



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

**TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL MANEJO
TRANSFUSIONAL DE PACIENTES CON ANEMIA
HEMOLÍTICA AUTOINMUNE**

**MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES IN TRANSFUSION
MANAGEMENT OF PATIENTS WITH AUTOIMMUNE
HEMOLYTIC ANEMIA**

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN
HEMOTERAPIA Y BANCO DE SANGRE**

AUTORA

Lizette Fernandez Bolivar

ASESOR

Erik Alexander Sánchez Tregear

LIMA - PERÚ

2022

Fecha de Aprobación: 27 de Junio del 2022

Calificación: Aprobado

ASESOR DE TRABAJO ACADÉMICO

Licenciado Erik Alexander Sánchez Tregear

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0001-6567-1639

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, por estar siempre apoyándome e impulsándome a seguir avanzando y a mi hermana Yenifer, por demostrarme que soy su ejemplo para seguir.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Escuela de Tecnología Médica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su enseñanza en el ámbito de la investigación.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente estudio fue autofinanciado.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERES

Declaro que esta monografía es original y se ha reconocido el uso del trabajo de otros autores donde corresponde.

Se ha seguido los lineamientos respectivos para respetar la ética en investigación y este mismo será utilizado para obtener el Título de Segunda Especialidad en Hemoterapia y Banco de Sangre.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	3
CAPITULO I.....	
1. Anemia hemolítica autoinmune.....	4
1.1 Epidemiología.....	4
1.2 Etiopatogenia.....	4
1.3 Clasificación	5
1.3.1 Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes..	6
1.3.2 Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos.....	7
1.3.3. Anemia hemolítica autoinmune mixta.....	9
CAPITULO II.....	
2. Técnicas de biología molecular en el manejo transfusional.....	10
2.1 Clasificación.....	10
2.2 Ventajas.....	13
2.3 Limitaciones.....	15
2.4 Costos	16
CAPITULO III.....	
3. Seguridad transfusional en pacientes con AHAI.....	19
3.1 Manejo serológico de las pruebas pretransfusionales.....	19
3.2 Políticas de seguridad transfusional.....	20
3.3 Riesgo transfusional.....	22
CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
ANEXOS.....	31

RESUMEN

Las pruebas pretransfusionales actuales para pacientes con anemia hemolítica autoinmune (AHAI) en Perú; se basan en técnicas de hemaglutinación, lo que genera demora para encontrar unidades compatibles y requieren un mayor volumen de muestra. Estas técnicas se dificultan por los autoanticuerpos producidos por estos pacientes que causan reacción en todas las células y pueden enmascarar la presencia de aloanticuerpos, conduciendo a un mayor riesgo de aloinmunización por el estado de activación del sistema inmune. **Objetivo:** Describir la aplicación de las técnicas de biología molecular en el manejo transfusional de pacientes con anemia hemolítica autoinmune como mejora de la seguridad transfusional. **Diseño del estudio:** Trabajo monográfico, con 20 artículos relacionados con el tema, procedentes de origen de datos, difundidos entre el 2013 y 2021 en los idiomas español e inglés. **Conclusiones:** Los pacientes con AHAI, necesitan transfusión antígeno compatible para prevenir la aloinmunización, por lo que las técnicas moleculares son una herramienta poderosa que complementa la investigación inmunohematológica compleja e incrementa la seguridad transfusional. La genotipificación tiene un mayor número de beneficios, es de menor costo y el tiempo de entrega de resultados es oportuno en comparación con otras pruebas de hemaglutinación.

Palabras Claves: Anemia hemolítica autoinmune, Autoanticuerpos; Transfusión, Incompatibilidad, Genotipado de glóbulos rojos.

ABSTRACT

Current pre-transfusion tests for patients with autoimmune hemolytic anemia (AIHA) in Perú; they are based on hemagglutination techniques, which generate a delay in finding compatible units and require a larger sample volume. These techniques are made difficult by the autoantibodies produced by these patients that cause a reaction in all cells and can mask the presence of alloantibodies, leading to a greater risk of alloimmunization due to the state of activation of the immune system. **Objective:** To describe the application of molecular biology techniques in the transfusion management of patients with autoimmune hemolytic anemia as an improvement in transfusion safety. **Study design:** Monographic work, with 20 articles related to the topic, from data sources, disseminated between 2013 and 2021 in Spanish and English. **Conclusions:** Patients with AIHA need compatible antigen transfusion to prevent alloimmunization, so molecular techniques are a powerful tool that complements complex immunohematological research and increases transfusion safety. Genotyping has a greater number of benefits, it is of lower cost and the delivery time of results is opportune in comparison with other hemagglutination tests.

Keywords: Autoimmune hemolytic anemia, Autoantibodies; Transfusion, Incompatibility, Red blood cell genotyping.

INTRODUCCIÓN

La anemia hemolítica autoinmune (AHAI) es un desorden hemolítico adquirido, poco frecuente y causado por autoanticuerpos que reaccionan contra los antígenos eritrocitarios propios, generando la reducción de su vida media (1). Para los pacientes con AHAI que requieren transfusión de concentrado de hematíes es necesario evaluar su necesidad y urgencia de acuerdo con su estado clínico (2).

