti-HLA en una muestra (suero) de mujeres donantes de plaquetas por aféresis y de sangre total en el Banco Nacional de Sangre de la Cruz Roja Colombiana y valorar la pertinencia de introducir este análisis como examen de rutina para la selección de donantes, particularmente las potenciales participantes del programa de plaquetas por aféresis.

3. JUSTIFICACIÓN

Siguiendo la tendencia mundial, la lesión pulmonar aguda asociada a la transfusión (TRALI) es escasamente diagnosticada en Colombia. El deterioro clínico de un paciente después de una transfusión, en particular de sus parámetros ventilatorios, se suele asociar a su condición de base o a una causa multifactorial.

El Instituto Nacional de Salud ha introducido recientemente un mecanismo de reporte para los casos que registran TRALI en Bogotá pero no se disponen de datos estadísticos publicados, aun cuando se reporta en el mundo como la primera causa de morbimortalidad secundaria a la transfusión de componentes sanguíneos. A nivel nacional el formato de reporte de reacciones adversas a la transfusión fue implementado solo a partir de este año. Únicamente la ciudad de Bogotá cuenta con un formato de registro que diferencia cada uno de los tipos de reacciones adversas a la transfusión.

Según el sistema de hemovigilancia Food and Drug Administration (FDA) en los EE.UU. reportó que del 2005 a 2007 hubo una mortalidad 55% de los casos totales de TRALI mientras que el sistema de hemovigilancia del Reino Unido Serious Hazards of Transfusion (SHOT) se reportó que de 1996 a 2007 hubo una mortalidad del 35% de los casos totales de TRALI. Algunos centros en EE.UU y Reino Unido optaron medidas preventivas como solo obtener PFC de donantes masculinos y realizar screening de anticuerpos anti-HLA y anti-neutrófilo a las donantes multíparas ya que 65% a 90% de los casos de TRALI estos anticuerpos están involucrados (Blajchman, 2009).

El objeto de un banco de sangre es coleccionar, procesar y suministrar hemocomponentes de la mejor calidad y con menor riesgo posible para el paciente. Dado que parte del modelo de fisiopatología del TRALI involucra directamente a los donantes, es responsabilidad de estos centros investigar e introducir medidas que mitiguen la aparición de esta reacción transfusional. El

programa de donación automatizada de plaquetas por aféresis del Banco Nacional de Sangre de la Cruz Roja Colombiana fue puesto en marcha hace tres años. Actualmente se obtiene un promedio de 150 concentrados plaquetarios mensuales. Más de la mitad de los donantes del programa son mujeres y no se hace de rutina seguimiento a los productos de plaquetas entregados en busca de TRALI. Correlacionando con los datos aportados en la literatura, donde las mujeres multíparas son un grupo de riesgo, resulta de interés establecer la presencia de anticuerpos anti-HLA en las mujeres candidatas a plaquetaféresis y su correlación con antecedentes como la paridad y el historial de transfusiones, actualmente no tenidos en cuenta como criterio de elegibilidad. Igualmente este estudio piloto permitirá aproximarse a una evaluación de la pertinencia de introducir este tamizaje de forma rutinaria.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Donación de sangre

En el *Manual de normas técnicas, administrativas y de procedimientos en bancos de sangre* (resolución 0901 de 1996) se define como donante, a la persona que da sin retribución económica y a título gratuito y para fines preventivos, terapéuticos, de diagnóstico o de investigación, una porción de su sangre en formas voluntaria, libre y consciente. Para ser donante se deben cumplir con ciertos requisitos estipulados en el mismo documento. El Decreto 1571 del 12 de Agosto de 1993, establece las normas que regulan la obtención, procesamiento, transporte, y utilización de la sangre y de sus componentes.

4.2 Componentes sanguíneos

Los componentes sanguíneos incluyen glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y derivados de plasma. Estos pueden ser obtenidos por métodos físicos a partir de la sangre total obtenida de la donación, (centrifugación, congelación, separación) o mediante aféresis. Su obtención se lleva a cabo en bolsas múltiples (sistema cerrado) manteniendo al máximo a esterilidad de cada uno de ellos, y su periodo de almacenamiento y conservación depende de la viabilidad y estabilidad de cada uno de los componentes (manual de normas técnicas, administrativas y de procedimientos en bancos de sangre, 1996).

4.2.1 Componentes plasmáticos

Entre los componentes plasmáticos encontramos el plasma fresco congelado, el plasma congelado y el crioprecipitado (manual de normas técnicas, administrativas y de procedimientos en bancos de sangre, 1996).

4.2.1.1 Plasma fresco congelado

Es el plasma que se obtiene a partir de una unidad de sangre total, a la cual dentro de las ocho horas siguientes a su recolección, se centrifuga y se repara el componente celular del plasmático, inmediatamente el plasma es congelado a menos 18 °C o inferior. Su duración es de un año.

4.2.1.2 Crioprecipitado

Es la fracción del plasma insoluble al frío, obtenida a partir del plasma fresco congelado que ha sido descongelado bajo condiciones controladas; después de completado descongelamiento, el plasma deberá ser centrifugado a la temperatura de 4 °C más o menos 2 °C. El producto final deberá contener como mínimo 80 unidades internacionales de factor VIII: C por unidad.

4.2.2 Concentrados plaquetarios

El concentrado de plaquetas es una suspensión de plaquetas en plasma preparada mediante centrifugación de una unidad de sangre total o mediante aféresis. El concentrado obtenido a partir de una unidad de sangre total, se compone de 50 a 70 ml de plasma, el cual deberá contener como mínimo $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas en por lo menos el 75% de las unidades evaluadas al tiempo máximo de conservación. El concentrado obtenido por aféresis deberá contener como mínimo 3×10^{11} en por lo menos el 75% de las unidades evaluadas. Las plaquetas deberán estar suspendidas en suficiente cantidad de plasma, para mantener a la temperatura de conservación un pH de 6.0 o mayor en las unidades evaluadas al final del período permitido de almacenamiento.

4.3 AFÉRESIS

Aféresis es la colección de sangre completa de un donante o un paciente, seguido con la separación de la sangre en componentes, retención del componente deseado y la devolución del resto de los elementos sanguíneos al donante o al paciente (manual de normas técnicas, administrativas y de procedimientos en bancos de sangre, 1996).

4.3.1 Plaquetaféresis

Plaquetaféresis entonces el procedimiento mediante el cual se extrae de un donante sangre total, con el objeto de obtener concentrado de plaquetas y re-infundirle los glóbulos rojos y el plasma no utilizado (DECRETO 1571, 1993). Para

dicho procedimiento se deben cumplir los requisitos establecidos por el manual de normas técnicas, administrativas y de procedimientos en bancos de sangre.

4.4 Reacciones adversas a la transfusión

A pesar de las numerosas pruebas y controles que se realizan sobre una unidad de sangre o de algún componente sanguíneo, existe la posibilidad que se presenten reacciones transfusional, algunas de ellas poniendo en alto riesgo la vida del paciente. Las reacciones pos-transfusionales se pueden clasificar según el tiempo de aparición en inmediatas y tardías, y según su mecanismo de producción en inmunes y no inmunes. Las inmunes inmediatas se manifiestan como: hemólisis, choque anafiláctico, urticaria, fiebre no hemolítica, alergia o TRALI. Las inmunes tardías representan, púrpura pos-transfusional, enfermedad injerto contra huésped, infiltrados pulmonares o hemólisis retardada. Las no inmunes inmediatas se asocian con contaminación bacteriana e hipervolemia y las no inmune tardías con la transmisión de agentes infecciosos (Vázquez JA, 2002).

4.5 TRALI

National Heart Lung and Blood Institute define que es una lesión pulmonar aguda que ocurre durante o dentro de 6 horas posteriores a la transfusión. Ya que cada unidad de sangre o componente sanguíneo puede llevar uno o más de los agentes causales: anticuerpos anti-leucocitos, sustancias biológicamente activas (Pearl Toy, 2005). Su desarrollo está relacionado con la presencia de anticuerpos en el plasma del donante que se han desarrollado durante el embarazo o durante una transfusión sanguínea (Soni, 2009).

Esta complicación constituye una forma de incompatibilidad entre productos sanguíneos del donador y el receptor, entre los cuales se encuentran anticuerpos anti-HLA (Ji Hyun Lee, 2010) o anticuerpos contra neutrófilos en el plasma de la mayoría de donadores (Yoke Lin Fung, 2008) (Emmanuel A. Fadeyi, 2007); pero además, el TRALI puede ser debido a componentes lipídicos liberados por los eritrocitos durante el almacenamiento del componente sanguíneo, estos lípidos

activan a los neutrófilos ocasionando reacciones inflamatorias en el receptor (Soni, 2009). La presencia de alo-anticuerpos anti-HLA se presentan con una gran frecuencia en el plasma de donantes femeninas y sus niveles aumentan con el número de embarazos (Amy Powers, 2008) (Triulzi DJ, 2009), la presencia de anticuerpos anti-HLA en mujeres multíparas se ha visto claramente asociado con el desarrollo de TRALI (Rutger, 2010) por lo cual la medición de los niveles de anticuerpos anti-HLA en las donantes multíparas es una potencial medida preventiva para la disminución del riesgo de TRALI.

4.5.1 Frecuencia

La incidencia de la enfermedad se ha visto afectada por la falta de reconocimiento de los casos o la falta del reporte de los mismos, pues hay evidencia de que la enfermedad ha sido sub-diagnosticada y sub-reportada (Catherine E. Chapman, 2009).

Entre los años 2005 y 2007 la FDA reporto 177 casos de muertes relacionadas con la transfusión de las cuales 98 (55%) fueron atribuidas a TRALI, manteniéndose como la principal causa de muerte asociada a la transfusión. En el año 2006, 22 casos reportados (63%) fueron asociados a la transfusión de plasma fresco congelado, mientras que en el año 2007 solo se asoció un 35% de los casos al mismo componente. Adicionalmente se observó un incremento en el número de casos reportados de TRALI asociados a la transfusión de glóbulos rojos, con 5 casos reportados en el año 2006, a 12 casos reportados en el año 2007 (FDA, 2007).

En el año 2003 el SHOT reporto un total de 12 muertes por transfusión de las cuales 8 (66%) fueron atribuidas a TRALI, los principales componentes sanguíneos implicados fueron el plasma fresco congelado y plaquetas. Tras la implementación de medidas preventivas de TRALI, como el screening de anticuerpos anti-leucocitarios en mujeres multíparas, y la transfusión de plasma masculino principalmente se ha visto una significativa reducción en la morbilidad y

mortalidad por TRALI (**Fig.1**). Para el año 2009 se presentaron un total de 21 casos de TRALI, de los cuales 2 fueron mortales. Solo se identifica el componente sanguíneo asociado en 8 de los 21 casos, de los cuales 2 fueron asociados a plasma fresco congelado, 3 a glóbulos rojos y 3 a plaquetas (SHOT, 2009).

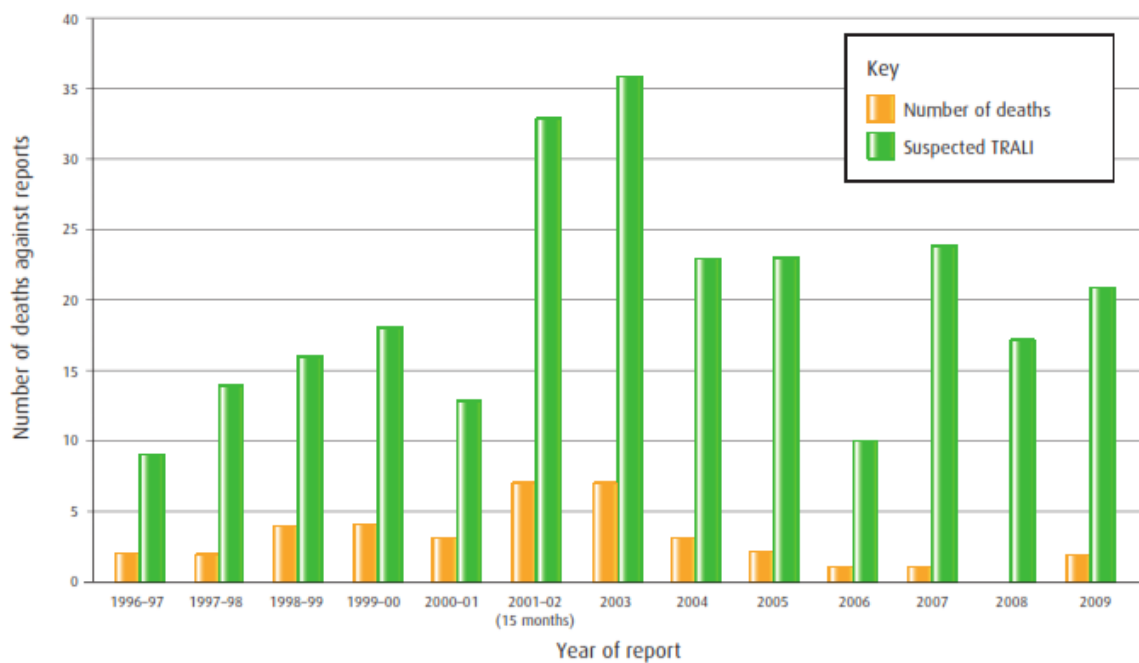


Figura 1. Muertes probablemente debido a TRALI, y número de notificaciones de sospecha de TRALI por año. Tomado de Serious hazards of transfusion (SHOT), annual report, 2009.