Las pruebas pretransfusionales convencionales están basadas en técnicas de hemaglutinación y el análisis de antígenos a nivel molecular se reserva para pruebas o investigaciones especializadas (3). Para los pacientes con AHAI, la dificultad de usar solo técnicas de hemaglutinación, radica en la interferencia de autoanticuerpos que pueden ser capaces de aglutinar todos los hematíes analizados, los cuales deben excluirse porque podrían enmascarar aloanticuerpos que pueden causar una reacción hemolítica severa (3), causando una tasa de aloinmunización de 12 a 40% en comparación con otros pacientes multitransfundidos (4).

Las pruebas serológicas de compatibilidad más eficaces se basan en la auto adsorción, estos procedimientos toman mucho tiempo y necesitan gran volumen de muestra, por ello es necesario evaluar pruebas que requieran menor tiempo debido a la necesidad y urgencia de la transfusión (4). La hemaglutinación es la técnica estándar de oro, sin embargo, la genotipificación se puede utilizar para determinar genotipos de antígenos

de eritrocitos en pacientes que han recibido recientemente transfusiones o en pacientes con aloanticuerpos o autoanticuerpos que causan tipificación serológica discrepante y/o cuando la tipificación de antisueros no está disponible (5).

Existe una variedad de métodos de genotipado de glóbulos rojos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); la tipificación molecular actualmente disponible se basa en el análisis de ADN, que utiliza la amplificación por PCR de múltiples genes que codifican varios antígenos de grupos sanguíneos (PCR multiplex), hibridación con antígeno-sondas de oligonucleótidos específicos y detección de señal fluorescente para predecir el genotipo. Para aplicar herramientas moleculares en entornos clínicos, es necesario controlar la tecnología y comprender la base molecular de los genes que codifican los tipos de sangre y sus variantes (6).

Por tanto, las técnicas actuales de inmunohematología tienen dos herramientas para garantizar la seguridad transfusional: la serología y la biología molecular (7). En la actualidad en nuestro país la selección de glóbulos rojos para transfusión usa solo técnicas serológicas (8), los cuales son muy limitadas, tal como lo indica un estudio realizado en China; el cual manifiesta que en muchas ocasiones lleva a transfusiones de "unidades menos incompatibles" causando aloinmunización en pacientes con AHAI (4).

Por lo que nos preguntamos; ¿Cuál es la aplicación de las técnicas de biología molecular en el manejo transfusional de pacientes con anemia hemolítica autoinmune como mejora de la seguridad transfusional?

OBJETIVO

Describir la aplicación de las técnicas de biología molecular en el manejo transfusional de pacientes con anemia hemolítica autoinmune como mejora de la seguridad transfusional.

CAPITULO I

1. Anemia hemolítica autoinmune

1.1. Epidemiología:

En la población caucásica, la incidencia de AHAI es de 1 a 4 casos por 100.000 habitantes/año; más del 70% de los casos nuevos se diagnostican anualmente en individuos mayores de 40 años siendo más frecuente en mujeres que en hombres con una relación 3:2 (9).

La AHAI está catalogada como una enfermedad rara, y se observa que la incidencia en el Perú es de 1-4 casos por cada 100.000 habitantes/año (10).

En el Hospital Nacional Dos de Mayo, en el año 2017 los casos de AHAI se presentaron en una relación de 19 de 10000 pacientes, de estos el 74 % fueron de sexo femenino y mayores de 40 años con un 63% y de tipo secundarias asociadas a una enfermedad con un 84% (11).

1.2. Etiopatogenia:

La AHAI es una enfermedad en la que el sistema inmune produce anticuerpos que atacan a los glóbulos rojos propios del organismo, produciendo una anemia que varía desde la ausencia de síntomas hasta una hemólisis grave que pone en peligro la vida de la persona afectada (12).

La anemia hemolítica autoinmune (AHAI) es un desorden hemolítico adquirido, poco frecuente y causado por autoanticuerpos que reaccionan contra los antígenos eritrocitarios propios, generando la reducción de su vida media. La prueba de antiglobulina humana monoespecífica identifica la naturaleza de los inmunocomplejos presentes en la membrana de los glóbulos rojos sensibilizados con otros análisis de laboratorio para brindar información al médico especialista para el tratamiento y pronóstico de estos pacientes afectados (1).

1.3. Clasificación

Se pueden clasificar según la etiología y la temperatura de reacción óptima de los autoanticuerpos.

En etiología, la AHAI se clasifica en idiopática o primaria cuando no se asocia a otras patologías y secundaria cuando se asocia a otras enfermedades como linfoma, reumatismo, tumores, enfermedades inflamatorias o ciertos fármacos relacionados (13).

Según la temperatura de reacción de los autoanticuerpos, se divide en: AHAI por anticuerpos calientes (w-AHAI) con una temperatura óptima de 37°C, AHAI por anticuerpos fríos con una temperatura optima de 4°C y AHAI mixta cuando es mediada por ambos tipos de anticuerpos (14).