Un reporte de 10 años del sistema de Hemovigilancia en Reino Unido encontró que para el año 2003 el riesgo de TRALI según el componente sanguíneo transfundido, fue 7 veces más alto por plasma fresco congelado y 8 veces más alto por plaquetas que por glóbulos rojos (Catherine E. Chapman, 2009). Actualmente se sabe que el número de reportes de TRALI es significativamente menor cuando se ha realizado transfusión de plasma proveniente de donantes de género masculino (Catherine E. Chapman, 2009).

Eder y colaboradores (Eder AF, 2007) informa que del 70 al 75 % de los casos mortales de TRALI notificados recientemente a la Cruz Roja Americana se asocian con donantes mujeres quienes tienen anticuerpos anti-leucocitos. Con esto realiza las siguientes recomendaciones principales: el diferimiento del plasma de las mujeres multíparas, la detección de las donantes con riesgo de alo-inmunización según su historia gestacional y transfusional y la realización de la prueba de detección de anticuerpos anti-leucocitarios (Schreiber, 2007).

La falta de registro se debe a varias razones. Primero, TRALI es una lesión pulmonar aguda, y todavía no existen criterios uniformes que distinguan entre TRALI y la lesión pulmonar aguda debida a otras causas. Segundo, algunos médicos atribuyen la lesión pulmonar a la transfusión masiva, en lugar de asociarla a una sola unidad transfundida. Tercero, el manejo y tratamiento para TRALI es en la actualidad el mismo que para otras lesiones pulmonares agudas, por ende los médicos que reconocen el síndrome no ven la razón para reportar el caso al banco de sangre. Cuarto, la distinción entre la sobrecarga de líquido intravascular y TRALI es complicada. Por último, hacer un diagnóstico de TRALI es costoso para los servicios tranfusionales (Kopko PM M. C., 2002) (Toy P L. C., 2007).

4.5.2 Características clínicas

TRALI es un síndrome que ocurre dentro de las 6 horas posteriores a la transfusión, la mayoría de los casos se presenta ya sea durante la transfusión o dentro de las primeras 2 horas (Silliman CC A. D., 2006). Los síntomas que encontramos son disnea, hipoxemia aguda, edema pulmonar no cardiogénico, hipotensión que no responde a la administración de líquidos y fiebre dada por 1-2°C por encima de la temperatura pre-transfusión. Se diferencia de una sobrecarga circulatoria por presentarse una presión venosa normal (Popovsky M. A., 2006). Los hallazgos fisiológicos incluyen cianosis, fiebre, taquicardia, hipotensión o hipertensión. La auscultación del tórax revela crepitantes difusos y

disminución del murmullo vesicular. El examen radiográfico revela infiltrados bilaterales consistentes con el edema pulmonar que presenta el paciente (Silliman CC A. D., 2006). Los hallazgos de laboratorio muestran leucopenia aguda transitoria, anticuerpos anti-leucocitarios (HLA I y II o granulocitos), aumento de la actividad de los neutrófilos en el plasma del producto sanguíneo (Pearl Toy, 2005). Los signos y síntomas que se ven en prácticamente en todos los pacientes son dificultad respiratoria, hipoxemia, disnea e infiltraciones pulmonares bilaterales en la radiografía de tórax; los comunes son hipotensión, taquicardia, cianosis y fiebre; los que se ven raramente hipertensión (Bux, 2011).

4.5.2.1 Predisposición del paciente a desarrollar TRALI

El estado clínico del paciente juega un papel importante en la patogénesis de TRALI. Hay ciertos eventos clínicos que pueden llevar al paciente a tener una mayor predisposición, mediante la activación del endotelio pulmonar que resulta en el secuestro de PMN en los pulmones. Entre ellos están: una cirugía mayor (<72 horas), infecciones activas (bacteriana o viral), transfusión masiva y administración de citoquinas (G-CSF). Un paciente en fase de inducción del tratamiento de hemopatías malignas, trasplantes de medula ósea y de órganos sólidos, pacientes con púrpura trombocitopenia trombotica tienen un mayor riesgo de presentar TRALI (Silliman CC A. D., 2006).

4.5.3 Diagnóstico

Los criterios diagnósticos se basan en la identificación inicial de lesión pulmonar aguda (ALI), el cual fue definido por la *North American European Consensus Conference* en 1994 e incluye (Pearl Toy, 2005):

1. Tiempo: Inicio agudo
2. Presión de oclusión de la arteria pulmonar < 18 mmHg o ausencia de evidencia clínica de hipertensión auricular izquierda
3. Radiografía de tórax: infiltrados bilaterales
4. Hipoxemia: PaO₂/ FIO₂ < 300 mmHg independiente del nivel de presión

espiratoria, o una saturación de oxígeno < 90% respirando aire ambiente

En adición para TRALI

1. Comienzo en las primeras 6 horas de la transfusión de hemoderivados
2. No existencia de ALI previa a la transfusión
3. TRALI es posible aunque exista otro factor de riesgo de ALI.
4. La transfusión masiva no debe excluir la posibilidad de TRALI.

El diagnóstico de TRALI se basa siempre en criterios clínicos, y en un segundo paso, la clasificación de origen inmunológico frente al no inmunológico (M. B. Funk, 2011).

4.5.3.1 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de un paciente que desarrolla bruscamente un cuadro de insuficiencia respiratoria tras una transfusión de productos hemáticos debe incluir sobrecarga hemodinámica (el paciente tiene una enfermedad cardiaca asociada, edema pulmonar cardiogénico), reacción anafiláctica (rash, urticaria, broncoespasmo), contaminación bacteriana de los productos hemáticos transfundidos (raro con los concentrados de hematíes, no se ve con el plasma, deterioro hemodinámico) y reacción hemolítica transfusional (hemólisis asociada a hipotensión) . Además, se debe tener en cuenta aquellos factores de riesgo de LPA/SDRA (lesión pulmonar aguda/síndrome de distrés respiratorio agudo), como shock séptico, síndrome de aspiración de contenido gástrico, contusión pulmonar, neumonía, sobredosis de fármacos, etc (LK, 2005).

4.5.4 Fisiopatología

El mecanismo fisiopatológico de TRALI se centra en la presencia de anticuerpos anti-HLA y anti-neutrófilo, en el plasma del producto transfundido, desde que Popovsky y Moore encontraron la presencia de estos en 89% de los casos de TRALI (Popovsky M. A., 2006). Actualmente se sabe que la presencia de estos

anticuerpos se encuentra con mayor frecuencia en el plasma de mujeres multíparas. En el año 2007, Silliman y colaboradores reportaron la asociación de TRALI con la presencia de lípidos biológicamente activos que se han asociado al tiempo de almacenamiento del producto sanguíneo antes de ser transfundido (Rutger A. Middelburg, 2011). Los hallazgos histológicos en los pacientes fallecidos por TRALI, han mostrado síndrome de diestres respiratorio agudo (ARDS), edema intersticial e intra-alveolar, extravasación de los neutrófilos al espacio intersticial, y alveolar con alteración de la arquitectura pulmonar. Se halló además un incremento en la cantidad de neutrófilos en vasos pequeños y capilares pulmonares (Bux J, 2007).

En TRALI se distinguen entonces dos principales agentes causales que producen el daño endotelial y llevan a un aumento de la permeabilidad vascular que finaliza en edema; estos son los anticuerpos anti-leucocitarios y sustancias biológicamente activas como lípidos y citoquinas que se acumulan durante el almacenamiento del componente sanguíneo y que tienen actividad de cebadores de los neutrófilos (Pearl Toy, 2005).

Hay dos hipótesis propuestas para explicar el mecanismo patogénico de TRALI. La primera hipótesis explica un proceso mediado por anticuerpos, en el que la patología es debida a la transfusión de anticuerpos anti-HLA (clase I o clase II), o de anticuerpos anti-granulocitos presentes en el plasma del donante, a pacientes cuyos leucocitos expresan los antígenos afines, o la presencia de anticuerpos anti-leucocitos en el plasma del receptor contra antígenos del donante. Luego, la interacción antígeno-anticuerpo produce activación de los neutrófilos y secuestro pulmonar mediado por el complemento, lo cual conduce al daño pulmonar característico de TRALI (Pearl Toy, 2005) (Emmanuel A. Fadeyi, 2007) (Silliman CC A. D., 2006) (Brian R. Curtis, 2006).

La segunda hipótesis es un modelo de dos eventos: el primero implica la condición

clínica de base del paciente, que puede producir activación del endotelio pulmonar y secuestro de neutrófilos; los eventos predisponentes son la cirugía mayor reciente (primera 72 horas), proceso infeccioso activo (bacteriano o viral), transfusión masiva y la administración de citoquinas (Silliman CC B. L., 2003). La infección es la condición clínica más común que predispone al TRALI (Pearl Toy, 2005) (Silliman CC A. D., 2006). El segundo evento involucra la transfusión de anticuerpos específicos contra las células polimorfonucleares (PMN), o contra otro tipo de sustancias modificadoras de la respuesta biológica como lo son lípidos y el ligando CD40. Estos activan a los neutrófilos que se adhieren a los capilares pulmonares, lo cual conduce al daño endotelial, escape del fluido capilar y TRALI (Brian R. Curtis, 2006) (Silliman CC A. D., 2006) (LK, 2005).

Con base en los estudios anteriores realizados, algunos autores proponen dos tipos de TRALI según la patogenia, el TRALI inmune, y el TRALI no inmune. **Fig. 2** (Swanson K, 2006)

El TRALI no inmune corresponde a la hipótesis de 2 eventos ya mencionada y el TRALI inmune corresponde a la primera hipótesis que explica el mecanismo mediado por anticuerpos que se dirigen contra los antígenos HLA y contra los antígenos neutrofílico humanos (HNA). De los anticuerpos con especificidad conocida, aquellos dirigidos contra HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a, HNA-3a (5b) y HLA –A2 son los más frecuentes (Davoren A, 2003). También se ha asociado a TRALI la presencia de anticuerpos dirigidos contra los antígenos HLA clase II; debido a que estos no se expresan en los neutrófilos se ha propuesto un posible mecanismo en el cual se ven involucrados los monocitos los cuales si expresan HLA II (Kopko PM P. T., 2003). El mecanismo consiste en la activación de los monocitos que liberan altos niveles de citoquinas como la IL-8, el factor de necrosis tumoral y leucotrieno B4, que actúan como cebadores de la actividad de los neutrófilos, llevando a TRALI (Kao GS, 2003) (J, 2005) (R.Curtis, 2011).