1.3.1. Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes (w-AHAI)

Es el tipo más común, representa el 48-70% de los casos de AHAI y el 70-80% de todos los casos de adultos. Está mediada por autoanticuerpos que reaccionan de forma óptima a 37°C; anticuerpos de clase IgG1 o IgG3, a veces IgM o IgA, solos o con anticuerpos de clase IgG (15).

Los anticuerpos involucrados producen hemólisis extravascular en el sistema reticuloendotelial, pero en casos especiales los anticuerpos IgG son capaces de producir activación del complemento e inducir hemólisis intravascular. Los pacientes con frecuencia presentan Hb <7 g/dl, reticulocitosis y parámetros bioquímicos de hemólisis, como bilirrubina indirecta elevada, haptoglobina reducida o ausente y enzima lactato deshidrogenasa (LDH) elevada. Además, un pequeño porcentaje de pacientes puede desarrollar una trombocitopenia autoinmune llamada síndrome de Evans (14).

Estos pacientes presentan una prueba de Coombs directo (CD) positiva, en el 90% de los casos es IgG solo o con C3 y el 10% solo C3; sin embargo, entre el 1% al 4% son Coombs directo negativo. Si el CD es positivo por IgG, los autoanticuerpos pueden ser eluidos de la membrana y examinar su reactividad frente a otros hematíes con una prueba indirecta de antiglobulina. Por lo general el eluido se comporta como una panaglutinina, pero en algunos casos muestra una cierta especificidad

relativa frente a determinados antígenos del sistema Rh como el auto anti-e. En la w-AHAI suele también encontrarse autoanticuerpos libres en el suero del paciente, que reacciona frente a todos los hematíes normales, dando un resultado positivo en el escrutinio y en la identificación de anticuerpos irregulares, así como en las pruebas cruzadas pretransfusionales (14).

1.3.2. Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos

Está mediada por autoanticuerpos que reaccionan de forma óptima a 4°C.

Se clasifican según las características de los anticuerpos en:

1.3.2.1. AHAI mediada por aglutininas frías (Síndrome por aglutininas frías)

Representa aproximadamente el 15 % de los casos de AHAI, ocurre en personas de entre 50 a 70 años, principalmente en mujeres y ocasionalmente en niños. Las formas secundarias representan el 40% de todos los casos y generalmente se asocian con síndromes linfoproliferativos B como linfomas, macroglobulinemia de Waldstrom, infección por *Mycoplasma pneumoniae* o virus de Epstein-Barr (14).

Está mediada por autoanticuerpos fríos (IgM) que inducen la fijación del complemento. Los autoanticuerpos libres en el suero del paciente

hacen que los glóbulos rojos normales se aglutinen a baja temperatura, con títulos altos a 4°C y respuestas bajas por debajo de los 30°C. Dependiendo del grado de exposición al frío, desarrollan hemólisis hepática y anemia crónica(16).

Las muestras de sangre exhiben autoaglutinación a temperatura ambiente, lo que dificulta los frotis de sangre y los recuentos de células. Esta autoaglutinación aumenta a 4°C y se invierte cuando la muestra se calienta a 37°C. Por lo tanto, la aglutinina fría debe dispersarse lavando los glóbulos rojos con solución salina precalentada a 37°C antes de procesar la muestra. Son positivos para la prueba de Coombs directa anti-C3 pero negativos para IgG, además tienen especificidad anti-I en pacientes con infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* y anti-i en pacientes con mononucleosis infecciosa (14).

1.3.2.2. Hemoglobinuria paroxística a frigore (HPF)

Trastorno muy infrecuente, en menos del 1% de casos de AHAI, presente en niños que han sufrido una infección vírica o bacteriana. Los pacientes presentan un episodio agudo de hemólisis transitoria no relacionado con exposición al frío, siendo la hemólisis de inicio agudo y provocando anemia progresiva (17).

Los autoanticuerpos son del tipo IgG, pero reaccionan con los glóbulos rojos en las regiones más frías del cuerpo, provocando que C3 se fije y se disocie de forma irreversible a temperaturas más altas. Son positivos para la prueba de Coombs directa anti-C3 y el eluido es negativo(14).

Los autoanticuerpos se unen a los glóbulos rojos normales a 4°C y se hemolizan cuando los glóbulos rojos se calientan a 37°C en presencia de complemento. La prueba de Donath-Landsteiner demuestra la presencia de hemolisina bifásica en el suero de estos pacientes. Tienen especificidad anti-P y alcanzan títulos superiores a 64, provocando la aparición súbita de anemia grave por hemólisis intravascular (14,17).

1.3.3. Anemia hemolítica autoinmune mixta

Ocurre en alrededor del 10% de los casos de AHIA, de los cuales del 25% al 42% tienen Lupus eritematoso. Presentan hemólisis por tanto su anemia puede ser muy grave. En las AHAI mixta están presentes autoanticuerpos de tipo frío (IgM) y calientes (IgG), los títulos de anticuerpos IgM son ≤ 64 a 4°C, pero pueden alcanzar hasta 37°C; y el test de Coombs directo es positivo por IgG y C3, además el eluido contiene el autoanticuerpo IgG esperado (18).

CAPITULO II

2. Técnicas de biología molecular en el manejo transfusional

2.1. Clasificación:

Se han desarrollado numerosas metodologías de análisis de ADN, en base al conocimiento de la base molecular de la mayoría de los antígenos eritrocitarios.

Las técnicas moleculares para el análisis genético de grupos sanguíneos se clasifican en: Reacción en cadena de polimerasa (PCR de alelo específico, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de PCR, PCR-multiplex), PCR en tiempo real, Microarreglo y Secuenciamiento.

Otra forma de clasificación es por el uso en laboratorios de Emergencia (PCR de alelo específico, PCR de cebador específico de secuencia, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de PCR), por ser técnicas rápidas, económicas y con buena sensibilidad y especificidad para la detección de los principales antígenos de los grupos sanguíneos; y técnicas utilizadas de forma rutinaria en los laboratorios de Inmunohematología (PCR en tiempo real, Microarreglo y Secuenciamiento), por ser técnicas usadas a gran escala (19).

2.1.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Técnica basada en la repetición de ciclos de temperatura para obtener varios millones de copias de un fragmento de ADN deseado, como en la identificación de un polimorfismo de nucleótidos de una porción del genoma (6).

2.1.2. Técnica de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (PCR-RFLP) y Técnica de cebador específico de secuencia (PCR-SSP)

La técnica de PCR-RFLP se basa en la amplificación de un fragmento de ADN que contiene el polimorfismo específico (SNP) de un antígeno de grupo sanguíneo seguido de la acción de restricción (20). Es la primera prueba de genotipado descrita para grupos sanguíneos, el ADN se detecta por variación en número y longitud, sin embargo puede producir resultados falsos positivos por la digestión parcial de amplicones de ADN por la enzima de restricción (6).

Mientras que la técnica de PCR-SSP utiliza cebadores específicos para detectar la secuencia de nucleótidos de los alelos polimórficos, compensa la ausencia de un sitio de restricción vinculado a un polimorfismo (20).

Ambas técnicas requieren una fase posterior a la PCR con el riesgo de contaminación por la manipulación de productos de amplificación (6,20).

2.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real es de gran especificidad 95%, mejor sensibilidad 98% (21); y mayor criterio de seguridad para cualquier diagnóstico alélico ya que no hay manipulación posterior a la amplificación de muestras; está basada en la extensión y secuenciación específicas de alelo (20).

2.1.4. Técnica de Secuencia específica del oligonucleótido (PCR-SSO) y

Luminex

La técnica PCR-SSO unida al PCR multiplex facilita la detección de varios alelos simultáneamente, siempre que los alelos estudiados tengan productos de diferentes tamaños (20).

El sistema Luminex consta de un citómetro de flujo simplificado y dos láseres (rojo y verde) para detectar el analito a analizar. Se trata de una suspensión basada en tecnología de matriz de microesferas y proporciona una plataforma de ácido nucleico de alto rendimiento para genotipificación de SNP, expresión génica, tipificación de ADN y otras aplicaciones (22).

2.1.5. Técnica de Microarreglo

Se basa en la detección de un espectro de color generado al contactar el ADN diana con sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia

depositadas en una placa por un sistema automatizado que proporciona los resultados en gráficos o tablas (20).

2.1.6. Secuenciamiento de Nueva Generación (NGS)

La técnica de secuenciamiento de nueva generación (NGS) proporciona una identificación de secuencia mediante la acumulación de múltiples lecturas de la secuencia objetivo. Es adecuado para la predicción de antígenos eritrocitarios, pero se requiere mucho cuidado para el análisis de datos por el descubrimiento de nuevas variantes, o en un contexto de aplicación clínica (19).

La secuenciación de próxima generación (NGS) utiliza 3 métodos diferentes para predecir el tipo de sangre: secuenciación del exoma, secuenciación del genoma completo y métodos dirigidos basados en PCR.

2.2. Ventajas

Según Montemayor, las ventajas de la genotipificación más importantes son (23):

- Tipificación de grupo sanguíneo de pacientes recién transfundidos con discrepancia.
- Tipificación de grupos sanguíneos raros.
- Tipificación de grupos sanguíneos en pacientes que reciben terapia monoclonal que interfiere con la serología.

- Determinación de la cigosidad paterna.
- Tipificación sanguínea fetal no invasiva.
- Resolución de análisis complejos de anticuerpos.

La técnica de PCR en tiempo real tiene una ventaja con respecto a las demás técnicas moleculares en inmunohematología por la velocidad de amplificación y el análisis de productos amplificados, es ideal para un diagnóstico de emergencia (6).

La técnica de microarreglo es la técnica a gran escala con un tiempo de respuesta corto y un alto rendimiento, permite identificar más de 30 antígenos diferentes y es aplicada en grandes centros de hemoterapia por la cantidad de muestras que requiere para su desarrollo (20).

La técnica de secuenciamiento de nueva generación (NGS), ha demostrado una detección mejorada para antígenos débiles, cambios estructurales, variaciones en el número de copias, variantes genómicas y microquimerismo (23). Además, complementa las pruebas serológicas y técnicas moleculares, con resultados completos y rápidos para la preselección e identificación de unidades compatibles o en el caso de unidades de grupos sanguíneos con fenotipo infrecuente que carece de uno o varios antígenos presentes. (19).