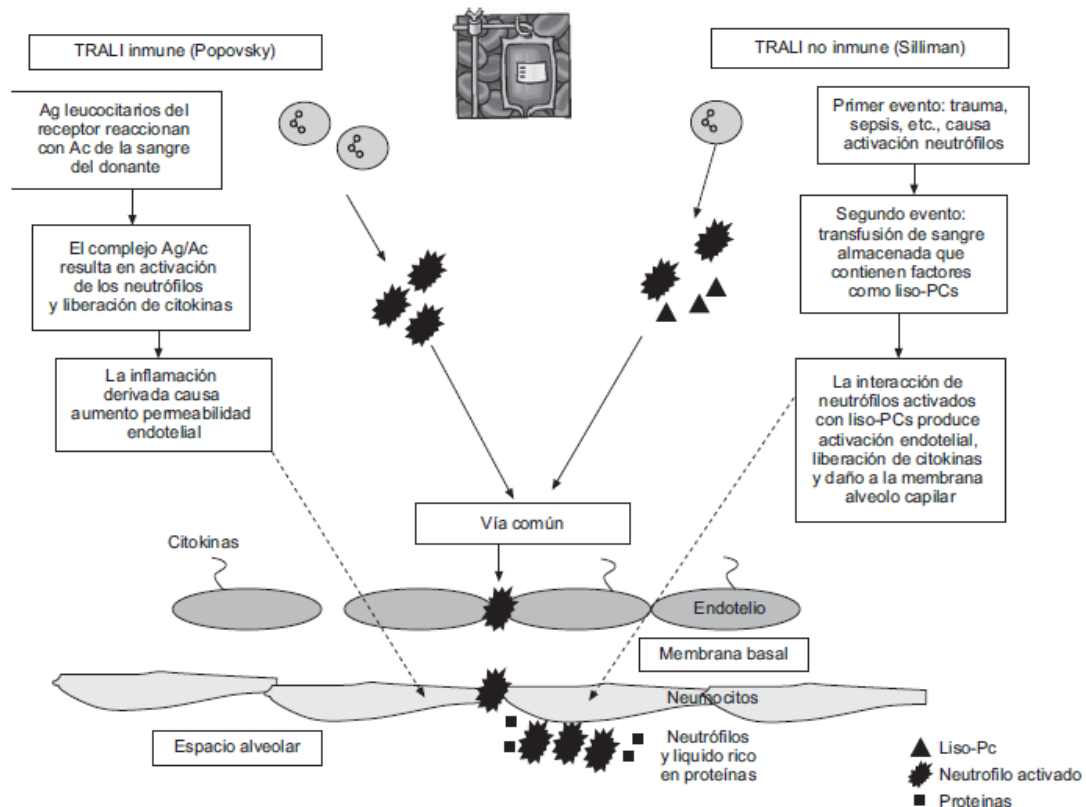


Figura 2. Esquema de la fisiopatología del modelo de lesión pulmonar aguda producida por la transfusión (TRALI) inmune y del modelo de TRALI no inmune. Modificado de Swanson K, Dwyre DM, Krochmal J, Raife TJ. Transfusion related acute lung injury (TRALI): Current Clinical and Pathophysiologic considerations. Lung 2006; 184:177-85

4.5.4.1 Vía Común: daño a la membrana alveolo capilar

Tanto en la forma inmune como en la no inmune, el neutrófilo es la célula efectora. Se debe considerar el tránsito de los neutrófilos a través del lecho vascular pulmonar en condiciones fisiológicas pues la red capilar pulmonar contiene una alta concentración de neutrófilos que circulan regularmente, el neutrófilo se deforma para pasar los capilares, pues su tamaño es mayor al diámetro de los vasos pequeños. La circulación de los neutrófilos cebados por sustancias biológicamente activas y otros antígenos lleva a que se presente un secuestro de

estos en la red capilar pulmonar, debido que al activarse el neutrófilo pierde la capacidad de deformarse para pasar por los vasos pequeños, quedando atrapado en estos. Al estar activados liberan radicales de oxígeno y otros elementos que dañaran las células endoteliales de los capilares pulmonares, lo cual se seguirá de un aumento de la permeabilidad vascular permitiendo el paso de líquido proteínico al espacio alveolar. Por otro lado también puede haber un reclutamiento de neutrófilos por activación inicial del endotelio pulmonar, cuyas células expresaran moléculas de adhesión que le permitiran al neutrófilo hacer una migración transendotelial. Por ejemplo la molécula de adhesión ICAM2 que la expresan las células vasculares, es un ligando de la β_2 -integrina expresada en los neutrófilos. posteriormente los neutrófilos seran cebados y activados produciendo daño pulmonar (Bux J, 2007).

Cualquiera que sea el mecanismo inicial, es necesario que se presente una interacción entre el neutrófilo y la célula endotelial para finalmente inducir TRALI (**Fig. 3**). El neutrófilo responde a los mediadores derivados de las células endoteliales activándose, expresando integrinas y liberando mediadores pro-inflamatorios, y el contenido de sus granulos, estas sustancias liberadas activan el endotelio, las células endoteliales movilizan selectinas, regulan positivamente la adhesión de proteínas y liberan mediadores inflamatorios, intensificando la adhesión de los neutrófilos y su activación. Es así como las barreras pulmonares se rompen permitiendo el paso de líquido proteínico y posteriormente de los neutrófilos al espacio alveolar (Bux J, 2007).

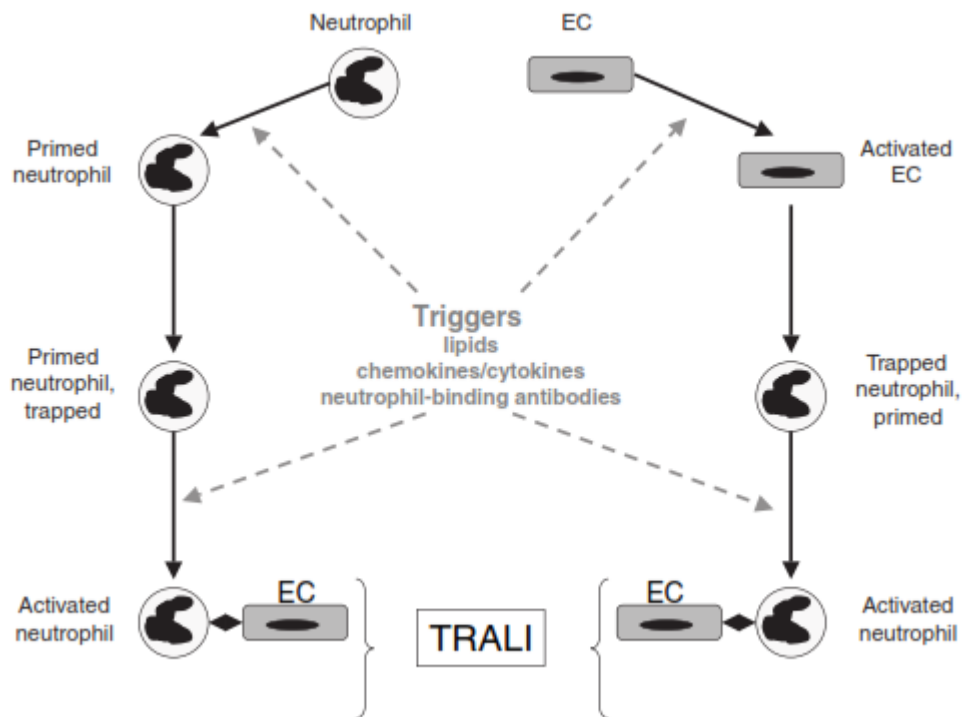


Figura 3. Posible mecanismo patogénico de TRALI. Los neutrófilos y las células del endotelio vascular cumplen el rol principal. Tomado de Bux J., Sachs U. The pathogenesis of transfusion related acute injury (TRALI). British Journal of Hematology. Vol.136. p. 788-799

4.4.1.2 TRALI en presencia de neutropenia

Tanto las reacciones antígeno - anticuerpo leucocitario como las derivadas de la actividad de los lípidos con capacidad de modificación de la respuesta biológica sobre los leucocitos primoactivados requieren la presencia de neutrófilos en el receptor. Sin embargo, existen casos raros de TRALI en pacientes neutrópicos. En estos casos se ha considerado que TRALI puede deberse a la transfusión de sustancias biológicamente activas, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (un eficaz factor de permeabilidad) y del CD 40 ligando (que estimula la síntesis y liberación de IL-1 β , prostaglandina E2 (PGE2) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) de los macrófagos pulmonares, células endoteliales y fibroblastos, intensifica la permeabilidad vascular y la inflamación). Además, se ha encontrado HLA tipo II en el endotelio vascular, por lo que en la transfusión de

anticuerpos anti-HLA tipo II serían capaces de producir lesión endotelial (LK, 2005).

4.5.5 Anticuerpos involucrados en TRALI

4.5.5.1 Complejo de antígenos leucocitarios humanos (HLA de Clase I y II)

Los antígenos son un grupo de glicoproteínas altamente polimórficas, los cuales se expresan en todas las células nucleadas. Las moléculas HLA de clase I contienen los antígenos A, B, C, F, G y se encuentran en la superficie de las plaquetas y en muchas células nucleadas del cuerpo incluyendo los linfocitos, granulocitos y monocitos. Entre los isotipos de clase I HLA-A, B, C su función es presentar antígenos a los LT CD8 y formar ligandos para los receptores de las células NK. Las moléculas HLA de clase II llevan los antígenos DM, DO, DP, DR, y DQ y están presentes en los linfocitos B, monocitos/ macrófagos y linfocitos T. Las tres moléculas sumamente polimorfa, HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, son las que presentan directamente antígenos peptídicos a los linfocitos T CD4, en tanto que las moléculas oligomorfas HLA-DM y HLA-DO tienen funciones que regulan la carga de péptidos de HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR (Brian R. Curtis, 2006).

4.5.5.2 Anticuerpos anti- HLA clase I

En los primeros estudios por Popovsky y Moore (Popovsky, 2002) se han detectado anticuerpos HLA clase I en el plasma de 59% de los donantes de sangre implicadas en 36 casos de TRALI, dando soporte a la hipótesis de que estos anticuerpos juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. La mayoría de los donantes de sangre implicados en estas reacciones son mujeres que han sido sensibilizadas a los antígenos fetales de embarazos múltiples. Específicamente HLA-A2 Y B12 han sido los tipos predominantemente identificados lo que sugiere que la especificidad del anticuerpo también cumple un papel importante en la patogenia de TRALI (Brian R. Curtis, 2006).

En el año 2007 la FDA reportó mayor prevalencia de anticuerpos anti-HLA clase I,

asociados a la transfusion en comparación con HLA clase II (FDA, 2007). (**Figura 4**)

FY07 Donor Leukocyte Antibodies	No.	%
HLA Class I	18	17%
HLA Class II	6	6%
HLA Class I and II	15	14%
HNA	17	16%
HLA and HNA	6	6%
Negative	42	41%
Total Donors Tested	104	100%

Figura 4. Anticuerpos del donante identificados en casos de TRALI en el año 2007. Tomado de fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion. Annual summary for fiscal year 2007.

4.5.5.3 Los anticuerpos anti-HLA de Clase II

El papel del HLA de clase II TRALI no ha sido bien identificado sin embargo una hipótesis propone que los monocitos, que expresan antígenos HLA de clase II, sirven como células efectoras en por lo menos algunas de las reacciones de TRALI. En apoyo de esta idea, Kopko demostró que la incubación de los anticuerpos HLA de clase II en el plasma de los donantes implicados en TRALI, con monocitos receptores causaba la activación de los monocitos e indujo una mayor producción intracelular de IL-1, TNF-alfa y factor tisular. La liberación de estas citoquinas podría resultar en la activación secundaria de neutrófilos y/o las células endoteliales que conducen a daño endotelial y TRALI (Kopko PM P. T., 2003). Algunos estudios reportan mayor prevalencia de anticuerpos anti HLA clase II en los casos relacionados con TRALI, y en el screening de mujeres múltiparas (Triulzi DJ, 2009) (Catherine E. Chapman, 2009).

4.5.5.4 Los anticuerpos específicos de los neutrófilos

Los neutrófilos tienen sus propios antígenos, siete antígenos de neutrófilos en

cinco diferentes glicoproteínas han sido total o parcialmente caracterizados y reciben el nombre de antígenos neutrófilos humanos (HNA), estos anticuerpos contra antígenos de neutrófilos son importantes ya que han estado implicados en TRALI, neutropenia alo-inmune neonatal y reacciones febriles transfusión. En TRALI participan anticuerpos dirigidos contra los antígenos HNA-1a (NA1), HNA-1b (NA2), HNA-2a (NB1), y HNA-3a (5b). Los anticuerpos contra el HNA-3a o antígeno 5b parecen ser especialmente importantes en los casos más graves de TRALI (Brian R. Curtis, 2006).

4.5.6 Técnicas para cuantificar anticuerpos (HLA I Y II, NEUTRÓFILO)

Las técnicas para la detección de anticuerpos HLA de clase I y clase II son: ELISA, citometría de flujo con microesferas, linfocitotoxicidad e inmunofluorescencia de linfocitos. La especificidad de los anticuerpos detectados por esta técnicas se puede identificar por FlowPra o por PCR que tipifica los antígenos HLA I y II, con una variedad de cebadores específicos de secuencia y sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (Brian R. Curtis, 2006) (K. Malanka, 2007) (Shiho Hashimoto, 2010) (P. Bierling, 2009) (Sillimna C, 2009) (David F. Stroncek, 2007). El método de citometría de flujo y ELISA son más sensibles que los ensayos de linfocitotoxicidad (Triulzi DJ, 2009). La técnica ELISA para la detección de anticuerpos anti –HLA de clase I y II es la más conveniente para el uso rutinario en los bancos de sangre, en algunos estudios realizados la consideran como la prueba Gold standard (A. Insunza, 2004) (Karen Quillen, 2011).