2.3. Limitaciones

Las técnicas actuales de genotipificación de grupos sanguíneos solo se enfocan en las pruebas de polimorfismos de un solo nucleótido, que son las diferencias a nivel de ADN para predecir el genotipo del antígeno; por ello tienen problemas para detectar variantes desconocidas, estructurales y variaciones en el número de copias (24).

La genotipificación predice un tipo de sangre, pero no determina el fenotipo de la forma en que lo hacen las pruebas serológicas. En algunas ocasiones el genotipo no se correlaciona con el fenotipo, por falta de expresión del gen en el antígeno de la membrana del glóbulo rojo (25).

Las mutaciones genéticas, como sustituciones, inserciones, deleciones de bases, mutaciones en el sitio de corte y empalme, recombinación alélica híbrida y mutaciones múltiples, pueden afectar la estructura y la actividad de la transferasa ABO, dando lugar a cambios en el fenotipo ABO (26).

A pesar de las limitaciones de los métodos moleculares actualmente empleados, encontramos más fenotipos falsos negativos y falsos positivos que genotipos, lo que demuestra que la genotipificación es más eficiente para definir los tipos de sangre, especialmente en pacientes dependientes de transfusiones, como en el caso de los pacientes con AHAI que corresponden a un 4.92% (25).

2.4. Costos

Las tecnologías de biología molecular son costosas porque se necesita, implementar pruebas de acuerdo a la población con la que se trabaja, implementación en infraestructura para laboratorios adecuados y personal altamente calificado (5). Es por ello, que se debe considerar que la genotipificación no es rentable en todos los laboratorios de inmunohematología, por lo que la centralización es la solución para cubrir las necesidades de transfusión sanguínea, la selección de técnicas de genotipado debe basarse en la experiencia de cada laboratorio y los recursos técnicos disponibles en cada ubicación (22).

La genotipificación, solo se debe realizar una a dos veces, porque los antígenos de los grupos sanguíneos están determinados por los cambios en la secuencia de las bases del ADN del gen que codifica la proteína que expresa estos antígenos. Se puede prever el fenotipo del grupo sanguíneo de un individuo a partir de su ADN y esto forma parte del registro de transfusión del paciente, y a su vez se tiene una base de datos tipificada que se utiliza para una mejor coincidencia entre el donante y receptor en futuras pruebas de compatibilidad; para prevenir la aloinmunización (27).

La transfusión de glóbulos rojos es fundamental en el tratamiento de pacientes con transfusiones crónicas como en el caso de pacientes con AHAI; prevenir eventos de aloinmunización a través de la compatibilidad anticipada nos

ayudaría a reducir costos vs eficacia en el tratamiento. Kacker (28) nos presenta un estudio de cohorte de 8500 pacientes con transfusiones crónicas en los Estados Unidos durante 10 años. A los pacientes que inicialmente no recibieron transfusión de sangre se les dio seguimiento implementando emparejamiento limitado prospectivo usando solo técnicas serológicas y obteniendo un costo de US\$ 1,86 billones, en lugar de usar técnicas de biología molecular para un emparejamiento limitado basado en la historia, que costó \$369,482, además, las técnicas moleculares redujeron 2.072 eventos de aloinmunización (28) .

Se debe considerar que los costos varían entre las poblaciones basadas en el diagnóstico, antecedentes de transfusión e historial de pruebas con un promedio de US\$ 195 por paciente en población sin antecedentes ni problemas de compatibilidad. Para los pacientes con diagnósticos complejos con anticuerpos positivos o transfusiones crónicas como los pacientes con Anemia hemolítica autoinmune, el costo promedio es de US\$ 1490 para el análisis serológico frente a otras categorías donde el costo es de US\$ 462 como en el caso de receptores de trasplantes (29).

En Brasil en el 2019 (20), se realizó un estudio en pacientes sin antecedentes transfusionales y muestras sin incompatibilidad; donde comparan en términos de costo, tiempo de reacción y confiabilidad de resultados las técnicas serológicas en tarjeta gel vs técnicas moleculares como PCR-RFLP, PCR-SSP y microarreglo para pacientes. El método serológico requiere menos tiempo

para la realización que los métodos moleculares: el tiempo de desarrollo es de aproximadamente 25 minutos y el costo aproximadamente de \$ 32,45 por muestra. El tiempo requerido para la realización de la técnica PCR-RFLP es de 19 h 30 min, para la técnica PCR-SSP de 3 h 20 min y para Microarreglo de 5 h 20 min. El costo total para la realización del PCR-RFLP es de \$38.22, para el PCR-SSP \$18.07 y para el Microarreglo \$ 65,46 (20). La PCR-SSP resultó más económica en comparación con otras técnicas, y el método serológico fue el método más rápido que los métodos moleculares. Sin embargo, todos los métodos demostraron ser efectivos y seguros en la detección de antígenos eritrocitarios.