La técnica ELISA se ha introducido como alternativa al método de linfocitotoxicidad para la detección de anticuerpos anti-HLA, esta técnica se basa en el principio de presentación de antígenos HLA purificados como destino para la unión del anticuerpo del paciente. Esta unión específica del anticuerpo de la muestra del paciente con cualquiera de los antígenos, se detecta mediante una incubación posterior con el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina; que

reconoce sólo la IgG humana. Se obtiene una medida cuantitativa del alcance de la reacción mediante determinación espectrofotométrica tras añadir el sustrato de la enzima adecuada para el desarrollo de color (David F. Stroncek, 2007). La especificidad del método elimina reacciones falsas positivas no HLA y distingue reacciones de clase I y II; puede detectar anticuerpos específicos HLA que no unen el complemento no detectados mediante linfocitotoxicidad. También utiliza un segundo anticuerpo específico de cadena gamma para identificar positivamente el anticuerpo IgG en la muestra, esto es importante ya que distinguen anticuerpos IgG de IgM (Ralph R. Vassallo, 2010) (Anne F. Eder, 2010).

El método de citometría de flujo con microesferas recubiertas con antígenos HLA, mide la unión de aloanticuerpo que se detectan con fluoresceína (FITC anti-IgG), en el ensayo se utilizan seis perlas recubiertas con antígenos purificados de clase I, con un máximo de 48 antígenos por perla y tres perlas recubiertas con antígenos de clase II purificados, con un máximo de 48 antígenos por perla (Triulzi DJ, 2009).

La técnica de linfocitotoxicidad se realiza con un panel de linfocitos T con amplia representación de diferentes antígenos de clase I, los sueros que reaccionan con los antígenos del panel indican un nivel elevado de pre-sensibilización frente al HLA. Esta prueba se realiza a menudo en sueros tratados con ditiotreitól para eliminar la reactividad de IgM (Ralph R. Vassallo, 2010) (Anne F. Eder, 2010).

Para identificar y detectar anticuerpos anti – neutrófilo se puede utilizar métodos como: prueba inmunofluorescencia granulocitos (GIFT), prueba de aglutinación de granulocitos (GAT) y la inmovilización de anticuerpos monoclonales de antígenos de granulocitos (MAIGA) (Silliman, 2009) (David F. Stroncek, 2007). El ensayo de aglutinación de granulocitos es muy fiable, pero menos sensible que otros ensayos. Se pueden detectar anticuerpos frente a HNA-1, 2, 3, 4, 5 y antígenos, y es la prueba que mejor puede identificar anticuerpos específicos para HNA-3a

(David F. Stroncek, 2007); es de mejor indicación por su relevancia fisiológica, ya que demuestra la aglutinación directa de los anticuerpos que es el resultado de la quimiotaxis de los PMNs y la interacción monotipia PMN (Sillimna C, 2009).

En la prueba de inmunofluorescencia de granulocitos o ensayo de citometría de flujo, las reacciones antígeno-anticuerpo se detectan con anticuerpos secundarios conjugados con una molécula fluorescente usando un microscopio de fluorescencia. Los neutrófilos son tratados con paraformaldehído al 1% durante 5 minutos a 20 °C a 24 °C para evitar la unión no específica de anticuerpos contra receptores Fc de neutrófilos y para estabilizar las membranas celulares. La unión de anticuerpos a los neutrófilos se detecta con un fluorocromo conjugado a un anticuerpo secundario, la unión de los anticuerpos da como resultado un patrón uniforme en la parte exterior de los neutrófilos. Las pruebas de anticuerpos de neutrófilos por citometría de flujo es el mismo que la prueba de inmunofluorescencia de granulocitos, salvo que los neutrófilos son evaluados con un citómetro de flujo en lugar de un microscopio de fluorescencia (David F. Stroncek, 2007).

El ensayo MAIGA permite la detección de anticuerpos específicos de glicoproteínas en la membrana del neutrófilo. Este método puede ser utilizado para detectar anticuerpos específicos frente a HNA-1a, HNA-1b y HNA-1c anticuerpos en FcγRIIIb (CD16), HNA-2a en NB1 gp (CD177), HNA-4a componente del complemento del receptor C3bi (CR3 o CD11b), y HNA-5a en función del antígeno del leucocito-1 (LFA-1 o CD11a). El ensayo MAIGA permite el reconocimiento de anticuerpos contra las glicoproteínas específicas de neutrófilos, incluso cuando los anticuerpos a los antígenos HLA están presentes (David F. Stroncek, 2007).

Se ha encontrado en previos estudios que en los donantes a los cuales se les ha detectado e identificado anticuerpos anti- HLA y anti-neutrófilo, no todos sus

componentes sanguíneos que donaron causan TRALI en los receptores; varios factores son responsables como por ejemplo: título de anticuerpo, su afinidad/avidez, la densidad de antígenos afines y la presencia de factores no inmunológicos del paciente (K. Malanka, 2007).

4.5.7 Tratamiento

Un tratamiento exitoso depende del diagnóstico temprano y correcto de TRALI, por lo cual se debe hacer diagnóstico diferencial con diferentes patologías que presentan cuadros clínicos similares como sobrecarga circulatoria por transfusión, reacción anafiláctica, sepsis bacteriana asociada a la transfusión y reacción hemolítica transfusional (LK, 2005). En general, en cuanto aparezcan los síntomas de una reacción adversa se debe interrumpir de inmediato la transfusión sanguínea y avisar al banco de sangre (OMS, 2001). El tratamiento es de soporte, consiste en apoyo ventilatorio intenso con oxígeno suplementario o ventilación mecánica y uso de inotrópicos (Kopko PM P. M., 2004). Los casos más graves requerirán intubación endotraqueal y ventilación mecánica. La presencia de deterioro hemodinámico, en ocasiones presente, requiere la administración de fluidos. La falta de respuesta de la fluidoterapia obliga a la introducción de inotrópicos (Toy P G. O., 2004).

4.5.8 Medidas para prevenir TRALI

En varios países, los donantes son permanentemente diferidos; si el donante se difiriera depende de la especificidad de los anticuerpos: los donantes con anticuerpos anti-HLA-A2 o HNA-3a son diferidos debido a que se sabe que la presencia de estos anticuerpos es un factor de riesgo para el desarrollo de TRALI. En España, el donante no se difiere cuando su suero sólo contiene anticuerpos HLA de clase I. En Nueva Zelanda un donante se difiere cuando su suero contiene anticuerpos anti-HLA (Clase I y / o clase II) (S. Wendel, 2007).

Tres posibles recomendaciones se discutieron en la reunión Blood Products Advisory Committee, BPAC. En primer lugar, considerar el aplazamiento de los

donantes implicados en una sola unidad de TRALI o en más de un caso de unidades múltiples TRALI. En segundo lugar, la introducción de procedimientos de selección de donantes para identificar a los donantes que pueden tener factores de riesgo para los anticuerpos de leucocitos, incluyendo antecedentes de embarazo, transfusión o trasplante. La tercera consideración es esclarecer los criterios médicos de diagnóstico y tratamiento de TRALI, mejorando los mecanismos de vigilancia para los donantes implicados en casos de TRALI. Se planteó la cuestión de si la FDA debería considerar las intervenciones de reglamentación que requiere la identificación de los donantes con un mayor riesgo de causar TRALI (Elianna Saidenberg, 2010).

En la Cruz Roja Americana realizan: 1. El diferimiento de los donantes implicados en TRALI o en cuyo plasma se encuentran anticuerpos específicos HNA diferirlos, 2. Evitar la recolección de productos de plasma rico en plaquetas de donantes con anticuerpos anti-HLA conocidos, 3. Leucorreducción para evitar que los leucocitos de los donantes interacción con anticuerpos receptores, 4. El aumento de la proporción de donaciones de los donantes masculinos, 5. El uso de pruebas de anticuerpos HLA para la detección de los donantes con anticuerpos aloreactivos utilizando el kit Lab - Screen (One Lambda) y un análisis basado en citometría flujo (Luminex , Austin, TX) (Elianna Saidenberg, 2010).

En otros bancos de sangre usan 3 estrategias para la prevención de TRALI: 1. Política de exclusión de mujeres con gestaciones potencialmente inmunizadas como donantes de plasma fresco congelado y concentrado de plaquetas (MR, 2008) (Vlaar AP, 2008) 2. Actuación sobre el procesado de los productos hemáticos, las estrategias para la prevención de TRALI no inmune son acortamiento de los tiempos de almacenamiento de concentrados de hematíes y de plaquetas (Silliman CC B. L., 2003) (Goldman M, 2005), leucorreducción ya que disminuye la actividad de los neutrófilos pre-activados de los concentrados de

hematíes y plaquetas almacenados (U, 2007); uso de productos hemáticos con células lavadas para eliminar los lípidos biológicamente activos (Mair DC, 2006). 3 Evitar las transfusiones innecesarias (Muñoz M, 2007) (Quintana Díaz M, 2009).

Los servicios de donación de sangre en Alemania se han tomado medidas de minimización de riesgos, se limitan a la donación de PFC y no cubren donación de plaquetas o de glóbulos rojos. 1. El uso de donantes de sexo femenino, sin antecedentes de embarazo para la producción de PFC. 2. El uso de donantes mujeres con antecedentes de embarazo y sin detección de anticuerpos anti leucocitarios para la producción de PFC. 3. Realización de pruebas para identificar anticuerpos anti-HLA de clase I y II, HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a y HNA-3a. Después de la detección de anticuerpos HNA-1a, 1b, 2a y 3 a, estos donantes deben ser excluidos de la donación de plaquetas y glóbulos rojos. Estas medidas han tenido una reducción significativa de TRALI inmune y no se ha reportado ningún caso con desenlace fatal (M. B. Funk, 2011).

Para TRALI inmunológico, la estrategia del uso de plasma de donantes hombre o mujeres donantes sin antecedentes de embarazo o de una prueba negativa de anticuerpos anti-HLA o anti-granulocitos, tiene efectos positivos en la reducción de los casos graves y mortales. Para el TRALI no inmune, la selección cuidadosa de productos hemáticos con células lavadas (Bux, 2011).

Las medidas adoptadas progresivamente por la Canadian Blood Services (CBS) para reducir el riesgo de TRALI incluyen el uso de plasma de donantes masculinos, exclusión de mujeres con antecedentes de embarazo para plaquetaféresis, reducción en la cantidad residual de plasma en los glóbulos rojos, realizar plaquetaféresis a donantes masculinos y mujeres sin historial de gestaciones, utilizar soluciones aditivas en el proceso de plaquetaféresis. También desarrollaron políticas nacionales para la investigación de presuntos casos de TRALI. Estas medidas han reducido los casos de TRALI, las investigaciones de laboratorio son útiles cuando hay antígenos afines y anticuerpos presentes, pero el

diagnóstico de TRALI no se puede descartar por la ausencia de estos anticuerpos. Aun cuando se utilizan soluciones aditivas en las plaquetas, una capa residual de plasma siempre estará presente en ellas y este plasma ha sido descrito como causante de TRALI (Yulia Lin, 2011).

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Determinar la frecuencia de anticuerpos anti HLA de clase I en suero de donantes femeninas de plaquetas por aféresis y de sangre total del Banco Nacional de Sangre de la Cruz Roja Colombiana durante el mes de agosto y septiembre del año 2011.

5.2 ESPECÍFICOS

- Establecer si la existencia y frecuencia de factores de riesgo (número de gestaciones y transfusiones) se correlaciona con la presencia de anticuerpos anti-HLA de clase I, en la población de donantes femeninas del Banco Nacional de Sangre Cruz Roja Colombiana (BNS-CRC).
- Evaluar el desempeño del método de detección de anticuerpos como prueba de tamizaje rutinaria para donantes de sangre.
- Determinar cuál es la frecuencia de los anticuerpos anti- HLA de clase I en las unidades de plaquetas en donantes plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC.
- Describir las características gestacionales (número de gestaciones, hijos nacidos y abortos) de las donantes femeninas del programa de plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC.
- Evaluar la pertinencia de incluir la detección de anticuerpos anti-HLA y anti-neutrófilo en mujeres multíparas como medida preventiva para disminuir el riesgo de TRALI en Colombia

- Proponer un modelo de acción para el manejo de las donantes positivas para anticuerpos anti –HLA clase I.

6. METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo con muestras de suero obtenidas durante el mes de agosto y septiembre del 2011, provenientes de mujeres donantes de sangre total y plaquetas por aféresis, del Banco Nacional de Sangre Cruz Roja Colombiana. Se evaluaron las variables edad, grupo sanguíneo, RH, número de gestaciones, partos, abortos, antecedentes de transfusión y la presencia o ausencia de anticuerpos anti-HLA clase I por medio de la técnica ELISA. En el mes de agosto se recibieron 2.135 donantes en total; de los cuales 1.956 fueron donantes de sangre total y 179 fueron donantes de plaquetaféresis, de este mes se seleccionaron 80 donantes. En el mes de septiembre se recibieron 1.725 donantes en total; de los cuales 1.516 fueron donantes de sangre total y 209 fueron donantes de plaquetaféresis, de allí se seleccionaron 8 donantes.

6.1 Selección de donantes

Se realizó una búsqueda de donantes femeninas mediante la revisión de la ficha de donación entre los meses de agosto y septiembre de 2011, que se encuentran archivadas en el BNS-CRC. Encontrando 738 donantes mujeres sangre total y plaquetaféresis (anexo1). Se diseñó una base de datos en la cual se recopilaron las siguientes características: código de donación, fecha de donación, edad, grupo sanguíneo, RH, número de gestaciones, partos, abortos y transfusiones previas (anexo 2). Se seleccionaron en total 88 donantes de manera aleatoria, teniendo en cuenta las características gestacionales de cada una de ellas. Se verificaron los consentimientos informados para la utilización de las muestras, los cuales se encuentran anexos a la ficha de registro de donación del BNS-CRC.

6.2 Obtención de muestras

El personal del BNS-CRC durante el proceso de donación tomó muestras de sangre en tubo sin anticoagulante estas se centrifugaron y se obtuvo el suero.

Luego se alicutaron en tubos eppendorf y se almacenaron en la seroteca del banco a -20°C .

Teniendo en cuenta el número de gestaciones se seleccionaron los clúster de trabajo los cuales se distribuyeron de la siguiente forma:

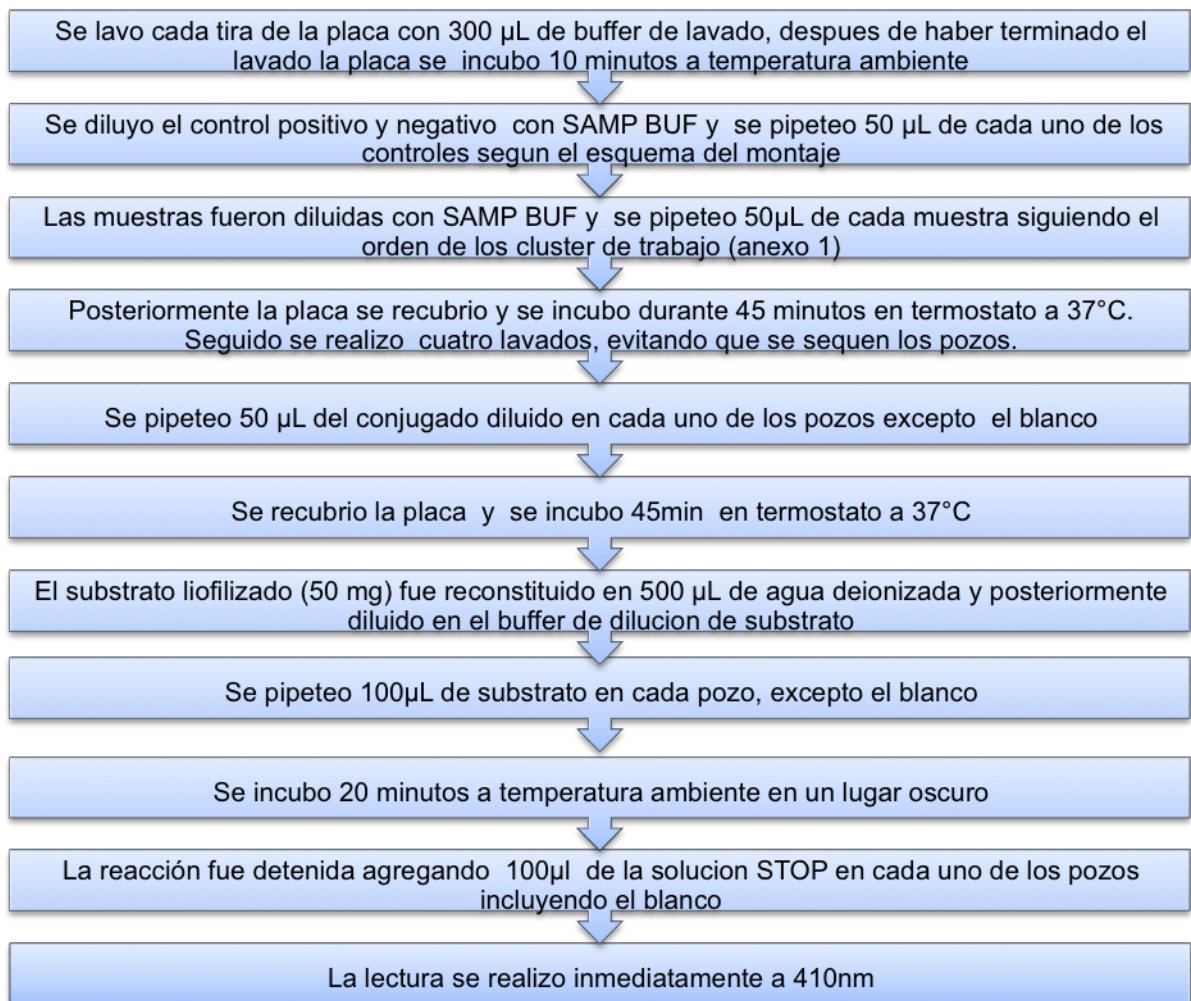
- Grupo 1: 5 muestras de donantes de plaquetaféresis nulíparas
- Grupo 2: 5 muestras de donantes de plaquetaféresis con antecedente de una gestación
- Grupo 3: 18 muestras de donantes de plaquetaféresis y sangre total con dos gestaciones.
- Grupo 4: 20 muestras de donantes de plaquetaféresis y sangre total con tres gestaciones.
- Grupo 5: 20 muestras de donantes de plaquetaféresis y sangre total con cuatro gestaciones.
- Grupo 6: 20 muestras de donantes de sangre total con más de cuatro gestaciones, de las cuales 12 presentan 5 gestaciones, 3 de 6 gestaciones, 3 de 7 gestaciones, 1 de 9 gestaciones y 1 de 21 gestaciones.

Después de haber diseñado los clústeres de trabajo se empezó la búsqueda de las muestras, estas se encontraban congeladas a -20°C y almacenadas en seroteca. Las muestras permanecieron de uno a dos meses en congelación antes de realizar la ELISA. El día anterior al ensayo, las muestras fueron puestas en refrigeración a -4°C . Aproximadamente 2 horas antes de empezar el montaje las muestras fueron retiradas del refrigerador y posteriormente se centrifugaron por 2 minutos a 3.400 r.p.m.

6.3 Detección de anticuerpos anti- HLA clase I

A partir de las 88 muestras se realizó la detección de anticuerpos anti-HLA de clase I mediante la técnica de ELISA (AbScreen HLA class I, BIO-RAD).

Antes de iniciar el ensayo, se tomó la temperatura del área del laboratorio donde se realizó el procedimiento, la cual era 22 °C. Se verificó que los reactivos y la placa del kit no estuvieran vencidos o presentaran algún tipo de contaminación. Luego los reactivos se dejaron a temperatura ambiente e inmediatamente se pasó a la preparación del buffer de lavado (252 ml agua desionizada + 28 ml BUF) y el conjugado (6ml SAMP BUF + 60 µL CONJ) el cual fue protegido de la luz. Una vez terminado la preparación de los reactivos, se realizó el esquema del orden de las muestras y controles según la distribución de los pozos en la placa (Anexo 3). Se montaron 2 blancos, dos controles positivos y cuatro controles negativos (Anexo 4 inserto).



La lectura de la placa se realizó con un equipo lector de placas de ELISA Eix800 de Biotek®. Las absorbancias de cada uno de los pozos fueron leídas con el software Ab Score Interpretation, Release 1.0, de Biotek®.

La prueba se consideró positiva para anticuerpos HLA clase I, cuando la medida de densidad óptica de la muestra doblo la de los controles negativos. Se consideró un 15% de zona gris (valor de corte OD – 15% (zona gris menor que el valor de corte OD)).

Se realizó un control en los tiempos de incubación, temperaturas de incubación y en los lavados, ya que periodos y temperaturas de incubación erróneos así como pasos de lavados insuficientes pueden generar resultados falsos.

Se verificó que la media de densidad óptica del control negativo y positivo estuviera dentro del rango que nos da el inserto.

7. RESULTADOS

7.1 Detección de anticuerpos anti-HLA clase I en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Una vez obtenidas las absorbancias de los 88 pozos (anexo 5), se observaron los controles positivo, negativo y blanco. Se calculó que el promedio del blanco fue 0.014, promedio del control positivo fue 2.866 encontrándose dentro de la media de densidad óptica dado por el inserto (≥ 1.500) y el promedio del control negativo fue 0.109 encontrándose dentro de la media de densidad óptica dada por el inserto (0,040-0.150). Debido a que los controles positivos, negativo y blanco se encuentran dentro de las especificaciones dadas por el inserto, se validó el ensayo. Para la interpretación de los resultados se consideró un 15 % de la zona gris (0.185). El punto de corte fue 0.218.

Se encontró 15.9% muestras positivas para anticuerpos anti- HLA de clase I. Dentro de las muestras positivas el 42.8% fueron donantes de plaquetaféresis, mientras que el 67.1% son donantes de sangre total.

Se observó que las muestras 6 y 8 tienen una densidad óptica dentro de la zona gris por lo cual deben comprobarse con el mismo método utilizado (ELISA HLA clase I). Estas donantes son de plaquetaféresis y presentan una gestación.

7.2 Descripción de las variables incluidas en el estudio

Variables del estudio	Tipo de variable
Edad	Variable independiente, cuantitativa continua
Grupo Sanguíneo	Variable independiente, cualitativa nominal
RH	Variable independiente, cualitativa nominal
Gestaciones	Variable independiente, cuantitativa discreta

Partos	Variable independiente, cuantitativa discreta
Abortos	Variable independiente, cuantitativa discreta
Presencia de Ac anti-HLA clase I	Variable dependiente

Tabla 1: Fuente propia

	Edad	Gestaciones	Partos	Abortos
N	88	88	88	88
Media	41.24	3.5227	2.8523	0.6591
Mediana	41.5	3.0	2.5	0.0000
Moda	Bimodal 26	Bimodal 3	2	0
Desviación estándar	12.39	2.54	2.26	0.98
Varianza	153.517	6.459	5.116	0.963
Coefficiente variación	30.045	72.146	79.298	148.881
Rango	46	21	19	5

Tabla 2: Fuente propia

7.3 Edad de las donantes plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

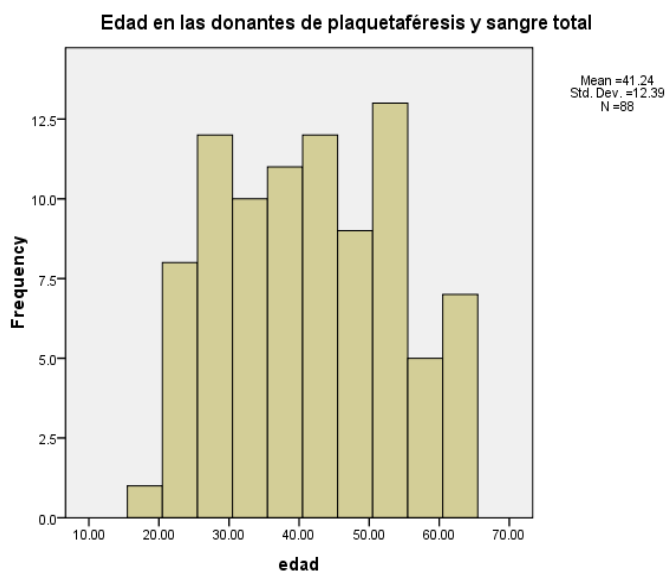
Intervalo (edad)	Frecuencia	Porcentaje
18-25	9	10.22%
26-33	21	23.9%
34-41	14	15.90%

42-49	17	19.31%
50-57	18	20.45%
58-65	9	10.22%
Total	88	100

Tabla 3: Fuente propia

La tabla 3 nos muestra la distribución por edad en la población de donantes de sangre total y plaquetaféresis, observando que 23.9% de las donantes están en un rango de edad 26 a 33 años. Seguido 20.45% que están entre los 50 a 57 años.