CAPITULO III

3. Seguridad Transfusional en pacientes con AHAI

3.1. Manejo Serológico de las pruebas pretransfusionales

Los servicios de medicina transfusional realizan pruebas pretransfusionales como la tipificación ABO - RH y la detección de anticuerpos irregulares. Los pacientes con anticuerpos positivos se someten a pruebas serológicas adicionales como la identificación de anticuerpos irregulares, prueba de antiglobulina directa (PAD) y otras en función de la complejidad de los anticuerpos presente en el suero del paciente (29). La hemaglutinación es la técnica estándar de oro para determinar la tipificación de glóbulos rojos, sin embargo, las limitaciones técnicas y clínicas de la inmunohematología serológica han llevado a muchos laboratorios al uso de ensayos moleculares para predecir el fenotipo de los glóbulos rojos (25).

El manejo transfusional de pacientes con anemia hemolítica autoinmune requiere técnicas de absorción que toman mucho tiempo y recursos, y pueden no ser efectivas en casos de autoanticuerpos de título alto (5).

La transfusión recurrente en pacientes con AIHA, produce en el tiempo eventos de aloinmunización, la compatibilidad anticipada en estos pacientes con transfusión crónica disminuiría en un 30% (28).

3.2. Políticas de Seguridad Transfusional:

En el 2004 el programa nacional de hemoterapia y bancos de sangre (PRONAHEBAS) del Ministerio de salud describe normas para asegurar su aplicabilidad a todos los establecimientos que forman parte de la red nacional. Para las pruebas pre transfusionales solo se describe que se debe realizar Prueba Cruzada Serológica y todos los Banco de Sangre tendrán un proceso para la provisión de sangre antes de completar las pruebas de compatibilidad cuando el retraso de la unidad para la transfusión pudiera ser perjudicial para el paciente (8).

No existe una política estándar en todos los servicios de transfusión para prevenir la aloinmunización y los efectos adversos asociados. Algunos servicios proporcionan sangre con antígeno compatible una vez que el paciente ya ha desarrollado un aloanticuerpo; otros solo consideran a los antígenos con mayor frecuencia (C, E, K) en la compatibilidad y otros consideran un amplio rango de antígenos (28).

Los métodos moleculares se han convertido en una realidad para la seguridad de las transfusiones de sangre, especialmente para pacientes con anemia hemolítica autoinmune (22). Las técnicas de genotipificación de glóbulos rojos para pacientes con AIHA, ayudan a seleccionar unidades antígeno compatible que tienen un alto riesgo de aloinmunización y requieren múltiples transfusiones; sin necesidad de realizar procedimientos dificultosos, costosos, largos y que requieren gran cantidad de muestra (4).

Mediante la genotipificación de glóbulos rojos y un sistema interconectado desde el Centro de Referencia se puede consultar el almacén de unidades antígeno negativo, evitando la necesidad de realizar exámenes de detección serológicos y disminuyendo el tiempo de entrega de concentrado de hematíes en pacientes con necesidad transfusional (30).

La genética juega un papel central en la investigación y la práctica de las transfusiones, el reconocer la necesidad de asegurar la compatibilidad entre donantes y receptores ha llevado a buscar un alto grado de seguridad, por lo que las transfusiones de sangre se convirtieron en uno de los procedimientos médicos más comunes (31).

3.3. Riesgo transfusional:

La exposición a antígenos extraños de glóbulos rojos puede inducir a la aloinmunización. A pesar de las actuales políticas de detección de anticuerpos ABO/Rh D, las reacciones hemolíticas potencialmente mortales resultantes de aloanticuerpos previamente inducidos todavía puede complicar las transfusiones de glóbulos rojos (32). La probabilidad de que un individuo produzca anticuerpos anti-eritrocitarios es de 2.2% por unidad de sangre transfundida, y en pacientes con transfusión crónica de 7.7% (32).

La inducción de aloanticuerpos por exposición a glóbulos rojos genéticamente diferentes complica la compatibilidad de grupos sanguíneo, la matriz de medicina transfusional (TM-Array) podría convertirse en una herramienta de diagnóstico clínico, para estudiar los trastornos relacionados con las transfusiones de sangre, ya que ha sido diseñado con 16.000 participantes de diferentes grupos étnicos con 879.000 SNPs y ha detectado más del 99% de los SNP de los genes de los grupos sanguíneos ABO, MNS, y RHD/RHCE (31).

El genotipado molecular ayuda a genotipar antígenos de grupos sanguíneos de pacientes con múltiples transfusiones para proporcionar sangre de un donante al paciente después de estudiar el perfil de antígeno extendido para prevenir la aloinmunización (7).

CONCLUSIONES

- La aloinmunización es un riesgo de la transfusión de sangre en ausencia de técnicas pre transfusionales en especial para pacientes que necesitan una transfusión crónica como los pacientes con Anemia Hemolítica Autoinmune.
- En nuestro país la tipificación de antígenos extendido solo se realiza mediante métodos serológicos que requieren mucho tiempo de respuesta al paciente y son de alto costo operativo.
- Mediante el uso de la genotipificación basada en ADN, la ampliación de la tipificación de antígenos es práctica, económica y se puede utilizar a nivel mundial para reducir la tasa de aloinmunización. La tecnología apropiada de genotipado molecular de antígenos de grupo sanguíneo debe seleccionarse de acuerdo con los antígenos de alta o baja prevalencia presentes en las transfusiones de acuerdo con la población con la que se trabaja.
- Los métodos moleculares se consideran más sensibles y específicos, sin embargo, se debe considerar que la presencia de un determinado gen no garantiza su expresión en la membrana eritrocitaria.

- El costo de las pruebas moleculares ha sido una barrera para la implementación en nuestro país, sin embargo, el costo de la detección molecular se puede reducir significativamente mediante el análisis de varios polimorfismos al mismo tiempo y el procesamiento de un gran número de muestras por reacción utilizando un modelo de prueba centralizado.
- En la actualidad la tipificación molecular es un complemento invaluable del método serológico. Para aplicar la herramienta molecular en situaciones clínicas es necesario dominar las tecnologías y conocer las bases moleculares de los genes que codifican los grupos sanguíneos y sus variantes.
- En la actualidad en nuestro país los métodos a nivel molecular se reservan para investigaciones o pruebas especializadas.
- Para implementar técnicas de biología molecular en el laboratorio de Inmunohematología se debe tener personal entrenado y capacitado, espacios dedicados en los laboratorios, conservadoras y congeladoras para la conservación de las muestras y reactivos, adquisición de equipos.
- Para la implementación de la genotipificación de glóbulos rojos se necesita tecnología rentable, centralización de pruebas y determinar la importancia del impacto en los resultados de los pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Toro-Espinosa L.A., Jaramillo-Arbeláez P. Caracterización de la anemia hemolítica autoinmune y utilidad de la prueba de antiglobulina directa monoespecífica en el diagnóstico. [Internet]. Hematologia. 2020; 24(2): 55-64; Disponible en: <http://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/article/view/246/349>
2. Chaudhary RK, Das SS. Autoimmune hemolytic anemia: From lab to bedside. Asian J Transfus Sci [Internet]. 2014;8(1):5-12. doi: 10.4103/0973-6247.126681
3. Zhu Z, Ye L, Li Q, Gao H, Tan Y, Cai W. Red Cell Immunohematology Research Conducted in China. Transfus Med Rev [Internet]. 2017;31(2):102-6. doi: 10.1016/j.tmr.2016.11.004
4. El Kenz H, Efira A, Le PQ, Thiry C, Valsamis J, Azerad MA, et al. Transfusion support of autoimmune hemolytic anemia: ¿how could the blood group genotyping help? Transl Res J Lab Clin Med [Internet]. 2014;163(1):36-42. doi: 10.1016/j.trsl.2013.09.007
5. Fasano RM, Chou ST. Red Blood Cell Antigen Genotyping for Sickle Cell Disease, Thalassemia, and Other Transfusion Complications. Transfus Med Rev [Internet]. 2016;30(4):197-201. doi: 10.1016/j.tmr.2016.05.011

6. Tournamille C. Molecular biology methods in immunohematology. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang* [Internet]. 2013;20(2):72-9. doi: 10.1016/j.traccli.2013.02.012
7. Gorakshakar A, Gogri H, Ghosh K. Evolution of technology for molecular genotyping in blood group systems. *Indian J Med Res* [Internet]. 2017;146(3):305-15. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_914_16
8. MINSA. Sistema de gestión de la calidad del PRONAHEBAS: Criterios de Calidad [Internet]. NT N°012-2004/MINSA/DGSP-V.01. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/417881/341553602050563399920191106-32001-u1g5j2.pdf>
9. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A, et al. Guidelines on the management of drug-induced immune and secondary autoimmune, haemolytic anaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2017;177(2):208-20. doi: 10.1111/bjh.14654
10. MINSA. Listado de Enfermedades Raras y Huérfanas [Internet]. D58 - D589, Resolución Ministerial N° 1075-2019/MINSA. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/426220/resolucion-ministerial-n-1075-2019-minsa.PDF>
11. Mautino J. Enfermedades asociadas a la Anemia Hemolítica Autoinmune y su prevalencia en pacientes atendidos en el Hospital Nacional Dos de Mayo entre

enero - noviembre 2017 en Lima-Perú. [Internet] [Tesis de Pregrado]. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/8052?show=full>

12. Chen C, Wang L, Han B, Qin L, Ying B. Autoimmune hemolytic anemia in hospitalized patients: 450 patients and their red blood cell transfusions. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2020;99(2): e18739. doi: 10.1097/MD.00000000000018739
13. Michel M. Classification and therapeutic approaches in autoimmune hemolytic anemia: an update. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2011;4(6):607-18. doi: 10.1586/ehm.11.60
14. Cortés A, Muñiz E, León de González G. Inmunohematología básica y aplicada [Internet]. Primera edición. Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional. Impresora Feriva S.A: Santiago de Cali, Colombia; 2014. 512 p. Disponible en: <https://gciamt.org/wp-content/uploads/2020/03/inmunohematologia-basica-y-aplicada.pdf>
15. Liebman HA, Weitz IC. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Med Clin North Am* [Internet]. 2017;101(2):351-9. doi: 10.1016/j.mcna.2016.09.007
16. Gabbard AP, Booth GS. Cold Agglutinin Disease: *Clin Hematol Int* [Internet]. 2020;2(3):95. doi: 10.2991/chi.k.200706.001