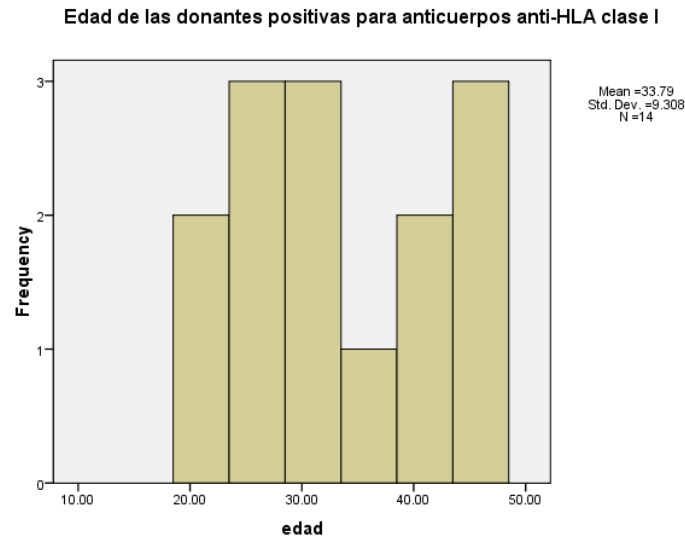
Grafica 1. Frecuencia edad en las 88 donantes de sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011



En las muestras encontradas positivas para anticuerpos anti-HLA clase I, hallamos una distribución heterogénea, ya que hay donantes desde 21 hasta 47 años. Se encontró que el 21.4 % son donantes de 26 años, el 14.3% tiene 21, 31, 46 años correspondientemente y el 7.1 % tienen 33, 36, 40, 43, 47 años. Estos hallazgos son importantes debido a que la mayoría de estas donantes son jóvenes y pueden seguir donando por muchos más años, presentando así un riesgo potencial a producir TRALI en los receptores. No se halló anticuerpos anti-HLA clase I en donantes mayores de 48 años, lo que sugeriría que el título de anticuerpos pudo

haber disminuido, dado el tiempo transcurrido desde que se tuvo el ultimo estimulo antigenico (embarazo).

Grafica 2. Frecuencia edad en las donantes sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti –HLA de clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011



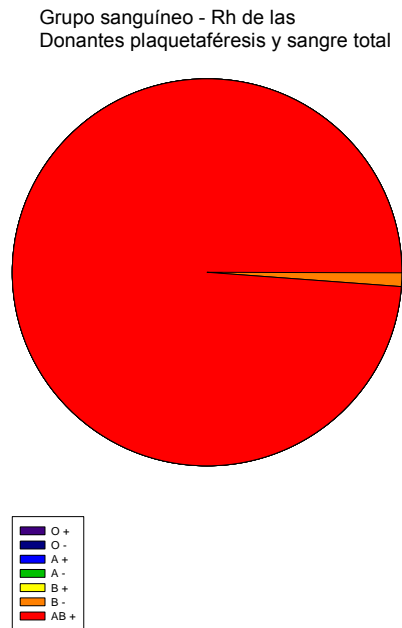
7.4 Relación grupo sanguíneo- RH en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Grupo Sanguíneo	Frecuencia	Porcentaje
O+	57	64.7%
O-	6	6.81%
A+	16	18.1%
A-	1	1.13%
B+	6	6.81%
B-	1	1.13%
AB+	1	1.13%
Total	88	100%

Tabla 4: Fuente propia

En la tabla 4 se muestra la distribución por grupo sanguíneo – RH, donde se observó una proporción considerable 64.7% de donantes que son O+ y 18.1%

que son A+, siendo estos dos los más frecuentes en la población. Mientras que los RH negativos están en una menor proporción, al igual que los grupos sanguíneo B y AB.

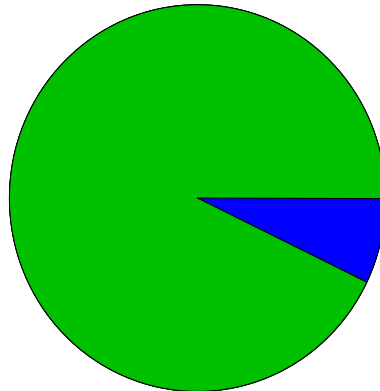


Grafica 3. Frecuencia grupos sanguíneos- RH en las donantes sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Se encontraron 14 (1597%) muestras positivas para anticuerpos anti-HLA clase I, en donde el 64.2 % son O+, el 21.4% son A+, 7.1% son B + y 7.1% son O-.

Grafica 4. Frecuencia grupo sanguíneo- RH en las donantes sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Grupo sanguíneo- Rh donantes positivas para anticuerpos anti-HLA clase I

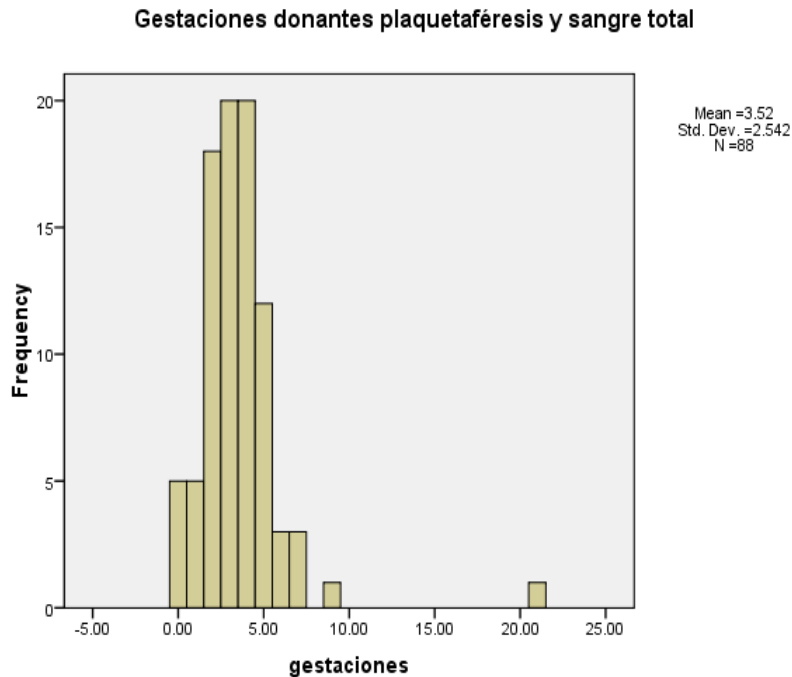


7.5 Gestaciones en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Gestaciones	Frecuencia	Porcentaje
Nulípara	5	5.7%
1	5	5.7%
2	18	20.5%
3	20	22.7%
4	20	22.7%
5	12	13.6%
6	3	3.4%
7	3	3.4%
9	1	1.1%
21	1	1.1%
Total	88	100%

Tabla 5: Fuente propia

En la tabla 5 se muestra la distribución del número de gestaciones en la población de donantes. La proporción más alta fue 22.7% las cuales presentan entre 3 y 4 gestaciones.

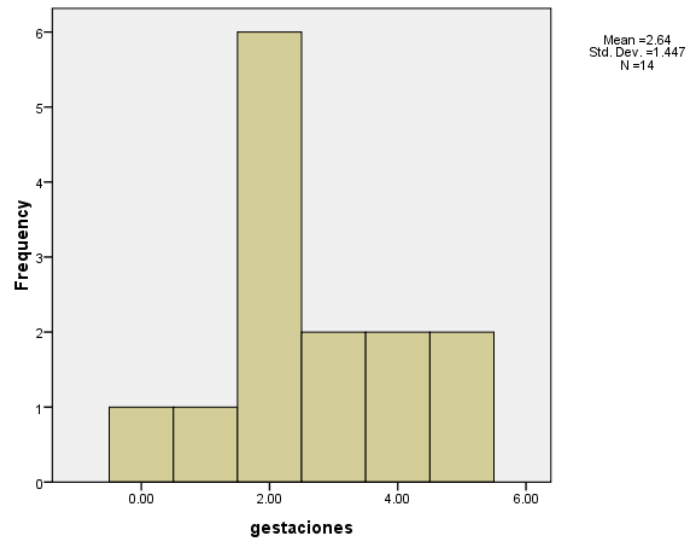


Grafica 5. Frecuencia número de gestaciones en mujeres donantes sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Dentro de las muestras que fueron positivas para anticuerpos anti-HLA clase I, se encontró que el 42.9% son donantes que han presentado dos gestaciones, mientras que el 14.3 % presentaron 3 gestaciones, 14.3% 4 gestaciones, 14.3% 5 gestaciones y en una menor proporción 7.1% una gestación. Se detectaron anticuerpos anti-HLA clase I en una donante nulípara, lo que pudo ser explicado bien por otro estímulo diferente al embarazo y las transfusiones o cuestión de azar, dado que alrededor de un 1% de la población sin antecedentes de sensibilización desarrolla este tipo de anticuerpos. También se observó que para donantes con más de dos gestaciones, el número de casos positivos no aumentaron proporcionalmente con el número de embarazos, incluso a las donantes con mayor número de gestaciones no se les detecto anticuerpo anti – HLA clase I.

Grafica 6. Frecuencia número de gestaciones en donantes sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Número de gestaciones en donantes positivas para anticuerpos anti-HLA clase I

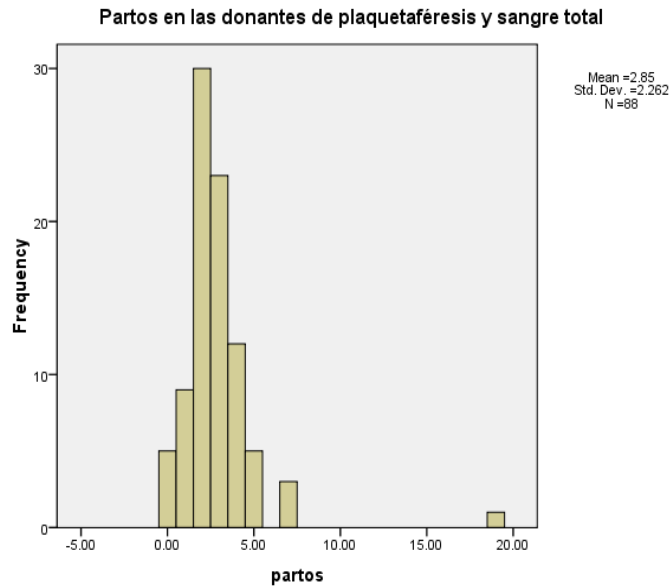


7.6 Partos en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Partos	Frecuencia	Porcentaje
0	5	5.7%
1	9	10.2%
2	30	34.1%
3	23	26.1%
4	12	13.6%
5	5	5.7%
7	3	3.4%
19	1	1.1%
Total	88	100%

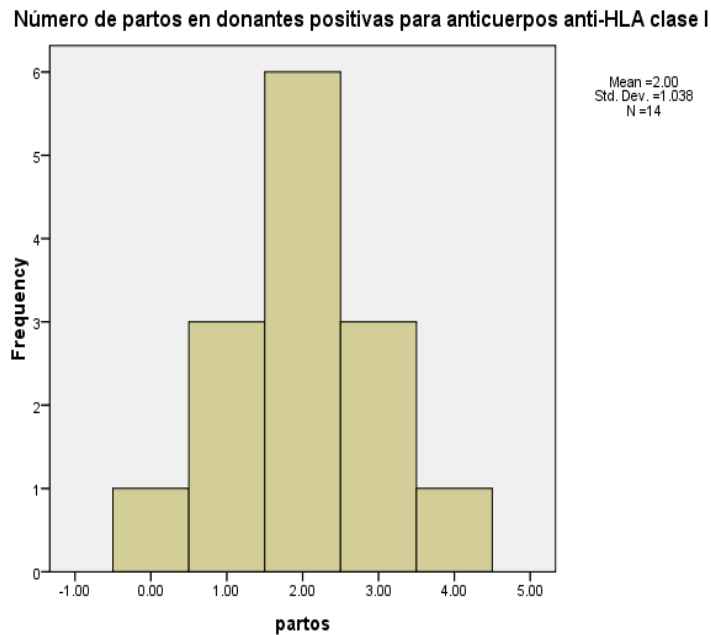
Tabla 6: Fuente propia

La tabla 6 nos muestra la frecuencia en el número de partos en las donantes. Se observó que la mayoría de las donantes han tenido dos partos (34.1%), seguida de donantes que han presentado 3 partos (26.1%).



Grafica 7. Frecuencia del número de partos en mujeres donantes sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

A las donantes a las que se les detecto anticuerpos anti-HLA clase I, se halló que el 42.9% presentaron 2 partos, seguido 21.4% con tres y un parto y en una menor proporción 7.1% 4 partos.