17. Shanbhag S, Spivak J. Paroxysmal Cold Hemoglobinuria. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2015;29(3):473-8. doi: 10.1016/j.hoc.2015.01.004
18. Wasnik M, Lahare S, Jagzape T, Chandrakar R. Blood group discrepancy in mixed-type autoimmune hemolytic anemia in a pediatric patient. *Asian J Transfus Sci* [Internet]. 2021;15(2):247. doi: 10.4103/ajts.AJTS_74_19
19. Boccoz SA, Fouret J, Roche M, Lachuer J, Legras-Lachuer C, Corgier BP, et al. Massively parallel and multiplex blood group genotyping using next-generation-sequencing. *Clin Biochem* [Internet]. 2018; 60:71-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.07.010
20. Quirino MG, Colli CM, Macedo LC, Sell AM, Visentainer JEL. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. 2019;41(1):44-9. doi: 10.1016/j.htct.2018.06.006
21. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* [Internet]. 2006;363(1-2):32-47. doi: 10.1016/j.cccn.2005.06.022
22. Bonet Bub C, Castilho L. ID CORE XT as a tool for molecular red blood cell typing. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2019;19(9):777-83. doi: 10.1080/14737159.2019.1656529

23. Montemayor C, Brunker PAR, Keller MA. Banking with precision: transfusion medicine as a potential universal application in clinical genomics. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2019;26(6):480-7. doi: 10.1097/MOH.0000000000000536
24. Wu PC, Pai SC, Chen PL. Blood group genotyping goes next generation: featuring ABO, RH and MNS. *ISBT Sci Ser* [Internet]. 2018;13(3):290-7. doi: 10.1111/voxs.12426
25. Menegati SFP, Santos TD, Macedo MD, Castilho L. Discrepancies between red cell phenotyping and genotyping in daily immunohematology laboratory practice. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis* [Internet]. 2020;59(1):102585. doi: 10.1016/j.transci.2019.06.020
26. Zuo Q, Duan Y, Wang B, Xu H, Wu W, Zhao J, et al. Genomic analysis of blood samples with serologic ABO discrepancy identifies 12 novel alleles in a Chinese Han population. *Transfus Med* [Internet]. 2020;30(4):308-16. doi: 10.1111/tme.12686
27. Carter JH, Flegel WA. Red Cell Transfusions in the Genomics Era. *Semin Hematol* [Internet]. 2019;56(4):236-40. doi: 10.1053/j.seminhematol.2019.11.001
28. Kacker S, Ness PM, Savage WJ, Frick KD, Shirey RS, King KE, et al. Cost-effectiveness of Prospective Red Cell Antigen-Matching to Prevent

- Alloimmunization among Sickle Cell Patients. *Transfusion (Paris)* [Internet]. 2014;54(1):86-97. doi: 10.1111/trf.12250
29. Mazonson P, Efrusy M, Santas C, Ziman A, Burner J, Roseff S, et al. The HI-STAR study: resource utilization and costs associated with serologic testing for antibody-positive patients at four United States medical centers. *Transfusion (Paris)* [Internet]. 2014;54(2):271-7. doi: 10.1111/trf.12176
 30. Flegel WA, Gottschall JL, Denomme GA. Integration of red cell genotyping into the blood supply chain: a population-based study. *Lancet Haematol* [Internet]. 2015;2(7): e282-289. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00090-3
 31. Guo Y, Busch MP, Seielstad M, Endres-Dighe S, Westhoff CM, Keating B, et al. Development and evaluation of a transfusion medicine genome wide genotyping array. *Transfusion (Paris)* [Internet]. 2019;59(1):101-11. doi: 10.1111/trf.15012
 32. Evers D, Middelburg RA, de Haas M, Zalpuri S, de Vooght KMK, van de Kerkhof D, et al. Red-blood-cell alloimmunisation in relation to antigens' exposure and their immunogenicity: a cohort study. *Lancet Haematol* [Internet]. 2016;3(6): e284-292. doi: 10.1016/S2352-3026(16)30019-9

ANEXOS

ANEXO 1

Comparación de métodos para la tipificación de antígenos de grupos sanguíneos	
Tipificación basada en anticuerpos	Tipificación basada en ADN
Tiempo de respuesta $\leq$ de 1 h	Entrega en 24 h
Manual	Automatizado
Se requieren glóbulos rojos frescos	Cualquier fuente celular
Equipo existente	Equipo y ambiente especializado
Detección directa de expresión de antígeno	Expresión de antígeno indirecta "prevista"
Interferencia de Glóbulos rojos recién transfundidos o IgG unida	Sin interferencia de glóbulos rojos recién transfundidos o IgG unida
Sin reactivos para algunos antígenos clínicamente significativos	Tipificación para cualquier antígeno cuya base genética sea conocida
Es posible que se pierda la expresión de antígeno débil / variable.	Detección de expresión débil de antígeno
Baja resolución	Posibilidad de alta resolución