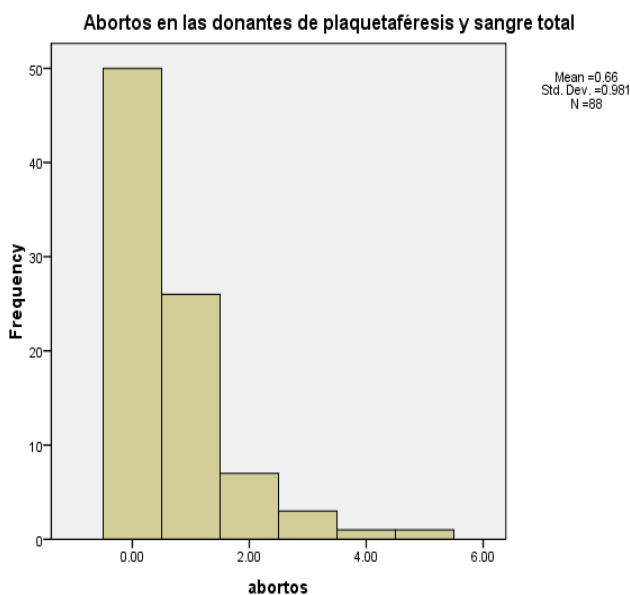
Grafica 8. Frecuencia número de partos en donantes de sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

7.7 Abortos en las donantes de plaquetaféresis y sangre total del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

Abortos	Frecuencia	Porcentaje
0	50	56.8%
1	26	29.5%
2	7	8.0%
3	3	3.4%
4	1	1.1%
5	1	1.1%
Total	88	100%

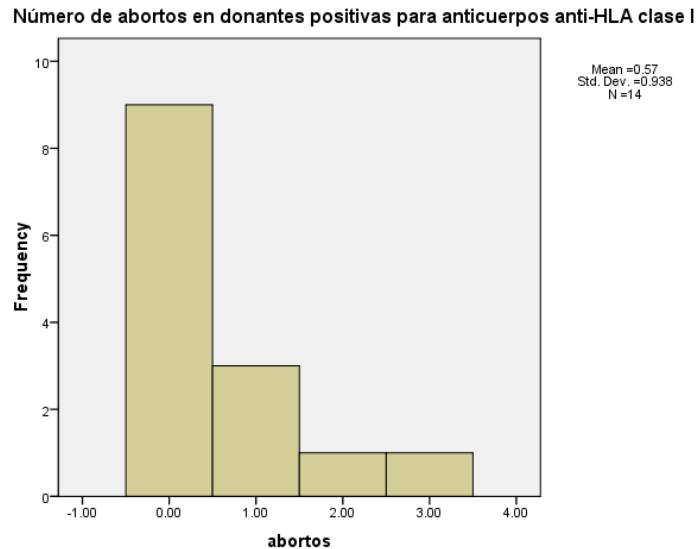
Tabla 7: Fuente propia

En la tabla 7 nos muestran la frecuencia de abortos que tuvieron las 88 donantes, viendo que proporción considerable 56.8% no presentaron abortos y un 29.5% presentaron un aborto. Y en una menor proporción se presentaron 3 a 5 abortos.



Grafica 9. Frecuencia del número de abortos en mujeres donantes sangre total y plaquetaféresis del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011e

En las donantes donde se halló anticuerpos anti-HLA clase I se observó 64.3% no presentaron abortos mientras 21.4% presentaron un aborto, 7.1% presento 3 y 2 abortos.



Grafica 10. Frecuencia del número de abortos en las donantes de sangre total y plaquetaféresis positivas para anticuerpos anti-HLA clase I del BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre 2011

7.8 Transfusiones previas en las donantes de plaquetaféresis y sangre total BNS-CRC en el mes de agosto y septiembre

Ninguna de las 88 donantes participantes del estudio referencio transfusiones en el último año.

Las gráficas se realizaron con ayuda de dos programas estadísticos: SPSS Statistics 17.0 y Sigma Plot.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El desarrollo de TRALI se ha visto claramente asociado a la presencia de anticuerpos anti-HLA en el plasma del donante. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio realizado en Colombia que determina la presencia de anticuerpos HLA en donantes de sangre.

El desarrollo de TRALI se ha visto claramente asociado a la presencia de anticuerpos anti-HLA en el plasma del donante. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio realizado en Colombia que determina la presencia de anticuerpos HLA en donantes de sangre.

Algunos estudios asocian el número de gestaciones con la frecuencia con que se presentan anticuerpos anti-HLA (Triulzi DJ, 2009) sin embargo en nuestro estudio no se evidencio una clara relación entre la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I y el número de gestaciones. No obstante, vimos que las donantes con mayor número de gestaciones se encuentran en edades avanzadas, por lo cual suponemos que el amplio tiempo transcurrido entre la donación y la última gestación podría llevar a una disminución en el título de anticuerpos, que no permite su detección. Esta posibilidad ya ha sido comprobada por otros investigadores (Triulzi DJ, 2009).

La presencia de anticuerpos anti HLA en donantes nulíparas ha sido referenciada con frecuencias muy bajas. La causa no es bien conocida, sin embargo algunos autores sugieren que este fenómeno puede ser debido a aloinmunización por vacunas, autoanticuerpos naturales, reacción cruzada con antígenos bacterianos o falsos positivos (Triulzi DJ, 2009). En vista de que una de las donantes nulíparas dio positiva para anticuerpos anti HLA clase I y siendo este uno de los clusters más pequeños en el estudio, sugerimos aumentar el número de muestras de

nulíparas analizadas para investigaciones posteriores. Las muestras que quedaron en zona gris deben ser confirmadas por medio de un nuevo ensayo.

Desde que se conoce la asociación entre el número de gestaciones y la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I y II, se han implementado diferentes estrategias para la disminución del riesgo de TRALI. Una de las estrategias que ha tenido mejores resultados ha sido la transfusión de plasma masculino únicamente (Anne F. Eder, 2010), aunque el diferimiento total de las mujeres multíparas como donantes, en particular de plaquetas por aféresis, implica una reducción de un porcentaje alto del total de las donaciones mensuales que reciben en BNS-CRC.

Extrapolando los resultados obtenidos en este estudio a la casuística de donantes mujeres del BNS-CRC y a su perfil gestacional, la pérdida de donantes en el programa de aféresis sería de un 33.7%, si sólo se aceptaran donantes masculinos y mujeres nulíparas. Si de ese porcentaje se realiza el tamizaje de anticuerpos se recupera un 10 % aproximadamente de la población de donantes de plaquetaféresis. La prevalencia de anti-HLA de clase I positivo es de 20.27%

Otra alternativa propuesta para mitigar el impacto en el diferimiento de donantes de plaquetas por aféresis, es el uso de soluciones aditivas como medio de suspensión en lugar del plasma (Yulia Lin, 2011). Esta solución reemplaza parte del plasma necesario para suspender las plaquetas, disminuyendo así la concentración de anticuerpo. Se especula que el desarrollo de TRALI está ligado, entre otros factores, a la concentración de anticuerpo anti-HLA (Shiho Hashimoto, 2010).

Una de las medidas preventivas más estudiadas ha sido el screening de anticuerpos anti-HLA clase I y II en mujeres con historia gestacional. El método utilizado para la detección de anticuerpos ya ha sido comparado con otras tecnologías como el Luminex, donde se ha visto que tiene una alta sensibilidad y

especificidad, permite la determinación de hasta más de 100 muestras, según el kit utilizado, a un costo menor que otras tecnologías de sensibilidad y especificidad similar, por lo que consideramos tiene un alto potencial como técnica de elección para el screening de anticuerpos anti-HLA clase I y II, y como potencial medida preventiva de TRALI (Ralph R. Vassallo, 2010).

La técnica que se utilizó contenía glicoproteínas de plaquetas purificadas, estas están fijadas en los pocillos de la microplaca de titulación, por lo cual es fundamental realizar un buen lavado en cada cavidad antes de realizar el procedimiento, así no se tienen interferencias con antígenos que no estén unidos en la placa. La prueba no es dispendiosa y fácil de manejar. Aunque hay que tener control crítico sobre la temperatura ambiente donde se realice el ensayo, las temperaturas de incubación, los periodos de tiempos y en los lavados que se realizan sobre la placa, ya cuando se realizan malos lavados se puede arrastrar muestra de un pocillo a otro y producirse falso positivos. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas de las muestras. Revisar las muestras después de la centrifugación para eliminar agregados o partículas visibles y así evitar reacciones falsas positivas.

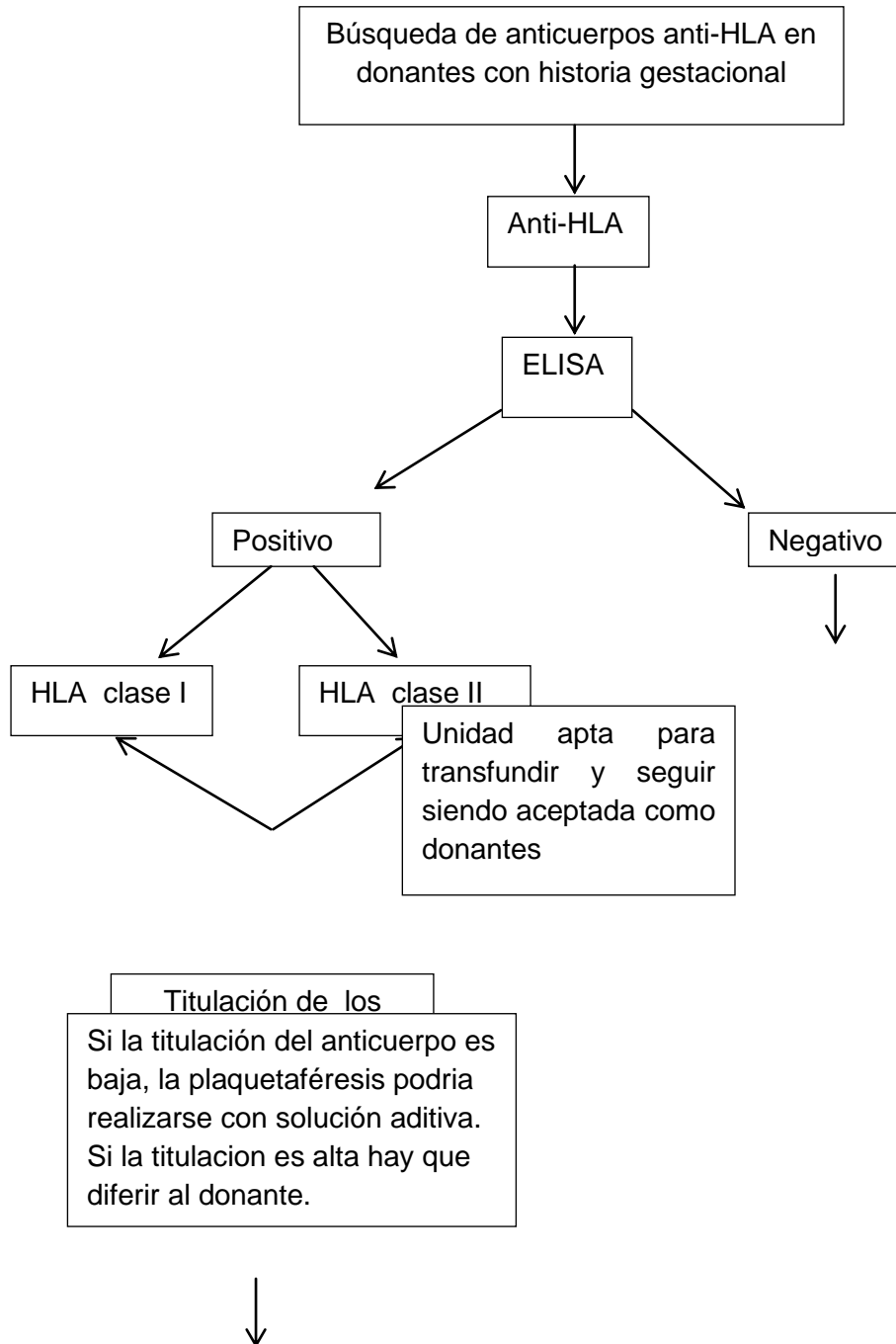
Este estudio, sin embargo, tiene varias limitaciones. En primer lugar, no se conoce aún la presencia de anticuerpos anti-HLA II en las muestras seleccionadas y por lo tanto el impacto real del tamizaje en las donantes mujeres del BNS CRC seguramente se ha subvalorado. Igualmente, no se sabe en qué extensión se presentan anticuerpos anti-neutrófilo, también equivalentes a riesgo de TRALI, aunque la dificultad para estandarizar esta técnica hará que su introducción como prueba tamiz tarde más tiempo.

Por otro lado, el tamaño de la muestra puede no ser adecuado para mostrar la prevalencia real de anticuerpos en la población de mujeres, o incluso puede

sobrevalorar datos no esperados, como la positividad encontrada en una muestra del grupo de donantes nulíparas.

Otra limitación importante radica en el método de análisis escogido. No siendo una plataforma automatizada, la posibilidad de error humano en la técnica no puede descartarse. Igualmente, la presencia de algunos pocos falsos positivos o falsos negativos no puede tampoco excluirse.

Figura 5. Propuesta modelo de acción de screening de anticuerpos anti HLA-clase I y II para el diferimiento de las donantes.



9. CONCLUSIONES

- Se vio un porcentaje significativo del 15.9% de donantes que presentaron anticuerpos anti HLA clase I en la muestra estudiada
- Dentro de las muestras positivas para anticuerpos anti –HLA de clase I, se encontró que el 42.8 % procedían de donantes de plaquetaféresis y 67.1% eran donantes de sangre total.
- La proporción de mujeres donantes de plaquetaféresis con anticuerpos anti-HLA de clase I es elevada, incluso con antecedente de apenas 2 gestaciones. Esto representa un potencial riesgo para los receptores debido a que estos componentes son ricos en plasma. La introducción de pruebas para el tamizaje de anticuerpos anti-HLA de clase I y II y a futuro anti-neutrófilo para determinar elegibilidad en la donación de componentes ricos en plasma, podría tener un impacto importante en reducir este riesgo.
- También se observó un alto porcentaje de donantes de sangre total con presencia de anticuerpo anti-HLA de clase I, para estas donantes se podrían implementar estrategias para la prevención de TRALI fuera del tamizaje de los anticuerpos, como el acortamiento de los tiempos de almacenamiento del concentrado de hematíes y el uso de productos hemáticos con células lavadas para eliminar los lípidos biológicamente activos.
- Ninguna de las donantes incluidas en el estudio referenciaron transfusiones previas, por lo cual no se pudo correlacionar este factor de riesgo con la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I.
- Se pudo confirmar que las gestaciones son un factor de riesgo importante en la producción de anticuerpos anti- HLA clase I.

- Se observó que los niveles de anticuerpo no aumenta con el número de gestaciones, ya que las donantes que presentaban un mayor número de gestaciones no se le detectaron anticuerpos.
- Aunque se encontraron anticuerpos anti-HLA de clase I en algunas de las donantes, es necesario recordar que no todos sus componentes sanguíneos causan TRALI en los receptores. Varios factores juegan un papel importante como el título de anticuerpos, su afinidad, avidéz, la densidad de antígenos afines
- La técnica ELISA Abscreen class I nos permitió identificar anticuerpos IgG contra antígenos HLA de clase I, siempre que se aplique de acuerdo con las instrucciones del inserto. Es un método altamente sensible.
- Este ensayo es fácil de realizar y no se requiere de mucho material para realizarlo, solo se necesita los reactivos del kit y el equipo lector.
- Con ayuda de Abscreen HLA de clase I es posible realizar un rápido screening de anticuerpos HLA en donantes.
- Se hallaron dos muestras con una densidad óptica dentro de la zona gris, se recomienda la comprobación por el mismo método utilizado (ELISA).
- Se sugiere realizar detección de anticuerpos anti- HLA de clase II por el mismo método.
- Detectar anticuerpos anti- HNA debido a que estos anticuerpos son importantes en los casos más graves de TRALI.
- Dada la asociación de anticuerpos anti- HLA de clase I con el desarrollo de TRALI, es necesario adoptar medidas para reducir el riesgo. Es necesario incorporar la realización de ELISA para el tamizaje de anticuerpos.

- Con la incorporación de pruebas de tamizaje para anticuerpos, se ayuda al banco a no diferir donantes solo por las características gestacionales

10. BIBLIOGRAFÍA

A. Insunza, I. R. P. (2004). Implementation of a strategy to prevent TRALI in a regional blood centre. *TransfusionMedicine*, 14, 157-164.

Amy Powers, C. P. (2008). Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost effective transfusion related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion*, 48, 2549-2558.

Anne F. Eder, R. M. (2010). Effective reduction of transfusion related acute lung injury risk with male predominant plasma strategy in the American Red Cross (2006-2008). *Transfusion*, 50, 1732-1742.

Blajchman, E. C. (2009). Transfusion related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood*, 113, 3406-3417.

Bray RA, H. S. (2004). Unappreciated risk factors for transplant patients: HLA antibodies in blood components. *Hum Immunol*, 65, 240-244.

Brian R. Curtis, M. J. (2006). Mechanisms of transfusion related acute lung injury (TRALI): Anti-leukocyte antibodies. *Crit Care Med*, 34, 118-123.

Bux J, S. U. (2007). The pathogenesis of transfusion related acute lung injury(TRALI). *BrJ Haematol* , 788-799.

Bux, J. (2011). Antibody mediated (immune) transfusion related acute lung injury. *Vox sanguinis*, 100, 122-128.

Catherine E. Chapman, D. S. (2009). Ten years of hemovigilance reports of transfusion related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion*, 49, 440-452.

David F. Stroncek, E. F. (2007). Leukocyte Antigen and Antibody Detection Assays: Tools for Assessing and Preventing Pulmonary Transfusion Reactions. *Transfusion Medicine Reviews*, 21, 273-286.

Davoren A, C. B. (2003). TRALI due to granulocyte agglutinating human neutrophil antigen 3a (5b) alloantibodies in donor plasma: A report of two fatalities. *Transfusion*, 43, 641-645.

DECRETO 1571 (12 de Agosto de 1993).

Dziedzickowski JS, A. K. (2006). *Biología y empleo terapéutico de las transfusiones. Principios de medicina interna de Harrison. 16ta ed español* (Vol. 1). McGraw-Hill Interamericana.

Eder AF, H. R. (2007). Transfusion related lung injury surveillance (2003-2005) and the potential impact of the selective use of plasma from male donors in the American Red Cross. *Tranfusion*, 47, 599-607.

Elianna Saidenberg, T. P. (2010). Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI): A Canadian Blood Services Research and Development Symposium. *Transfusion Medicine Reviews*, 24, 305-324.

Emmanuel A. Fadeyi, M. D. (2007). The transfusion of neutrophil specific antibodies causes leukopenia and a broad spectrum of pulmonary reactions. *Transfusion*, 47, 545-550.

FDA. (2007). *Fatalities reported to the FDA. Following blood collection and transfusion. annual summary for fiscal years 2005 and 2007*. Recuperado el Agosto de 2011, de <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/ucm118316.htm>

Galel SA, M. (2004). *Transfusion medicine. 11TH ED.* (P. L. Wilkins, Ed.) Wintrobe's clinical hematology.

Goldman M, W. K. (2005). Proceedings of a consensus conference: towards an understanding of TRALI. *Transfus Med Rev*, 19, 2-31.

Hannah Cohen, C. T. (2007). *serious hazards of transfusion : annual report 2007*. Recuperado el 9 de junio de 2011, de Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA): <http://www.mhra.gov.uk/index.htm>

J, B. (2005). Transfusion-related acute lung injury (TRALI): A serious adverse event of blood transfusion. *Vox sanguineo*, 89, 1-10.

Ji Hyun Lee, E.S. K. (2010). Two Cases of Transfusion related Acute Lung Injury. Triggered by HLA and Anti-HLA Antibody Reaction. *J Korean Med Sci*, 25, 1398-1403.

- Jurgen Bux, U. J. (2007). The pathogenesis of transfusion related acute lung injury. *British Journal of Haematology*, 136, 788-799.
- K. Malanka, H. M. (2007). Leucocyte antibodies in blood donors and a look back on recipients of their blood components. *Vox Sanguinis* (29).
- Kao GS, W. I. (2003). Investigations into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI. *TRANSFUSION*, 43, 185-191.
- Karen Quillen, C. M. (2011). Screening plateletpheresis donors for HLA antibodies on two high throughput platforms and correlation with recipient outcome. *Transfusion*, 51, 504-510.
- Kopko PM, M. C. (2002). Transfusion related acute lung injury: report of a clinical look back investigation. *The Journal of the American Medical Association*, 287, 1968–1971.
- Kopko PM, P. M. (2004). Pulmonary injury from transfusion-related acute lung injury. *Clin Chest Med* , 25, 105-111.
- Kopko PM, P. T. (2003). Transfusion related acute lung injury: Correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion*, 43, 177-184.
- LK, B. (2005). Transfusion related acute lung injury and the ICU. *Crit Care Clin*, 21, 479-495.
- M. B. Funk, S.G.S. (2011). Benefit of transfusion related acute lung injury risk minimization measures German haemovigilance data (2006–2010). *Vox Sanguinis* , 1-7.
- Mair DC, H. N. (2006). Blood donor and component management strategies to prevent transfusion related acute lung injury (TRALI). *Crit Care Med.*, 34, 137-43.
- MR, L. (2008). Acute lung injury alter blood product transfusion: Are the times changing? . *Crit Care Med*, 36, 1968–9.
- Muñoz M, L. N. (2007). Prevalencia y tratamiento de la anemia en el paciente critico. *Med Intensiva*, 31, 388-398.
- OMS, (2001). El uso clínico de la sangre. (22), 67-76.
- P. Bierling, J. B. D. (2009). Recommendations of the ISBT Working Party on Granulocyte Immunobiology for leucocyte antibody screening in the investigation

and prevention of antibody mediated transfusion related acute lung injury. *Vox Sanguinis*, 96, 266-269.

Pearl Toy, M. A. (2005). Transfusion related acute lung injury: Definition and review. *Continuing Medical Education*, 33, 721-726.

Popovsky. (2002). Transfusion Related Acute Lung Injury Report of a Clinical Look Back Investigation. *American Medical Association*, 287, 23-33.

Popovsky, M. A. (2006). Transfusion related acute lung injury and transfusion associated circulatory overload. *Journal Compilation*, 1, 107-11.

Quintana Diaz M, S. C. (2009). Resultados de una encuesta nacional sobre habito transfusional en unidades de cuidados intensivos. *Med Intensiva*, 33, 8–15.

R.Curtis, B. (2011). Is TRALI caused by HLA class II too? *Blood*, 117, 378-379.

Ralph R. Vassallo, S. H. (2010). A comparison of two robotic platforms to screen plateletpheresis donors for HLA antibodies as part of a transfusion related acute lung injury mitigation strategy. *Transfusion*, 50, 1766-1777.

Resolucion 0901 (marzo de 1996).

Rutger A. Middelburg, B. B. (Julio de 2011). Storage time of blood products and transfusion related acute lung injury. *Tranfusion* .

Rutger, A. M. (2010). Female donors and transfusion related acute lung injury: A case referent study from the International TRALI Unisex Research Group. *Transfusion*, 50, 2447-2454.

S. Wendel, S. B.W. (2007). Measures to prevent TRALI. *Vox Sanguinis. Journal compilation* (28), 1-20.

Sachs UJ, H. K. (2006). Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*, 107, 1217–1219 .

Schreiber, D. J. (2007). Donor risk factors for white blood cell antibodies associated with transfusion-associated acute lung injury: REDS-II Leukocyte Antibody Prevalence Study (LAPS). *Transfusion*, 47, 563-564.

Shiho Hashimoto, F. N. (2010). Relationship of donor HLA antibody strength to the development transfusion related acute lung injury tranfusion. *Transfusion*, 50, 2582-2591.

SHOT. (2009). *Serious hazards or transfusion, annual report*. Recuperado el 16 de Octubre de 2011, de www.shotuk.org

Silliman CC, A. D. (2006). Transfusion related acute lung injury. *Blood*, 105, 2266-2273.

Silliman CC, B. L. (2003). Transfusion related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood*, 101, 454-462.

Silliman, Y. L. (2009). The Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Transfusion Related Acute Lung Injury. *Transfusion Medicine Reviews*, 23, 266-283.

Sillimna C, F. Y. (2009). Transfusion related acute lung injury (TRALI): Current concepts and misconceptions. *Blood Reviews*, 23, 245–255.

Soni, N. (2009). Transfusion related lung injury. TRALI. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 20, 93-97.

Swanson K, D. D. (2006). Transfusion related acute lung injury (TRALI): Current Clinical and Pathophysiologic considerations. *Lung*, 184, 177-185.

Toy P, G. O. (2004). Transfusion related acute lung injury. *Anesth Analg*, 99, 1623-1624.

Toy P, L. C. (2007). TRALI. Definition, mechanisms, incidence and clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 21, 183–193.

Triulzi DJ, K. S. (2009). The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion*, 49, 1825-35.

U, S. (2007). Pathophysiology of TRALI: Current concepts. *Intensive Care Med*, 33, 3-11.

Vázquez JA, V. E. (2002). Reacciones post trasnfusionales. *Revista de facultad de medicina*, 25 (2), 154-162.

Vlaar AP, B. J. (2008). Preventing TRALI Ladies first, what follows? *Crit Care Med*, 36, 3283–4.

Yoke Lin Fung, C. C. (2008). The Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Transfusion Medicine Reviews*, 23, 266-283.

Yulia Lin, C. L. (2011). Transfusion related acute lung injury prevention measures and their impact at Canadian Blood Services. *Transfusion* , 1-8.

ANEXOS